



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES IZTACALA

16
2ej.

CARACTERIZACION DE LA ACTIVIDAD
DE FOSFOHIDROLASA Y PIROFOSFATASA
DE LA ENZIMA GLUCOSA-6-FOSFATASA
DE TESTICULO DE RATA

TESIS PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G O

PRESENTADO POR JOSE CAMARILLO ROMERO

Asesor de Tesis: M. en C. Raquel Trejo Albarrán

TESIS CON
FALLA DE CUBIERTA

1998

258903



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES IZTACALA

14

CARACTERIZACION DE LA ACTIVIDAD
DE FOSFOHIDROLASA Y PIROFOSFATASA
DE LA ENZIMA GLUCOSA-6-FOSFATASA
DE TESTICULO DE RATA

TESIS PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G O
PRESENTADO POR JOSE CAMARILLO ROMERO

ASESOR DE TESIS: M. EN C. RAQUEL TREJO ALBARRÁN.

Este trabajo se realizó en el laboratorio de Bioquímica de la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas del Hospital de Oncología en el Centro Médico Siglo XXI bajo la tutoría de la M. en C. Raquel Trejo Albarrán.

Deseo dedicar el esfuerzo que representa la elaboración de esta tesis a las siguientes personas:

A **Dios** por todo lo que me ha dado en la vida.

A mis **Padres Guadalupe y Catalina** por todo su amor incondicional y su gran apoyo en todo lo que he emprendido en la vida.

A mi amada **Esposa Alma** por todo su amor, amistad, comprensión y apoyo que me ha dado durante esta nueva vida.

A mi amado **Hijo José Raúl** por ser la alegría más grande que Dios me ha dado.

A mis **Hermanos Francisco, Bernardo, Elias, Alberto y Enrique** por ser tan buenos amigos, por su amor incondicional y su gran apoyo.

A mis suegros **Raúl y Teresa** por su amistad y por darme uno de sus tesoros: a mi esposa **Alma**

INDICE

	Página
Introducción	1
1)Función Testicular	
1.1)Efecto de la Glucosa en el Testículo	
1.2)Glucosa-6-Fosfatasa	
1.2.1)Reacciones que Cataliza la Glucosa-6-Fosfatasa	
1.2.2)Componentes del Sistema Glucosa-6-Fosfatasa	
1.2.3)Latencia de la Enzima	
1.2.4)Termosensibilidad de la Enzima Purificación de la Enzima G-6-Pasa	
Antecedentes	10
Planteamiento del Problema	11
Objetivo General	12
Objetivos Especificos	12
Materiales y Métodos	13
1)Obtención de Fracciones Subcelulares Determinación de la Glucosa-6-Fosfatasa	
2.1)Reacción de Fosfohidrolasa	
2.2)Reacción de Pirofosfatasa	
3)Tratamiento con Detergentes	
3.1)Efectos de Detergente Durante la Reacción Enzimática	
3.2)Preincubación de las Vesículas	

Membranales con Diferentes Concentraciones de Desoxicolato y Determinación de la Actividad Enzimática a una Menor Concentración

3.3) Preincubación de la Fracción Membranal con Diferentes Concentraciones de Desoxicolato y Determinación Enzimática del Material Solubilizado y no Solubilizado

3.4) Determinación de la Especificidad de la Reacción de Glucosa-6-Fosfatasa

4) Determinación de la Fosfatasa Acida

5) Determinación del Pi Liberado Durante las Reacciones Enzimáticas

6) Determinación de Proteínas

Resultados

20

1) Distribución Subcelular de la Glucosa-6-Fosfatasa

1.1) Reacción de Glucosa-6-Fosfohidrolasa

1.2) Reacción de Pirofosfatasa

2) Efecto de la Temperatura Sobre la Glucosa-6-Fosfatasa Testicular

2.1) Reacción de la Glucosa-6-Fosfohidrolasa

2.2) Reacción de Pirofosfatasa

3) Termoestabilidad de la Glucosa-6-Fosfatasa Testicular a 37°C

3.1) Reacción de Glucosa-6-Fosfohidrolasa

3.2) Reacción de Pirofosfatasa Testicular

3.3) Comparación de la Actividad de la Glucosa-6-Fosfatasa Testicular y

Hepática en las Reacciones de Glucofosfohidrolasa
y de Pirofosfatasa

4)Tiempo de Decaimiento de la Reacción
de Glucosa-6-Fosfohidrolasa Testicular

5)Latencia de la Glucosa-6-Fosfatasa Testicular

5.1)Efecto de Detergentes Sobre la Reacción
de Glucosa-6-Fosfatasa

6)Efecto del Tratamiento con Desoxicolato
Sobre la Membrana Microsomal

Discusión

63

Conclusiones

74

Bibliografía

76

INTRODUCCION

1) Función Testicular

El testículo es un órgano del aparato reproductor masculino que puede funcionar como una glándula mixta, con funciones exócrina y endócrinas. Está constituido por numerosos túbulos seminíferos y por tejido intertubular, cubiertos por la túnica albugínea. La función endócrina reside fundamentalmente en el tejido intertubular ya que en este lugar se encuentra las células de Leydig que produce andrógenos (Hooker, 1970).

La función exócrina se localiza en los túbulos seminíferos en donde se lleva a cabo la producción de espermatozoides que son liberados a la luz del túbulo junto con el fluido testicular (Setchell, 1970).

En los mamíferos el testículo se encuentra en el saco escrotal lo que hace que su temperatura sea de 3 a 5 °C inferior a la del abdomen (Korman, 1967).

1.1) Efecto de la Glucosa en el Testículo

Se ha demostrado que el testículo de rata adulta depende de la glucosa para la producción de gametos, ya que cuando se induce la hipoglucemia aguda por la administración de insulina se produce una degeneración de las células germinales (Mancini y col., 1960). Además cuando no se permite la entrada de glucosa por la administración de 5 tío-D-glucosa, se bloquea el transporte de glucosa al interior de las células, produciendo infertilidad temporal por la desaparición de

espermátides y espermátocitos del epitelio germinal (Zysk y col., 1975). In vitro se ha demostrado que la incubación de rebanadas de testículo en presencia de glucosa aumenta la síntesis de proteínas y de ARNm (Davis y Firlit, 1965). Sin embargo la glucosa no estimula los niveles de ATP en testículo de rata inmadura (Means y Hall, 1968) o con criptorquidea (Davis, 1969; Gomez, 1971),

Por lo anterior se concluyó que los espermátocitos y las espermátides eran las células responsables de los efectos que la glucosa produce en el testículo adulto. Sin embargo, en las espermátides y espermátocitos aislados, con acceso libre a los sustratos se elimina el posible papel regulador de las células de Sertoli, la adición de glucosa al medio produce un aumento de 1.5 veces la incorporación de aminoácidos marcados a proteínas (Nakamura y Hall, 1976, 1977 y 1978). Además se ha observado que los espermátocitos y las espermátides aisladas e incubadas con glucosa disminuyen sus niveles de ATP (Mita y Hall, 1982) y que la adición de lactato simultáneamente con la glucosa impide ese decremento. Además se demostró que el lactato era más eficiente que la glucosa para elevar los niveles de ATP y estimular la síntesis de proteínas (Jutte y col., 1981), aunque la adición de lactato no podía revertir totalmente la disminución de ATP producido por la incubación de la glucosa (Nakamura y col., 1978; Grootegoed y col., 1984).

La disminución de los niveles de ATP en las células germinales aisladas inducida por la incubación en presencia únicamente de glucosa no puede ser explicada fácilmente, ya que si se realizara la oxidación de cada molécula de glucosa hasta CO_2 y H_2O se producirían 36 ATP. La

disminución de los niveles de ATP podría deberse a un desequilibrio entre las reacciones de consumo de ATP durante la fosforilación de los sustratos y las reacciones de síntesis de ATP durante la oxidación de la glucosa. La disminución en los niveles de ATP podría deberse a una demanda que supere la velocidad con la que se degrada la glucosa y con la que se sintetiza ATP.

Se sabe que los espermatozoides del epidídimo de toro incubados con glucosa mantienen un flujo glucolítico lento en donde no se obtiene aumento de los niveles de ATP, esta situación posiblemente se debe a la hidrólisis de los intermediarios fosforilados como glucosa-6-fosfato, fructuosa-6-fosfato y fructuosa-1-6-difosfato haciendo que sea ineficiente la vía glucolítica (Hammersted y Lardy, 1983).

En el hígado se ha demostrado que en la vía de degradación de glucosa hasta piruvato, las dos reacciones de fosforilación de sustratos que requieren ATP pueden ser revertidas por enzimas diferentes (como la fructuosa difosfatasa y la glucosa-6-fosfatasa) que operan simultáneamente y que dan por resultado el reciclaje de sustratos (Lehninger, 1984).

En el espermatozoide de toro no fue posible identificar la presencia de la glucosa-6-fosfatasa (Hammersted y Lardy, 1983) con las características descritas por Nordlie y Soodsma (1966) para la enzima hepática y se concluyó que la glucosa-6-fosfato y la fructuosa-1-6-difosfato podrían ser hidrolizadas por fosfatasas inespecíficas. Sin embargo, otras observaciones sugieren la presencia de glucosa-6-fosfatasa en las células germinales. Hippaka y Hammersted (1978) determinaron y caracterizaron parcialmente la hidrólisis de

glucosa-6-fosfato en espermatozoides eyaculados de toro, Colilla y col., (1975) demostraron de manera parcial la presencia de la glucosa-6-fosfatasa y fosfotransferasa en un homogeneizado total de testículo de rata. Recientemente Díaz, M. y Trejo, R. (1994) caracterizaron la reacción de fosfohidrolasa de la glucosa-6-fosfatasa en fracciones enriquecidas con retículo endoplásmico de testículo de rata inmadura y adulta y en células germinales aisladas en diferentes estadios de maduración. En la rata adulta la actividad de esta enzima es menor que la actividad en rata inmadura de 38 días; por métodos histoquímicos y mediante microscopia electrónica también se ha demostrado la presencia de esta enzima en el retículo endoplásmico y en el aparato de Golgi de espermatoцитos y espermátides en maduración, así como en células de Leydig y Sertoli (Yokoyama, M., 1977; Tang y col., 1988; Thorne-Tjosland y col., 1991).

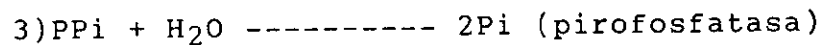
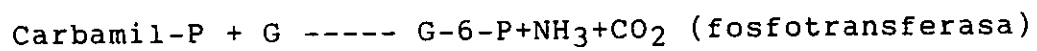
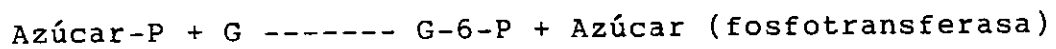
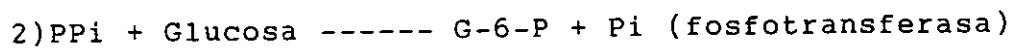
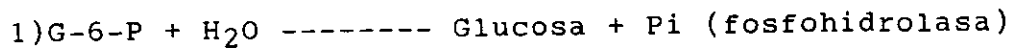
1.2) Glucosa-6-fosfatasa

La enzima glucosa-6-fosfatasa es muy importante ya que es reguladora de los pasos finales de la glucogenólisis y de la gluconeogénesis (Cory y Cory, 1952). La glucosa derivada del glucógeno puede ser liberada al torrente sanguíneo y satisfacer las necesidades energéticas de los diferentes tejidos.

La glucosa-6-fosfatasa es una proteína integral del retículo endoplásmico, los estudios hechos en hígado y en otros tejidos así lo demuestran. Amar-Costesec y col., (1974), utilizando al hígado como modelo observaron que dicha enzima está localizada en vesículas originadas del retículo endoplásmico llamados microsomas.

1.2.1) Reacciones que Cataliza la Glucosa-6-fosfatasa

Has y Byrne (1960), Nordlie (1966), Stetten (1974), a través de numerosos estudios, demostraron que la glucosa-6-fosfatasa es una enzima multifuncional capaz de degradar a la glucosa-6-fosfato (G-6-P) y también de sintetizar este importante intermediario metabólico. Las reacciones catalizadas por la enzima son las siguientes:



Donde G-6-P=Glucosa-6-fosfato, PPi=Pirofosfato inorgánico, Azúcar-P=Azúcar Fosfato, G=Glucosa, Pi=Fosfato inorgánico.

1.2.2) Componentes del Sistema Glucosa-6-fosfatasa

Arion y col., (1975) observaron que los microsomas con la membrana intacta incubados en presencia de compuestos que actúan sobre los grupos tiol (SH) como 5,5-ditiobis-nitrobenzoato (DTNB), N-etil-maleimida (NEM) disminuían la actividad de la enzima, pero que cuando la integridad de la membrana de la vesícula se perdía, la inhibición también desaparecía. Estos resultados sugirieron la presencia de otras proteínas involucradas en la actividad de la enzima y que esos inhibidores no afectaban directamente a la glucosa-6-fosfatasa (G-6-Pasa). El trabajo de Valquili y col., (1981) utilizando maleimidias con diferente número de carbonos en su cadena (2-8) confirmó que estos compuestos inhibían la actividad de la enzima en microsomas intactos por la modificación de los grupos sulfhidrilos

(SH) expuestos de la membrana, pero que en microsomas permeabilizados con detergentes estas sustancias no lo hacían, apoyando las observaciones de Arion y col., (1975).

Posteriormente se propuso que la enzima requiere de la actividad de 3 transportadores para la realización de sus funciones y que son específicos para transportar Pi-PPi, G-6-P o glucosa del citoplasma al lumen del microsoma donde se encuentra el sitio catalítico de la enzima y viceversa (fig. 1). El transportador o translocasa 1 (T1) solo es capaz de transportar G-6-P, azúcares como la manosa-6-fosfato (M-6-P) no pueden penetrar la membrana del retículo endoplásmico.

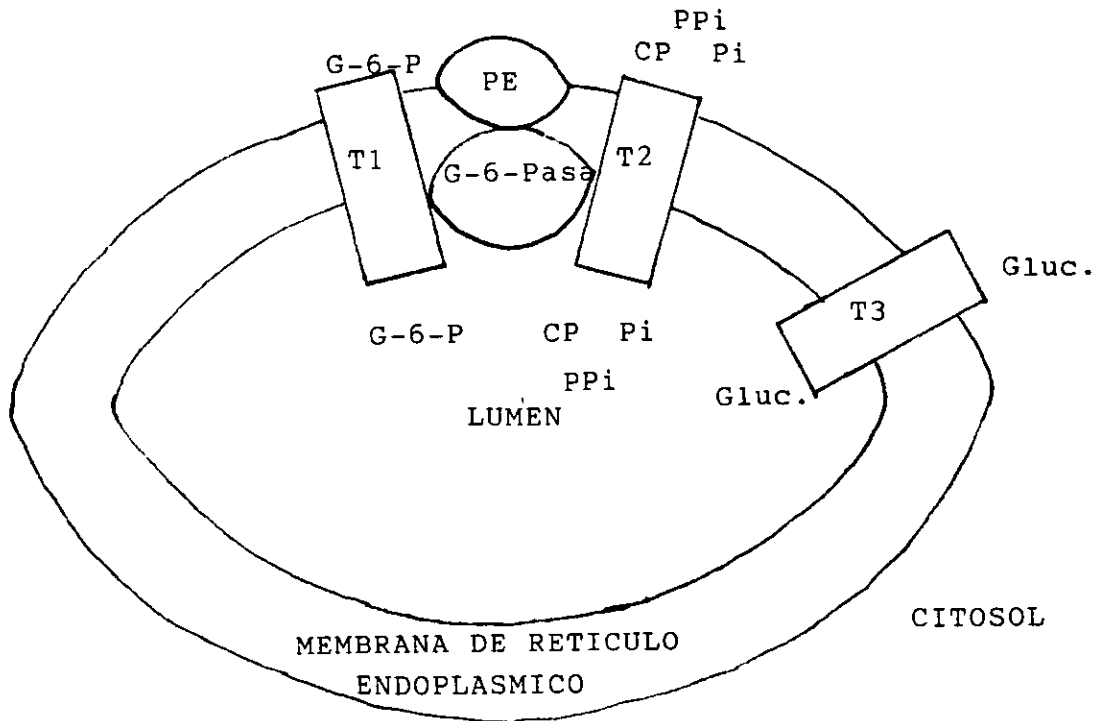
El Pi es acarreado por el transportador 2 (T2) que además transporta PPi y carbamil-fosfato (C-P) al interior de la vesícula microsomal y liberar al medio el Pi producto de la hidrólisis de sustratos fosforilados como algunos azúcares o PPi inorgánico. Por último la glucosa requiere de un tercer transportador (T3) para poder atravesar la membrana (Arion y col., 1976).

También se ha propuesto que la G-6-Pasa requiere de una proteína estabilizadora (PE) que posiblemente regule la actividad de la enzima (Waddell y col., 1990). Este modelo fue propuesto por Arion y col. (1976) pero ha sido modificado el arreglo de estos componentes dentro de la membrana del microsoma para interaccionar con el sitio catalítico de la enzima (Foster y col., 1991).

1.2.3) Latencia de la Enzima

La permeabilización o la solubilización de la membrana microsomal empleando detergentes o solventes aumenta la actividad de

FIGURA 1: MODELO DEL COMPLEJO MICROSOMAL DE LA GLUCOSA-6-FOSFATASA



Representación de una vesícula membranal conteniendo el sistema de Glucosa-6-Fosfatasa (modelo modificado por Foster, 1991). El Complejo enzimático está constituido de una proteína estabilizadora (PE), la unidad catalítica (G-6-Pasa) y 3 translocadores de sustratos que permiten la entrada o salida de los sustratos, estas translocadores son: Translocasa T1 de glucosa-6-fosfato (G-6-P). Translocasa T2 de pirofosfato inorgánico (PPI), carbamil fosfato (CP) y fosfato inorgánico (Pi). Translocasa T3 de glucosa.

la enzima G-6-Pasa. A este cambio de la actividad de la enzima sin la participación de los transportadores se denomina latencia (Arion y col.,1980). Las modificaciones del retículo endoplásmico son dependientes de la temperatura y de la concentración del detergente utilizado. Estudios realizados por Schuelze y col.(1985) mostraron que el uso de detergentes no ionicos como el Triton x-114 liberan la actividad total de la G-6-Pasa dependiente del tiempo y de la temperatura de preincubación. A temperaturas altas la activación por detergentes es pequeña pero a 0°C la latencia es alta. Se ha utilizado una variedad de detergentes anionicos, ionicos y anfifilicos para estudiar la actividad hidrolítica de la glucosa-6-fosfatasa. Snoke y Nordlie (1967) empleando un homogeneizado total de hígado observaron un incremento en la actividad enzimática en presencia de desoxicolato de sodio, colato, Triton X-100 y bromuro de cetil-metil amonio (CTAB), otros detergentes inhibieron la actividad de la enzima, estos fueron: lauril sulfato de sodio, Tween 20 y 80. Además observaron que las 3 reacciones catalizadas por la glucosa-6-fosfatasa eran estimuladas por los detergentes en el siguiente orden: la reacción de fosfotransferasa que la de pirofosfatasa y que la fosfohidrolasa. Otro detergente neutro es el 3(3-(colaidopropil 2-dimetilamonio)-4-propanosulfonato) (CHAPS) también ha sido utilizado (Watts, 1990) y se ha observado que estimula a la actividad enzimática en forma estable por más de 30 minutos a 30°C

1.2.4) Termosensibilidad de la Enzima

La actividad específica de G-6-Pasa en microsomas intactos de hígado es similar a 0, 30 y 37°C. Sin embargo el tratamiento con la

mayoría de los detergentes produce una enzima inestable a temperaturas mayores de 0°C (Nordlie y Soodsma, 1966; Schuelze y col., 1985; Zakim y Dannenberg, 1990)

1.2.5) Purificación de la Enzima G-6-Pasa

A pesar de la importancia de esta enzima su purificación y caracterización se ha logrado en pocos tejidos, ya que forma parte de un sistema complejo y se requeriría de la purificación de otros elementos para reproducir su funcionamiento en modelos in vitro (revisado por Nordlie y col., 1992).

En 1975, Anchors y Karnovski, (1975) describieron por primera vez la purificación de la G-6-Pasa de cerebro, hígado y riñón de rata. El peso molecular de la enzima purificada fue determinado por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS, y este fue de 28 kDa. La G-6-Pasa extraída del hígado y la placenta humana mediante el uso de detergentes tuvo un peso molecular de 58-64 kDa (Reczeck y Ville, 1982), en franca discrepancia con el valor anterior. Debido a los problemas en su purificación y reconstitución muchos autores han decidido utilizar a los microsomas intactos, porque se puede tener a la enzima y a los transportadores ensamblados en la membrana microsomal, aunque la actividad de la enzima medida sea menor a la observada en vesículas membranales tratadas con detergente.

ANTECEDENTES

Existen diversas evidencias que señalan la presencia de esta enzima en el testículo. Utilizando un homogeneizado total de testículo de la rata adulta se determinaron los valores de la K_m y la V_{max} para las reacciones de fosfotransferasa y de fosfohidrolasa de la glucosa-6-fosfatasa (Colilla y col., 1975).

Días y Trejo, (1994) caracterizaron la actividad de fosfohidrolasa de la G-6-Pasa del testículo de la rata inmadura. En el testículo de rata de 38 días de edad encontraron que la actividad se encuentra asociada a fracciones membranales que sedimentan a 9770 y 20000 x g.

Además descartaron la participación de la fosfatasa ácida presente en el testículo que podría participar en la hidrólisis de la G-6-P al incluir en el medio de incubación un inhibidor de esa enzima (CdI_2 2.5 mM). Observaron que la reacción de glucosa 6 fosfohidrolasa presenta un pH óptimo de 6.5 semejante a lo reportado por Nordlie y Soodma, (1966). A este valor de pH y en presencia de CdI_2 2.5 mM presenta una V_{max} de 1.0 umoles Pi/mg. prot. h y en ausencia del inhibidor la V_{max} fue de 1.53 umoles Pi/mg prot. h. La K_m aparente tanto en ausencia de CdI_2 como en su presencia fue de 20 mM.

Estos valores son muy semejantes a los reportados para la enzima de los espermatozoides eyaculados de toro (Hipakka y Hammersted, 1978)

Además observaron que al igual que la enzima de hígado la del testículo fue inhibida por vanadato, teniendo una I_{50} de 5 μM .

La actividad de G-6-fosfohidrolasa se modificó según el grado

de desarrollo del retículo endoplásmico.

El nivel de actividad más alto se encontró en espermátides (en fase de Golgi y de capuchón) seguido por la de los espermátocitos primarios y por la de espermatozoides. Estos resultados apoyan la inmunolocalización por microscopia electrónica reportada por Thorne-Thjomsland y col., (1991).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las espermátides y los espermátocitos aislados e incubados con glucosa disminuyen su concentración de ATP.

En el espermatozoide de toro se ha demostrado el funcionamiento de los ciclos fútiles, a nivel de la síntesis y degradación de G-6-P y de fructuosa-1-6-difosfato, solo que en este caso las reacciones que libera glucosa y fructuosa son catalizadas por fosfatasas inespecíficas (Hammersted y Lardy, 1983). Esto da como resultado la recreación de glucosa y fructuosa al medio y un descenso en el contenido de ATP particularmente cuando se presenta el flujo glucolítico lento.

Se ha determinado la presencia de la G-6-Pasa en el testículo siendo su actividad más alta en las espermátides y espermátocitos primarios.

No se ha demostrado si en las espermátides y en los espermátocitos se presentan ciclos fútiles lo que explicaría la disminución de ATP cuando se incuban estas células con glucosa.

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar dos de las reacciones catalizadas por la glucosa-6-fosfatasa testicular: la reacción de fosfohidrolasa y la de pirofosfatasa en la fracción subcelular de testículo de rata inmadura enriquecida con esta actividad.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- a) Determinación de la termosensibilidad de la actividad de G-6-fosfohidrolasa y pirofosfatasa.
- b) Efecto de la preincubación de la enzima en ausencia de sustrato.
- c) Determinación del efecto de detergentes sobre las reacciones de G-6-fosfohidrolasa y pirofosfatasa de la glucosa-6-fosfatasa.
- d) Determinación de la especificidad de la G-6-Pasa testicular utilizando distintos sustratos fosforilados.

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar dos de las reacciones catalizadas por la glucosa-6-fosfatasa testicular: la reacción de fosfohidrolasa y la de pirofosfatasa en la fracción subcelular de testículo de rata inmadura enriquecida con esta actividad.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- a) Determinación de la termosensibilidad de la actividad de G-6-fosfohidrolasa y pirofosfatasa.
- b) Efecto de la preincubación de la enzima en ausencia de sustrato.
- c) Determinación del efecto de detergentes sobre las reacciones de G-6-fosfohidrolasa y pirofosfatasa de la glucosa-6-fosfatasa.
- d) Determinación de la especificidad de la G-6-Pasa testicular utilizando distintos sustratos fosforilados.

MATERIALES Y METODOS

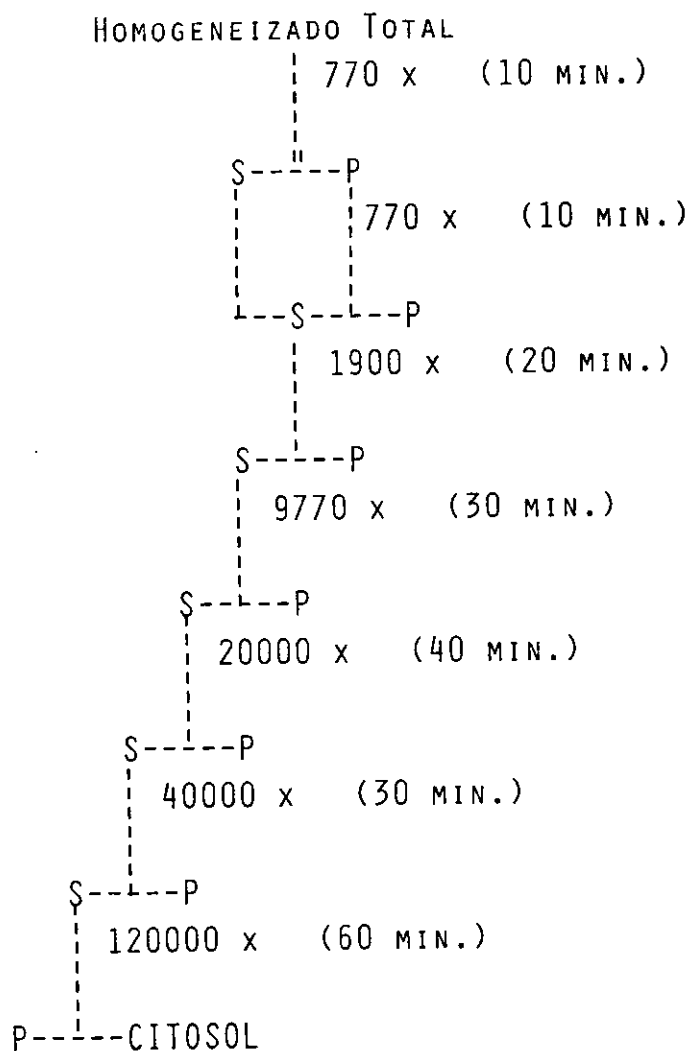
1) Obtención de Fracciones Subcelulares

Lotes de 10 ratas macho de la cepa Sprawe Dowley de 38 días de edad fueron sacrificadas por dislocación cervical; los testículos fueron extraídos y recibidos en solución salina isotónica (NaCl 154 mM y HEPES 20 mM) amortiguada a pH 7.2 y enfriada previamente a 4°C. Los testículos fueron liberados de la túnica albúginea y de los vasos sanguíneos que los irrigan, se enjuagaron y se secaron para ser pesados. Todo este procedimiento se realizó en el cuarto frío a 4°C para evitar la acción de enzimas proteolíticas. Una vez definido el peso de los testículos se preparó un homogeneizado al 10% (p/v) con medio de homogeneización (sacarosa 0.25 M, EDTA 1 mM, HEPES 20 mM) a pH 7.2 adicionado con inhibidor de tripsina de soya (100 ug/ml). Primero, el tejido fue finamente picado con tijeras en el seno de 10 ml del medio de homogeneización, posteriormente se adicionó el volumen del medio restante y se homogeneizó utilizando un homogeneizador Potter Elvehær con pistón flojo dando 5 golpes, después se empleó un pistón apretado dando 4 golpes más.

El homogeneizado fue centrifugado para obtener las distintas fracciones subcelulares siguiendo el esquema de la figura 2 (previamente establecido por Díaz y Trejo, 1994).

Las pastillas obtenidas a 9770, 20000 y 40000 x g se resuspendieron con 10 ml de KCl 154 mM y se centrifugaron a 40000 x g durante 40 min. a 4°C. El sobrenadante obtenido se desechó y las pastillas fueron resuspendidas en 10 ml de sacarosa 20 mM - imidazol 20 mM a pH 7.2, se dividieron en alícuotas de 2 ml y se congelaron con

FIGURA 2: ESQUEMA DE CENTRIFUGACION PARA LA OBTENCION DE FRACCIONES SUBCELULARES



Los sobrenadantes (S) fueron centrifugados de acuerdo al esquema para obtener distintas fracciones subcelulares contenidas en las pastillas (P), las cuales fueron almacenadas para posteriormente analizar su actividad de fosfohidrolasa y pirofosfatasa y obtener la fracción enriquecida con la enzima Glucosa-6-Fosfatasa.

nitrógeno líquido para ser almacenadas en un congelador REVCO a -75°C para su posterior utilización.

2) Determinación de la Glucosa-6-fosfatasa

2.1) Reacción de Fosfohidrolasa

La actividad de la G-6-Pasa en su reacción de glucosa-6-fosfohidrolasa fue determinada por triplicado, utilizando alícuotas de 100 μg de proteína. El medio de incubación empleado fue MES 50 mM - imidazol 137 mM a pH 6.5 en presencia o ausencia de CdI_2 2.5 mM (como inhibidor de la fosfatasa ácida contaminante). La actividad se inició por adición de glucosa-6-fosfato 25 mM e incubación a la temperatura correspondiente. La reacción se detuvo con 1 ml de HClO_4 al 6%. Las proteínas precipitadas se separaron por centrifugación a 3000 rpm x 15 min. a 4°C . El Pi liberado fue recuperado en el sobrenadante y se cuantificó por el método de Bonting y col., (1961) leyendo la absorbancia a 700 nm o por el método de Lanzeta y col., (1972) a 660 nm.

2.2) Reacción de Pirofosfatasa

La actividad de pirofosfatasa se midió tomando una alícuota de 100 μg de proteína de las fracciones membranales correspondientes, usando el medio empleado para determinar la actividad de glucosa-6-fosfohidrolasa, también se incluyó en el medio de incubación CdI_2 2.5 mM como inhibidor de fosfatasa ácida. La actividad se inicio por la adición de pirofosfato de sodio 5 mM e incubación a la

temperatura correspondiente y se detuvo por adición de 1 ml de HClO_4 al 6%. Para separar las proteínas precipitadas se centrifugó a 3000 rpm x 15 min. Del sobrenadante se tomó una alícuota de 1 ml y se adicionó 2 ml de reactivo de Bonting más 0.3 ml de citrato de sodio al 34% para estabilizar la reacción. La densidad óptica se determinó a 700 nm.

3) Tratamiento con Detergentes

3.1) Efectos de Detergentes Durante la Reacción Enzimática

Alícuotas de 50 μg de proteína fueron preincubadas en hielo por 10 min. con diferentes concentraciones de detergente. Las concentraciones de desoxicolato empleadas fueron de 0 a 800 μM . La concentración micelar crítica (CMC) para este detergente es de 0.9 mM a 0 $^\circ\text{C}$.

En el caso de Triton X-100 la actividad se determinó de 0 a 0.04% (p/v). Este detergente neutro tiene una CMC de 0.3 mM. Las concentraciones de CHAPS fueron de 0 a 80 μM y la CMC de este detergente es de 8mM. La reacción de glucosa-6-fosfohidrolasa o de pirofosfatasa se inicio por adición del sustrato (glucosa-6-fosfato 25 mM o pirofosfato de sodio 5 mM) y se incubó a distintas temperaturas (0, 20, 30, 37 $^\circ\text{C}$). Se utilizó el método de Lanzeta y col. (1972) para determinar el pi liberado durante la reacción.

3.2) Preincubación de las Vesículas Membranales con Diferentes Concentraciones de Desoxicolato y Determinación de la Actividad Enzimática a una Menor Concentración

Alícuotas de 200 ug de proteína fueron preincubadas en hielo 10 minutos en presencia de desoxicolato de sodio a las concentraciones antes mencionadas en una relación de detergente:proteína desde 30 ug:200 ug a 3 mg:0.0002 mg. después de la preincubación la muestra se agitó en un vortex y se tomaron alícuotas de 50 ug de proteína. Estas alícuotas fueron adicionadas a 0.4 ml de medio de incubación sin detergente y se determinó su actividad enzimática a 20 y 37 °C. La reacción se detuvo con 1 ml de HClO₄ al 6%, se centrifugó para separar las proteínas precipitadas y el Pi del sobrenadante se cuantificó por el método de Bonting y col. (1961).

3.3) Preincubación de la Fracción Membranal con Diferentes Concentraciones de Desoxicolato y Determinación Enzimática del Material Solubilizado y no solubilizado.

Aproximadamente 2 mg de proteína fueron preincubadas en 1 ml con distintas concentraciones de desoxicolato (0.01%, 0.1% y 1% p/v) durante 10 min. en hielo. Después se centrifugó a 3000 rpm durante 30 min. en una microcentrífuga, el material solubilizado por la acción del detergente se recuperó en el sobrenadante. La pastilla fue resuspendida en 1 ml de sacarosa 250 mM-imidazol 20 mM a pH 7.2. A cada una de las fracciones se les determinó el contenido de proteína por el método de Bradford (1976) antes de determinar la actividad enzimática. Para ello se tomaron alícuotas de 50 ug de proteínas que se adicionaron a 0.4 ml de medio de incubación. La actividad a 0, 20 y

5) Determinación del Pi Liberado Durante las Reacciones Enzimáticas

El Pi liberado se determinó por el método de Bonting y col. (1961) utilizando 2 ml de reactivo de Bonting (4 g de sulfato ferroso en 100 ml de una solución de H_2SO_4 al 1.15 N en molibdato de amonio al 1%) y 1 ml del sobrenadante obtenido después de adicionar $HClO_4$ 6%. se cuantificó midiendo la densidad óptica a 700 nm. Otra técnica utilizada fue el método de Lanzetta y col. (1972), para la determinación del Pi liberado se usaron 2 ml del reactivo de Lanzetta (reactivo de verde de malaquita), la determinación se realizó midiendo la absorbancia a 660 nm.

6) Determinación de Proteínas

La determinación de proteínas se realizó utilizando el método de Lowry modificado por Hartree (1972). Además se utilizó el método de Bradford (1976) (reactivo de azul de Coomassie) para determinar las proteínas de las distintas fracciones membranales.

RESULTADOS

1) Distribución Subcelular de la Glucosa-6-fosfatasa

1.1) Reacción de Glucosa-6-fosfohidrolasa

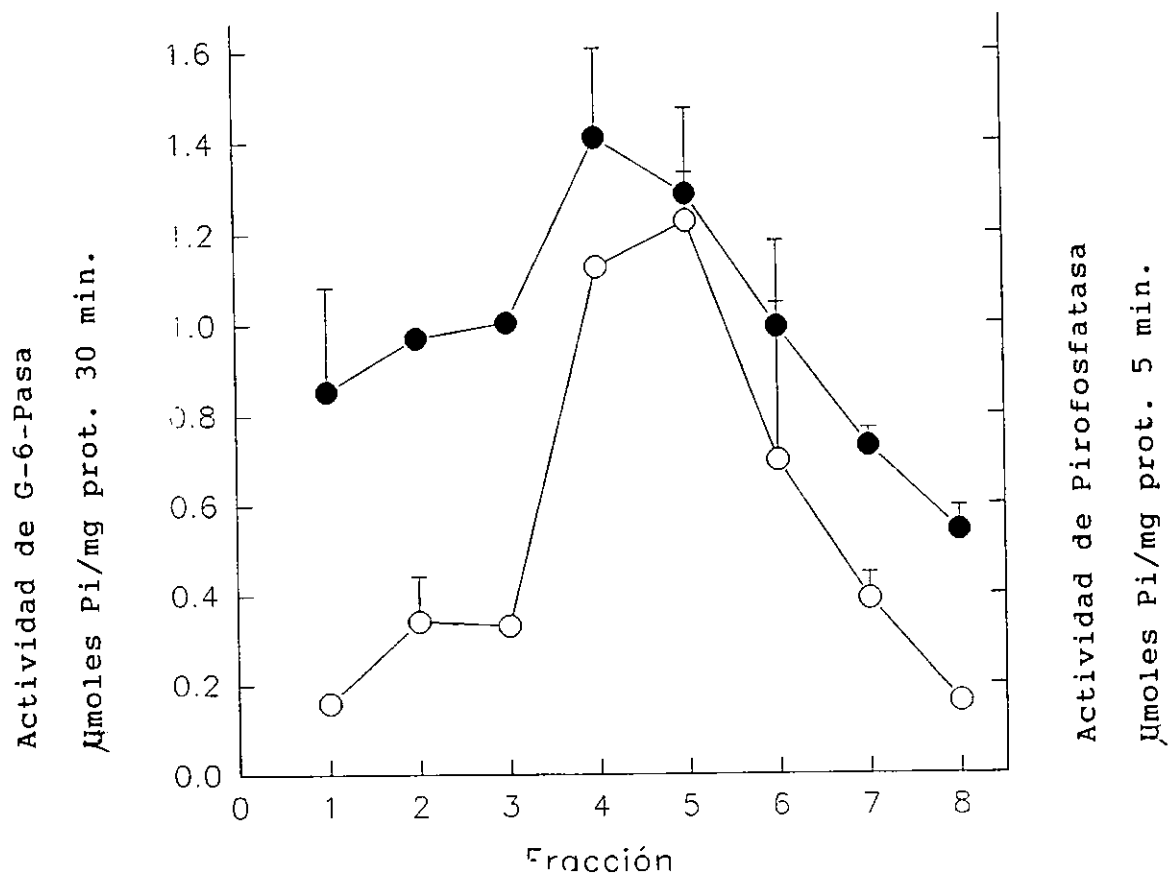
Utilizando las fracciones subcelulares obtenidas por centrifugación diferencial del homogeneizado total del testículo de rata de 38 días de edad se determinó la actividad de la glucosa-6-fosfohidrolasa a 37°C en presencia de CdI_2 2.5 mM para inhibir la actividad de fosfatasa ácida. Se observó que la actividad más alta se encontró en las fracciones obtenidas a 9770 (p4) y 20000 (p5) x g, mientras que en las demás fracciones la actividad fue menor (fig. 3).

1.2) Reacción de Pirofosfatasa

Las mismas fracciones subcelulares fueron analizadas para determinar la reacción de la pirofosfatasa eliminando la participación de la fosfatasa ácida con CdI_2 2.5 mM. Las fracciones de 9770 (p4) y 20000 (p5) x g mostraron los mayores niveles de actividad (fig. 3).

Al comparar la distribución subcelular de la actividad de pirofosfatasa en ausencia de Mg^{2+} y la actividad de glucosa-6-fosfohidrolasa, se observa que ambas presentan un perfil de distribución muy semejante. La actividad específica de la glucosa-6-fosfatasa es mayor en las fracciones de 9770 y 20000 x g. Sin embargo hay que hacer notar que las velocidades de reacción de hidrólisis de PPi es mucho más alta que la de hidrólisis de G-6-P. La cantidad de Pi liberada por la hidrólisis de PPi a los 5 min. es

FIGURA 3: DISTRIBUCION SUBCELULAR DE
GLUCOSA-6-FOSFOHIDROLASA Y PIROFOSFATASA



Promedio y desviación estandar de 3 experimentos por triplicado. Se muestra la actividad de fosfohidrolasa (O) y pirofosfatasa (●) en presencia de CdI_2 2.5 mM en las distintas fracciones obtenidas por centrifugación; las fracciones usadas son: Homogeneizado total de testículo de rata de 38 días de edad (1), 770 x g (2), 1 900 x g (3), 9 770 x g (4), 20 000 x g (5), 40 000 x g (6), 120 000 x g (7) y sobrenadante (8).

alcanzada solo después de 30 min. cuando el sustrato es glucosa-6-fosfato (fig. 3).

Observaciones descritas por otros autores (Delhumeau-Ongay y col., 1973) señalaron que esta enzima es muy activa por lo tanto se determinó a solo a tiempos cortos de 5 min.

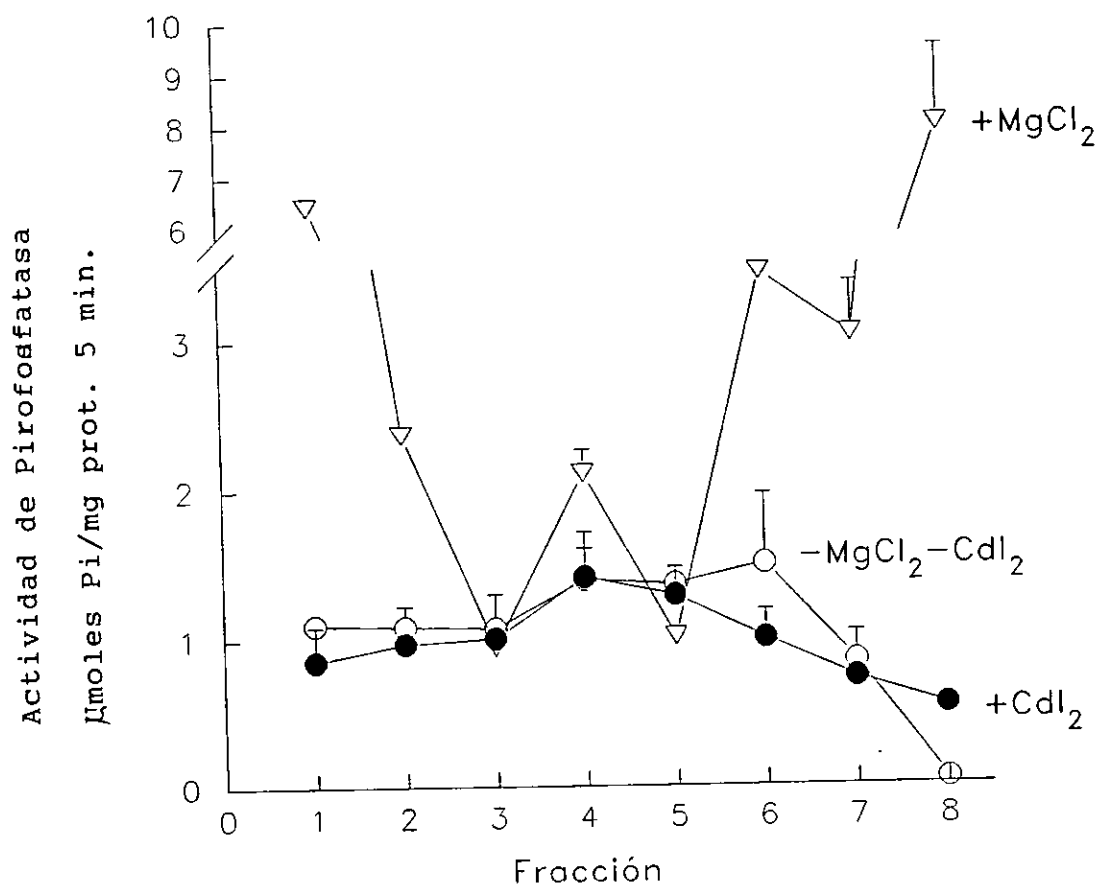
Para descartar si la actividad observada correspondía a la pirofosfatasa inorgánica dependiente de Mg^{2+} descrita por Delhumeau-Ongay y col., (1973) se estudio la distribución específica de la reacción de pirofosfatasa estimulada por $MgCl_2$. En estas condiciones se observó que la fracción mitocondrial (p2) y las dos fracciones membranales que sedimentan a 40000 (p6) y 120000 (p7) x g presentan una actividad alta (fig. 4).

El citosol presentó la actividad específica más alta y debido a que esta fracción representa el 26% de la proteína total, puede considerarse que la pirofosfatasa inorgánica dependiente de Mg^{2+} se localiza en la porción soluble del citoplasma (fig. 4).

En ausencia de CdI_2 no se observaron cambios en el nivel de actividad ni en la distribución subcelular (figura 4).

Estos resultados indican que la actividad de pirofosfatasa determinada en ausencia de $MgCl_2$ y en presencia de CdI_2 que se asocia a fracciones membranales que sedimentan a 9770 y 20000 x g no puede atribuirse a la actividad de pirofosfatasa inorgánica antes observada.

FIGURA 4: DISTRIBUCION SUBCELULAR DE PIROFOSFATASA



Los valores presentados son promedio con desviación estadar de 3 experimentos por triplicado. La figura muestra la actividad de G-6-Pirofosfatasa en distintas fracciones subcelulares en distintas condiciones (en presencia de MgCl₂, en presencia de CdI₂ y en ausencia de ambos compuestos). Las fracciones usadas son las siguientes: Homogeneizado total de testículo de rata de 38 días de edad (1), 770 x g (2), 1 900 x g (3), 9 770 x g (4), 20 000 x g (5), 40 000 x g (6), 120 000 x g (7) y sobrenadante (8).

2) Efecto de la Temperatura Sobre la Glucosa-6-Fosfatasa Testicular.

2.1) Reacción de la Glucosa-6-Fosfohidrolasa.

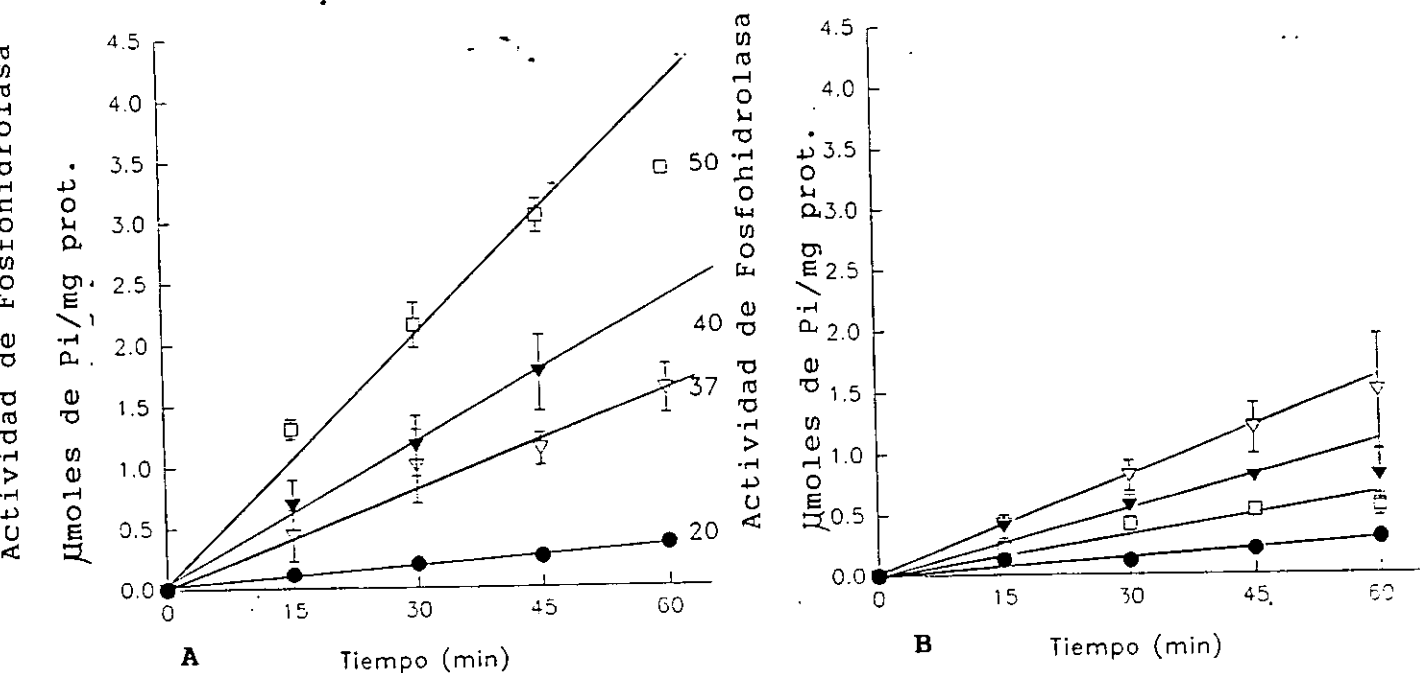
Se estudio el efecto de la temperatura de incubación sobre la reacción de fosfohidrolasa. Para ello la fracción membranal se incubó a 0, 20, 32, 37, 40, 45 y 50 °C tanto en presencia de CdI_2 2.5 mM como sin éste. La reacción de glucosa-6-fosfohidrolasa se mantuvo lineal hasta por 60 min. de incubación a temperaturas de 20, 37, 40 y 50 °C (figura 5A). La adición de CdI_2 2.5 mM no modificó la actividad a 20 y 37 °C, pero a 40 y 50°C produjo una disminución en el nivel y en el comportamiento de la enzima respecto al tiempo y perdio su linealidad despues de 30 min. (figura 5B).

En la gráfica de Arrhenius (figura 6) se puede observar que sin CdI_2 a medida que aumenta la temperatura de 20 a 40 °C la hidrólisis de glucosa-6-fosfato se increnta y alcanza un nivel que se mantiene a 50 °C. La adición de CdI_2 no modificó la estimulación por el aumento de la temperatura hasta 37 °C pero a temperaturas mayores se produjo una disminución abupta de la actividad hasta llegar a un nivel constante a 50 y 60 °C (figura 6).

Para distinguir si el cambio en el patrón de hidrólisis de la glucosa-6-fosfato en presencia y ausencia de CdI_2 se debia a la posible participación de la fosfatasa ácida contaminante de las fracciones usadas, se decidio estudiar el comportamiento de la fosfatasa ácida a diferentes temperaturas con y sin CdI_2 .

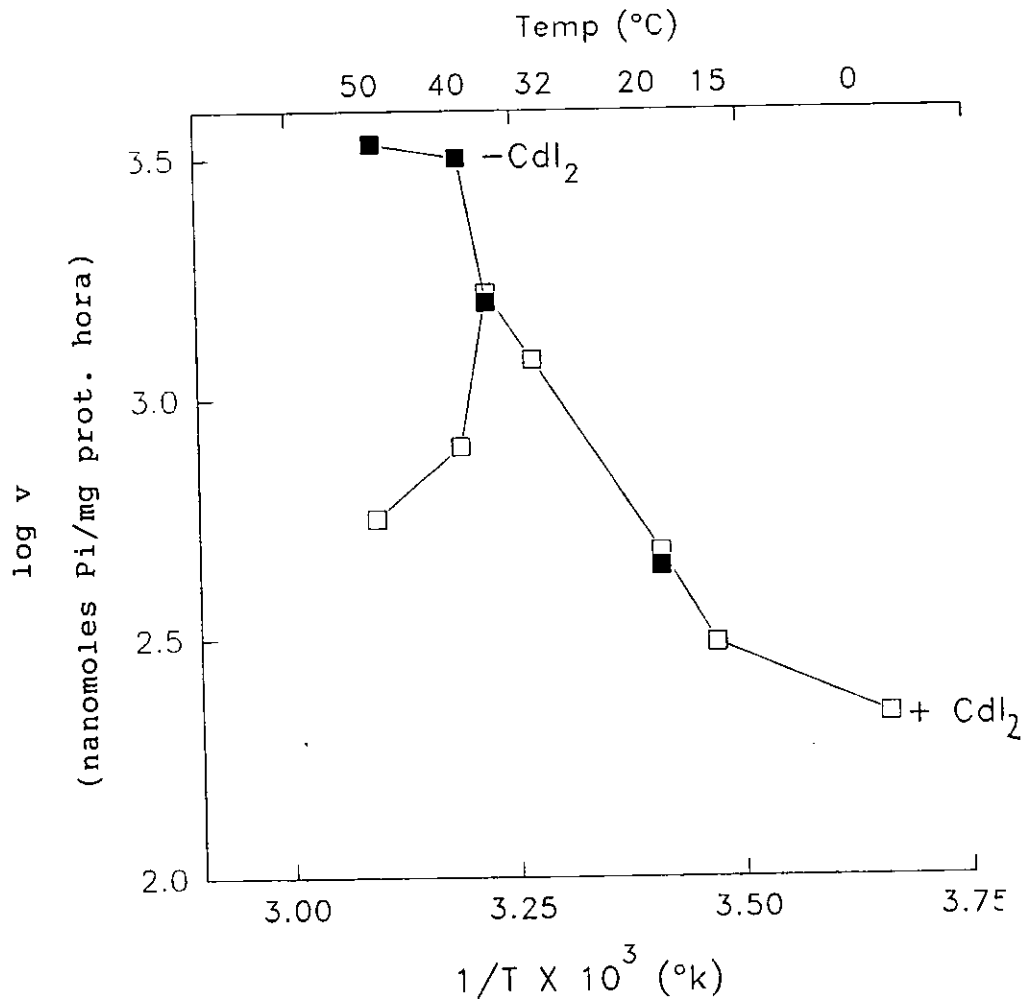
En ninguna de las 2 condiciones se presento un comportamiento bifásico de la actividad, en ausencia del inhibidor la actividad aumentó con una sola pendiente hasta 40 °C y en presencia de CdI_2 este

FIGURA 5: ACTIVIDAD DE GLUCOSA-6-FOSFOHIDROLASA
A DIFERENTES TEMPERATURAS



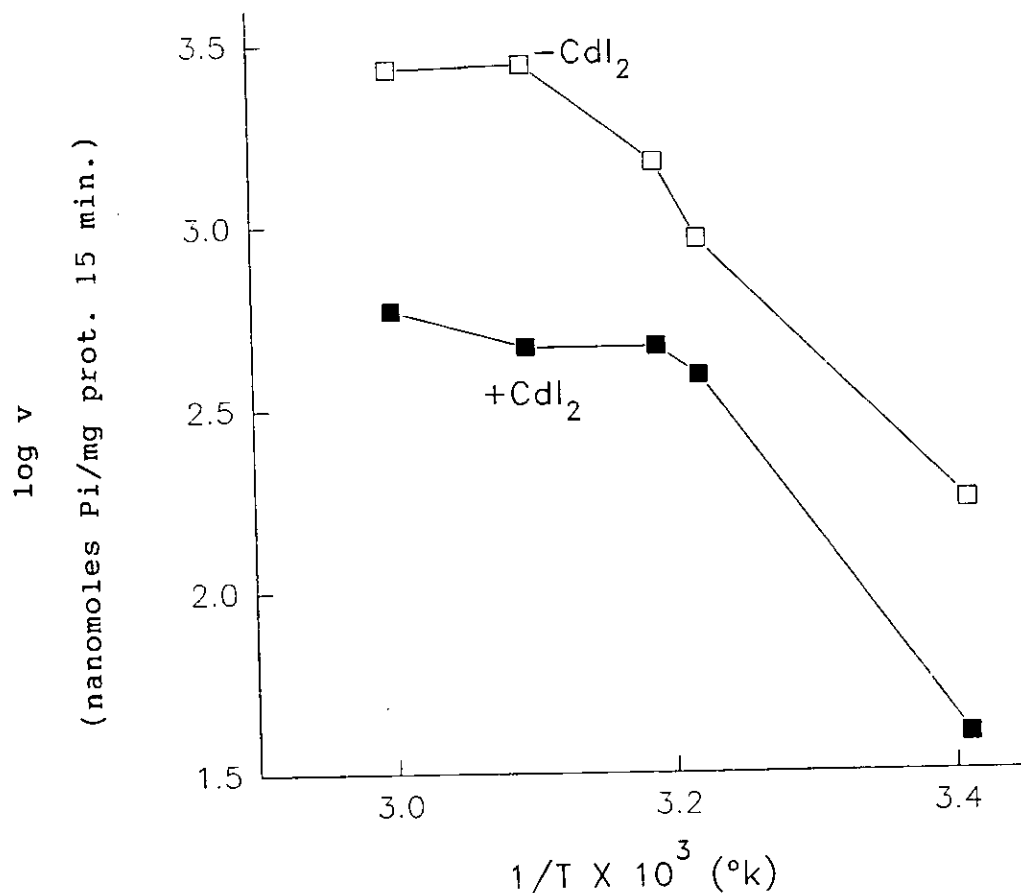
Actividad de G-6-Fosfohidrolasa a distintas temperaturas en ausencia de CdI₂ (figura A) y en presencia de CdI₂ 2.5 mM (figura B). Las condiciones experimentales de ambos experimentos son las siguientes: 100 µg de prot. fueron incubados en medio de incubación MES 50 mM-imidazol 137 mM, pH 6.5 y 25 mM de G-6-P. Los valores presentados son promedio con desviación estandar de 3 experimentos por triplicado.

FIGURA 6: GRAFICA DE ARRHENIUS DE LA ACTIVIDAD DE GLUCOSA-6-FOSFOHIDROLASA



Actividad de Glucosa-6-Fosfohidrolasa testicular a distintas temperaturas en presencia (□) o ausencia (■) de CdI₂. Los valores representan el promedio de 3 a 6 experimentos por triplicado medidos a una hora de actividad.

FIGURA 7: GRAFICA DE ARRHENIUS DE LA ACTIVIDAD DE FOSFATASA ACIDA



Actividad de fosfatasa ácida en la fracción usada para determinar G-6-Pasa. Se determinó la hidrólisis de p-nitrofenil fosfato a diferentes temperaturas (20, 37, 40, 50 y 60°C). La actividad fue determinada en presencia (■) o ausencia (□) de CdI₂ 2.5 mM; los valores presentados son el promedio de 3 experimentos por triplicado.

incremento solo se observó hasta 37 °C. a temperaturas mayores la actividad se mantuvo constante (figura 7).

El comportamiento de la glucosa-6-fosfohidrolasa y de la fosfatasa ácida a diferentes temperaturas en presencia de CdI_2 es claramente distinto. La hidrólisis de G-6-P en estas condiciones no puede ser atribuida a la fosfatasa ácida, ya que esta disminuye en presencia de CdI_2 .

2.2) Reacción de Pirofosfatasa

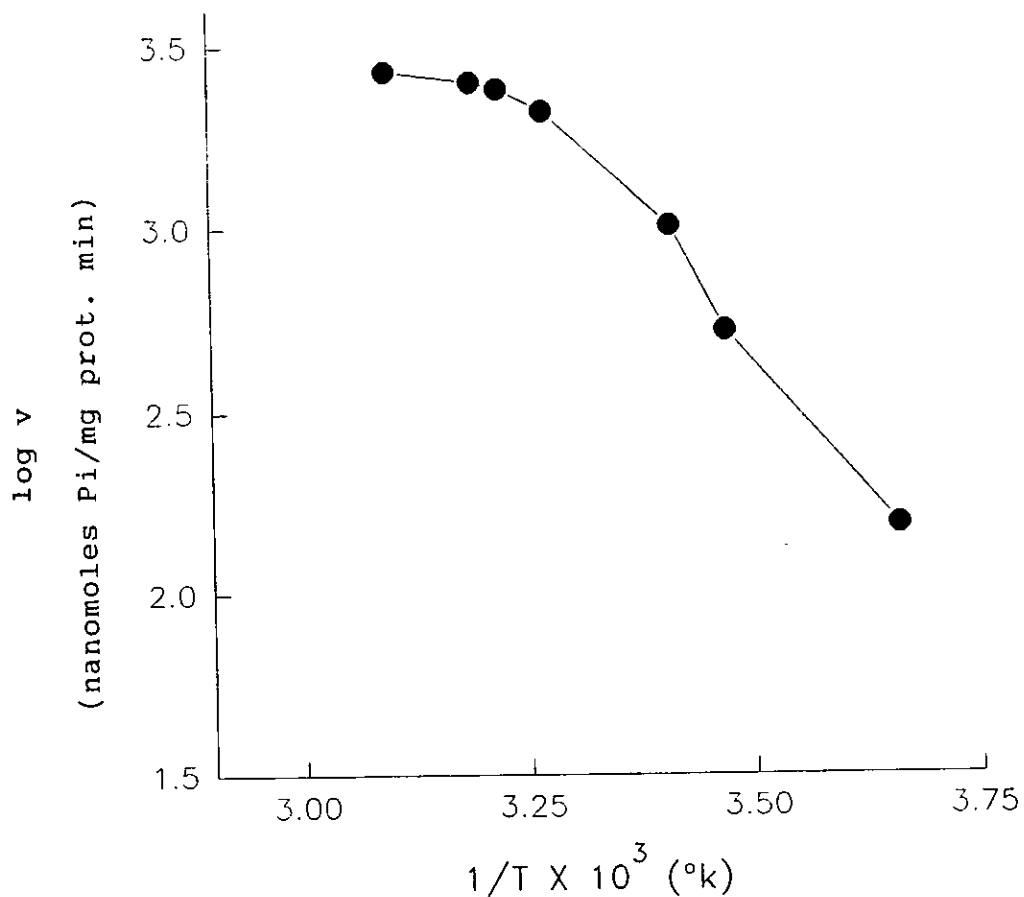
La reacción de pirofosfatasa catalizada por la glucosa-6-fosfatasa testicular en presencia de CdI_2 2.5 mM se incrementó a medida que se elevaba la temperatura de incubación de 20 °C a 37 °C. A temperaturas mayores de 40 y 50 °C se estabilizó (figura 8). Esta reacción presentó el comportamiento bifásico observado en la reacción de fosfohidrolasa y con mayor similitud a la fosfatasa ácida por la actividad mostrada; la actividad de la PPasa a 37 °C fue de 2.4 ± 0.016 y la de la fosfatasa ácida de 0.02 ± 0.01 umoles/mg prot.min. Esto equivale a una diferencia de 120 veces en el nivel de actividad entre la pirofosfatasa y la fosfatasa ácida.

3) Termoestabilidad de la Glucosa-6-Fosfatasa Testicular a 37 °C

3.1) Reacción de Glucosa-6-Fosfohidrolasa

Diaz y Trejo (1994) observaron que la actividad de la glucosa-6-fosfohidrolasa del testículo es lineal hasta 60 minutos de incubación a 37 °C. En el presente trabajo se confirmó dicho comportamiento y se demostró que con una concentración de sustrato de

FIGURA 8: GRAFICA DE ARRHENIUS DE LA ACTIVIDAD DE PIROFOSFATASA



Actividad de G-6-Pirofosfatasa en presencia de pirofosfato de sodio 10 mM más CdI_2 2.5 mM. La actividad se determinó a distintas temperaturas (0, 15, 20, 32, 37, 40 y $50^{\circ}C$). Los valores son el promedio de 3 experimentos con determinaciones por triplicado.

25 mM la actividad permanece lineal hasta por 2 horas de incubación. La adición de CdI_2 no afecto este comportamiento (figura 9). Estos resultados muestran que la glucosa-6-fosfatasa testicular no presenta inhibición gradual de su actividad por incubación a $37^{\circ}C$ en contraste con la inhibición reportada para la glucosa-6-fosfatasa hepática incubada a temperaturas mayores de $0^{\circ}C$ (Nordlie y Soodsma, 1966).

3.2) Reacción de Pirofosfatasa Testicular

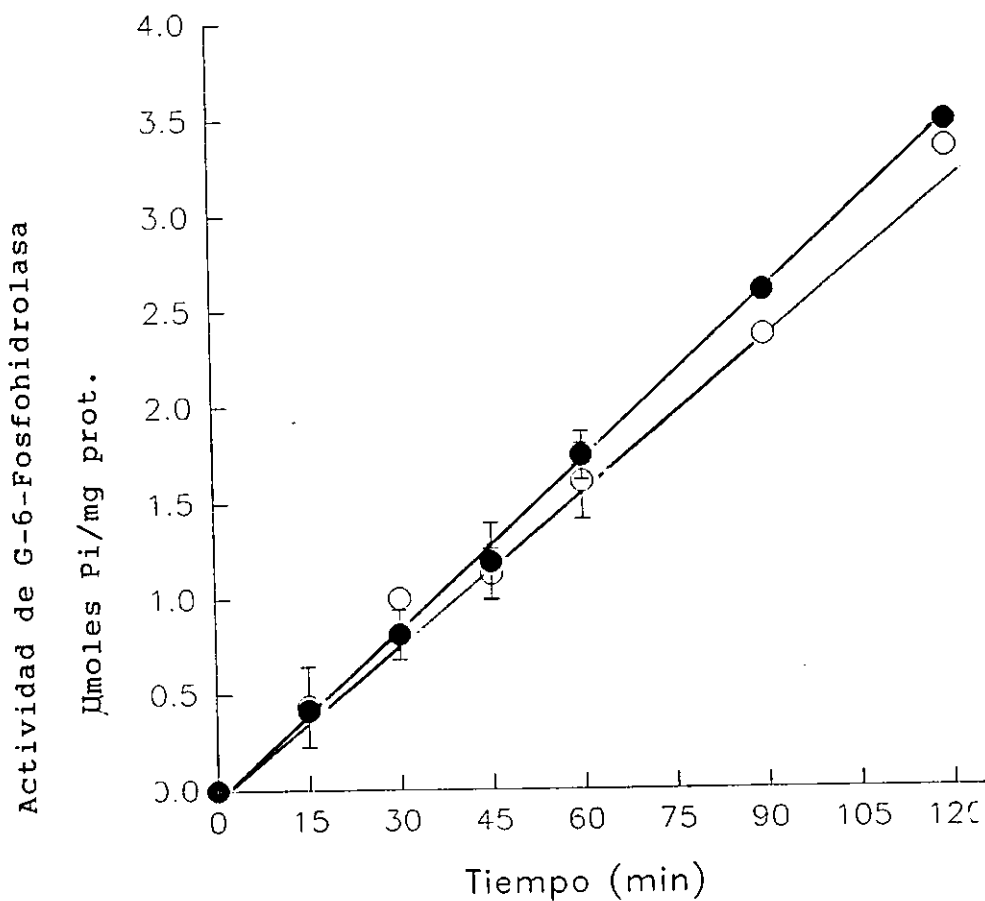
La alta actividad de pirofosfatasa del testículo con y sin CdI_2 no permitió estudiar su comportamiento por tiempos largos de incubación, sin embargo mantuvo una sola pendiente durante 15 min. (figura 10). Esta reacción fue inhibida en menos del 10% por la adición de CdI_2 .

3.3) Comparación de la Actividad de la Glucosa-6-Fosfatasa Testicular y Hepática en las Reacciones de Glucofosfohidrolasa y de Pirofosfatasa

Para determinar si las condiciones de incubación protegían a la enzima de la inhibición del aumento en la temperatura, se determinó la actividad de la glucosa-6-fosfatasa hepática en las mismas condiciones en que se midió a la enzima testicular.

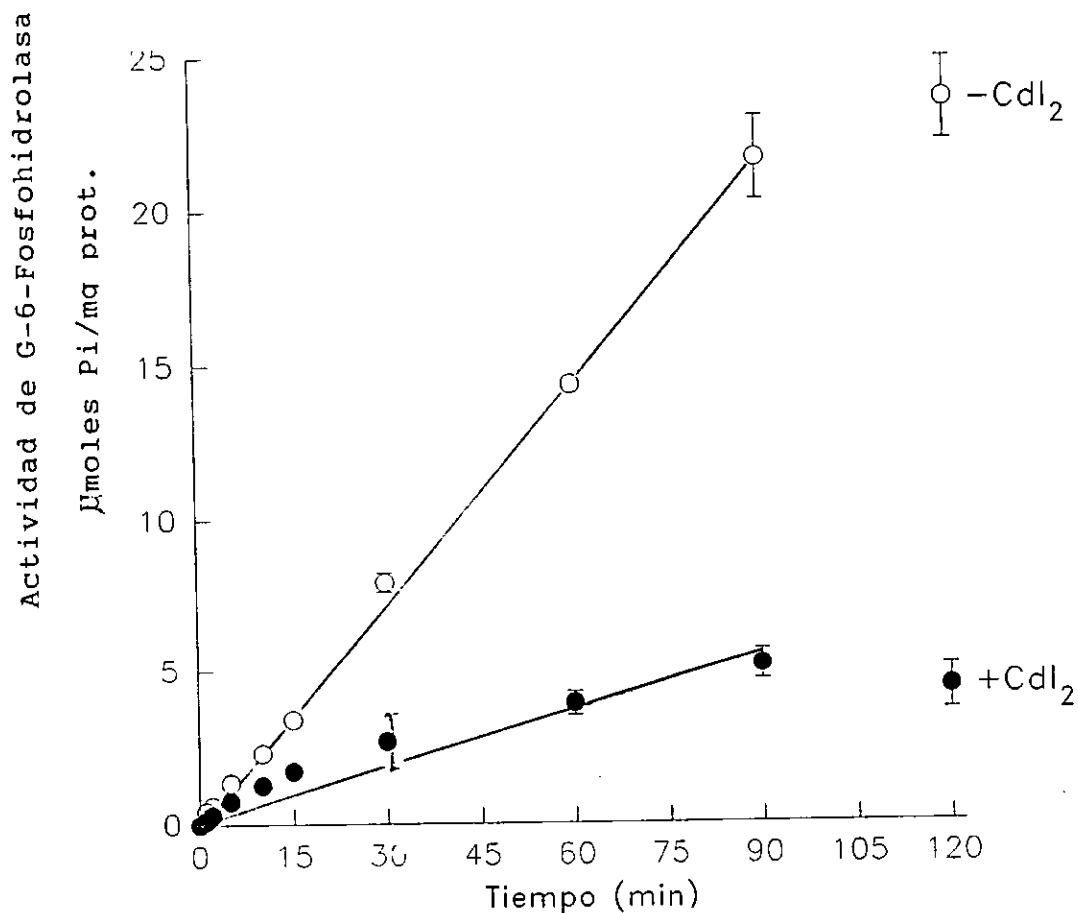
Se obtuvo la fracción membranal de 9770 x g de hígado de rata de 38 días de edad y se determinó el efecto del tiempo de incubación sobre la reacción de fosfohidrolasa. En ausencia de CdI_2 la hidrólisis de glucosa-6-fosfato fue lineal hasta 90 min. a $37^{\circ}C$ (figura 11). Sin embargo, la adición de CdI_2 si disminuyó la actividad de la enzima hepática observándose una inhibición del 85% a una hora de incubación

FIGURA 9: ACTIVIDAD DE GLUCOSA-6-FOSFOHIDROLASA A
37 °C



Termoestabilidad de la Glucosa-6-Fosfohidrolasa de testículo de rata de 38 días de edad a 37°C a distintos tiempos de incubación. La actividad se midió en presencia (○) o ausencia (●) de CdI₂ 2.5 mM, los valores son el promedio con desviación estandar de 3 experimentos por triplicado.

FIGURA 11: ACTIVIDAD DE GLUCOSA-6-FOSFOHIDROLASA DE HIGADO DE RATA DE 38 DIAS DE EDAD



Termoestabilidad de la Glucosa-6-Fosfohidrolasa de hígado de rata de 38 días de edad a distintos tiempos de incubación en presencia (●) o ausencia (○) de CdI₂ 2.5 mM. La actividad se midió con alícuotas de 100 ug de proteína e incubadas en medio MES 50 mM, imidazol 137 mM a pH 6.5, 25 mM de G-6-P. Los valores son promedio con desviación estadar de 3 experimentos por triplicado.

(figura 11).

En la tabla 1 se puede comparar las actividades de la glucosa-6-fosfatasa testicular y hepática en las 2 reacciones estudiadas. En ausencia de CdI_2 , la reacción de glucofosfohidrolasa de la enzima de hígado es 8 veces más activa que la enzima de testículo, mientras con 2.5 mM de CdI_2 su actividad es 4 veces mayor que la del testículo. En la reacción de pirofosfatasa la actividad del hígado no es muy diferente a la que presenta el testículo, tanto en presencia como en ausencia de CdI_2 , es muy interesante que las reacciones entre las velocidades de la glucosa-6-fosfohidrolasa/pirofosfatasa para la enzima hepática fue 2 y 1, en ausencia y presencia de CdI_2 respectivamente. En el caso de la enzima testicular esta relación alcanzó valores mucho más bajos, de 0.37 y 0.34 en las mismas condiciones. Esto puede sugerir que la enzima testicular hidroliza preferentemente PPI.

4) Tiempo de Decaimiento de la Reacción de Glucosa-6-Fosfohidrolasa Testicular

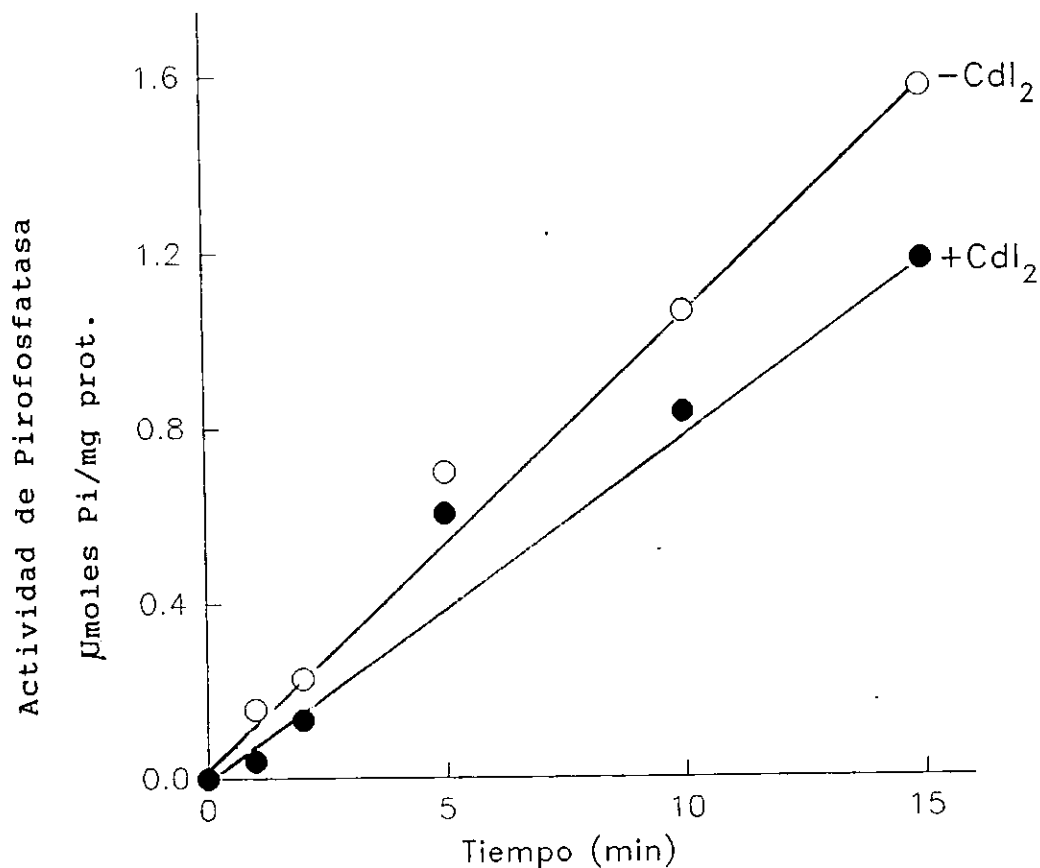
Para definir si la termoestabilidad de la glucosa-6-fosfatasa testicular se debía al efecto protector de altas concentraciones de glucosa-6-fosfato (25 mM), se decidió preincubar a la enzima a 37 °C en ausencia de sustrato por diferentes tiempos en presencia de CdI_2 . Los resultados de la figura 13 muestran que la actividad decae gradualmente en los primeros minutos de preincubación sin el sustrato, pero alcanza un nivel constante desde los 15 min. hasta los 60 min. de preincubación. La enzima preincubada 10 minutos sin el sustrato mostró una actividad 50% menor a la actividad de la enzima control, pero su

TABLA 1: COMPARACION DE LAS ACTIVIDADES DE FOSFOHIDROLASA Y PIROFOSFATASA DE HIGADO Y TESTICULO DE RATA DE 38 DIAS DE EDAD

GLUCOSA-6-FOSFOHIDROLASA (μ moles Pi mg prot. 15 min)		PIROFOSFATASA (μ moles Pi/mg prot. 15 min)	
HIGADO	TESTICULO	HIGADO	TESTICULO
Control 3.39 \pm 0.13	Control 0.436 \pm 0.21	Control 1.61 \pm 0.06	Control 1.17 \pm 0.04
+CdI ₂ 1.71 \pm 0.02	+CdI ₂ 0.416 \pm 0.039	+CdI ₂ 1.20 \pm 0.19	+CdI ₂ 0.92 \pm 0.11

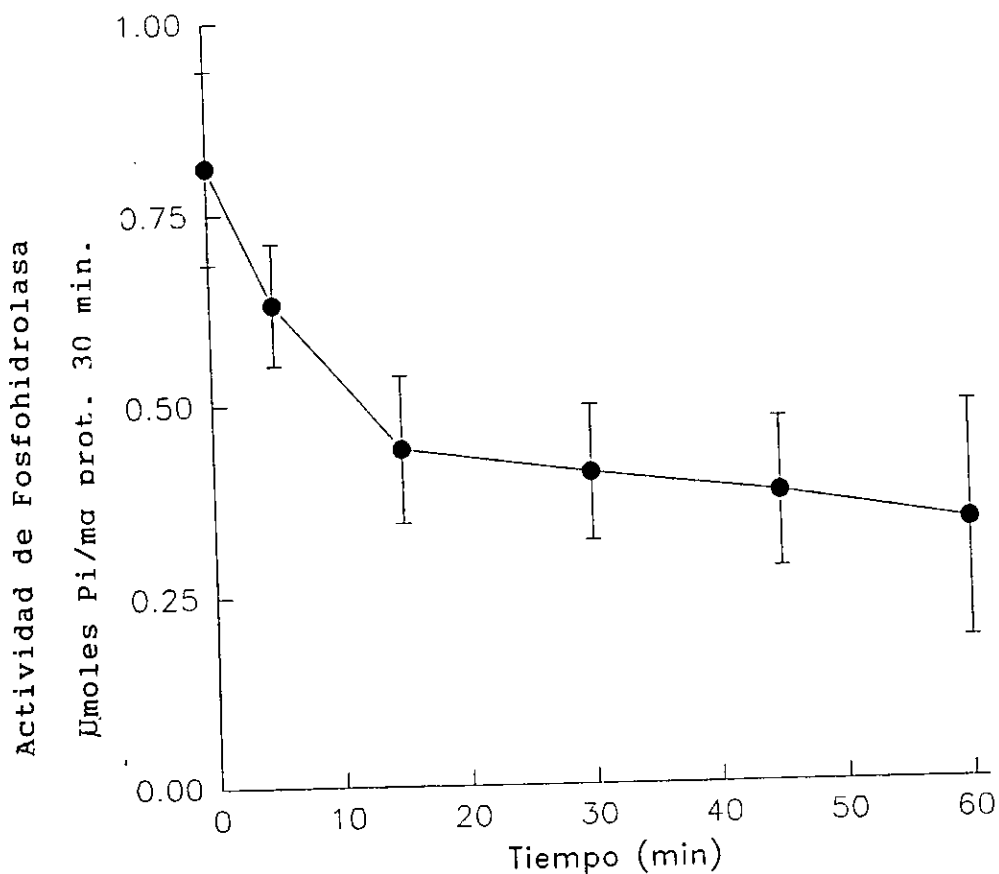
Tabla comparativa de las actividades de fosfohidrolasa y pirofosfatasa de las enzimas Glucosa-6-Fosfatasa de testículo e hígado de rata de 38 días de edad en presencia o ausencia de CdI₂ 2.5 mM. Las actividades de ambas enzimas fueron determinadas en las mismas condiciones experimentales.

FIGURA 12: ACTIVIDAD DE PIROFOSFATASA HEPATICA A 37°C



Termoestabilidad de la actividad de pirofosfatasa de la G-6-Pasa de hígado de rata de 38 días de edad a distintos tiempos de incubación en presencia (●) o ausencia (○) de CdI₂ 2.5 mM. La actividad se determinó con 100 ug de proteína en medio MES 50 mM, imidazol 137 mM pH 6.5 y 5 mM de pirofosfato de sodio. Los valores son promedio con desviación estandar de 3 experimentos por triplicado.

FIGURA 13: EFECTO DE LA PREINCUBACION EN AUSENCIA DE SUSTRATO SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA GLUCOSA-6-FOSFOHIDROLASA TESTICULAR



Actividad de Fosfohidrolasa de la enzima G-6-Pasa testicular preincubada en ausencia de sustrato a 37°C y en presencia de CdI₂ 2.5 mM por distintos tiempos. La actividad se inicio al adicionar 25 mM de G-6-P y se continuó la incubación por 30 min. más a la misma temperatura. Los valores representan el promedio de 3 experimentos con desviación estandar por triplicado.

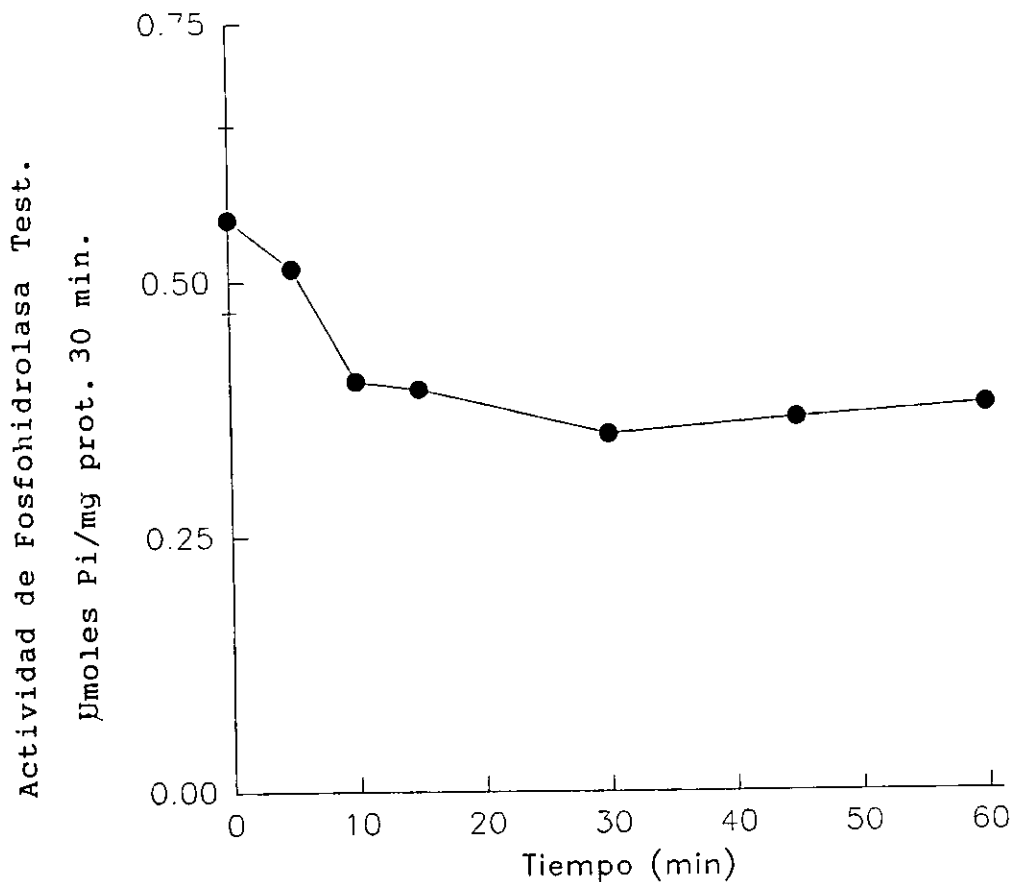
comportamiento siguió siendo lineal hasta por 60 minutos de incubación a 37°C (figura 14). Estos resultados sugieren que cuando se preincuba sin sustrato la enzima alcanza un estado estable de menor actividad.

Para determinar si la temperatura también afectaba el nivel de actividad alcanzado por la enzima preincubada sin sustrato se decidió estudiar el efecto de la preincubación a 40 °C. A esta temperatura la preincubación sin sustrato no modificó el patrón de distribución de la actividad y el nivel de actividad alcanzado a 37 y a 40 °C fue muy semejante (figura 15). Sin embargo al preincubar sin sustrato a la enzima a 50 °C no se observaron modificaciones en la actividad a distintos tiempos de preincubación (no se muestran los datos en esta tesis). Estos resultados sugieren que la enzima testicular puede alcanzar un nivel estable con menor actividad ya sea por incubación a altas temperaturas o por preincubación en ausencia de sustrato.

Para descartar el efecto de CdI_2 sobre el sistema transportador de glucosa-6-fosfato y/o la enzima directamente se decidió estudiar el efecto de la preincubación a 37 °C sin sustrato en un medio carente de CdI_2 . A diferencia del resultado obtenido con CdI_2 (figura 13), la preincubación de la enzima sin sustrato en ausencia de CdI_2 no produjo una disminución en la actividad a pesar de haber sido preincubada a tiempos largos de hasta 60 min. (figura 16).

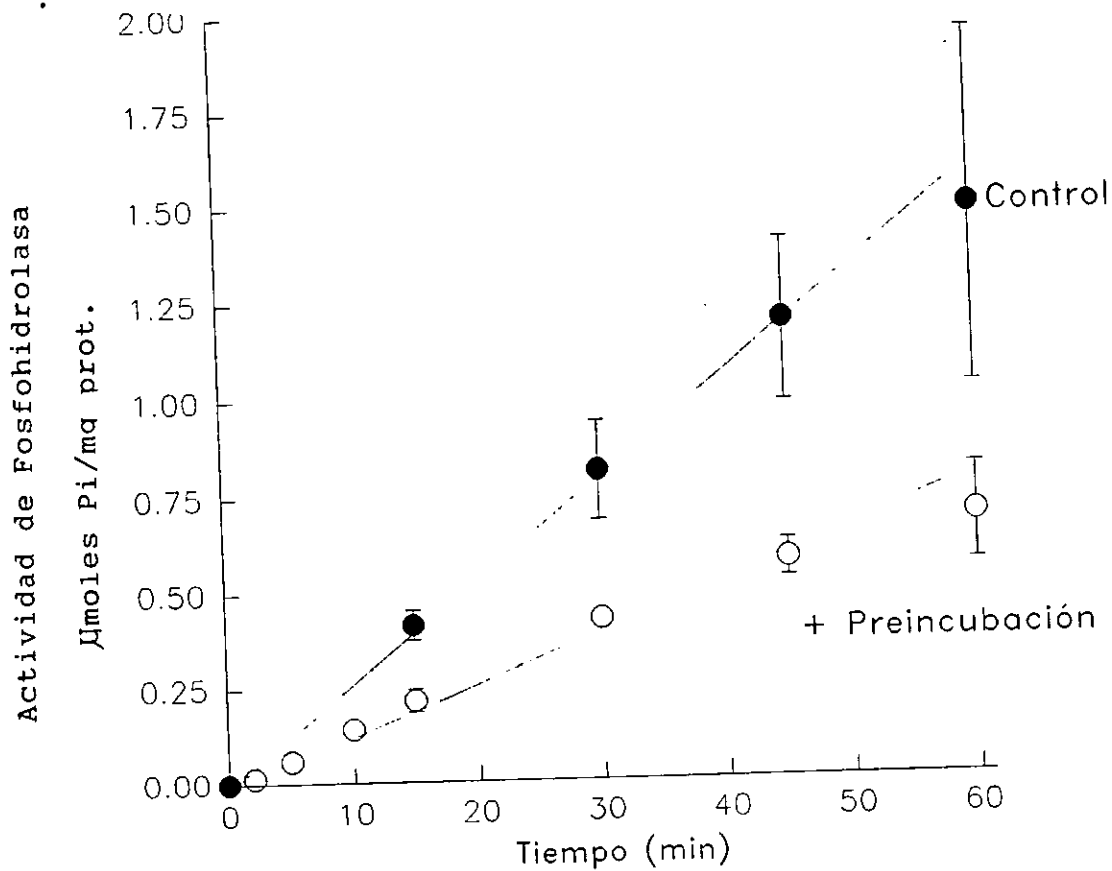
Estos resultados parecen indicar que el CdI_2 es responsable de la disminución de la actividad de la enzima preincubada en ausencia de sustrato. Sin embargo no se estudió el efecto de la preincubación sin CdI_2 a otras temperaturas.

FIGURA 14: EFECTO DE LA PREINCUBACION EN AUSENCIA DE SUSTRATO SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA GLUCOSA-6-FOSFOHIDROLASA A 40°C



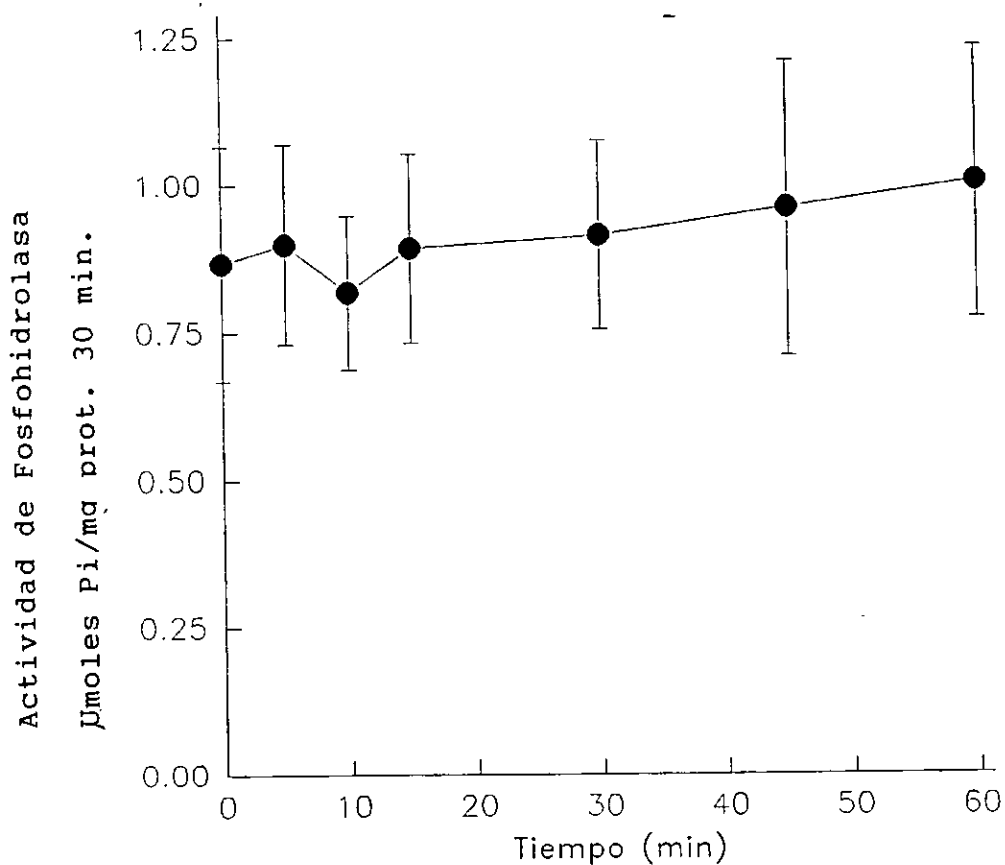
Actividad de Fosfohidrolasa de la enzima G-6-Pasa testicular preincubada en ausencia de sustrato a 37°C y en presencia de CdI_2 2.5 mM por distintos tiempos. La actividad se inicio al adicionar 25 mM de G-6-P y se continuó la incubación por 30 min. más a la misma temperatura. Los valores representan el promedio de 3 experimentos con desviación estandar por triplicado.

FIGURA 15: EFECTO DE LA PREINCUBACION EN AUSENCIA DE SUSTRATO SOBRE LA ACTIVIDAD DE GLUCOSA-6-FOSFOHIDROLASA TESTICULAR



Actividad de Fosfohidrolasa de la G-6-Pasa testicular preincubada 10 min. a 37°C en ausencia de sustrato y en presencia de CdI_2 2.5 mM e incubadas por distintos tiempos a la misma temperatura con 25 mM de G-6-P. Los valores son promedio con desviación estandar de 3 experimentos por triplicado.

FIGURA 16: EFECTO DE LA PREINCUBACION EN AUSENCIA DE SUSTRATO Y SIN CdI_2 SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA GLUCOSA-6-FOSFOHIDROLASA TESTICULAR



Actividad de fosfohidrolasa de la enzima G-6-Pasa testicular preincubada 10 min. sin sustrato y sin CdI_2 a 37°C en distintos tiempos, la actividad fue iniciada por adición de G-6-P 25 mM durante 30 min. Los valores son promedio con desviación estandar de 3 experimentos por triplicado.

5) Latencia de la Glucosa-6-Fosfatasa Testicular

5.1) Efecto de Detergente Sobre la Reacción de Glucosa-6-Fosfatasa

Para definir la latencia de glucosa-6-fosfatasa testicular se determinaron las reacciones de fosfohidrolasa y pirofosfatasa a diferentes temperaturas con distintas concentraciones y tipos de detergente.

A) Efecto del Detergente Sobre la G-6-Fosfohidrolasa Durante la Reacción Enzimática a 37 °C

Efecto del Tritón X-100

El Tritón X-100 es un detergente no iónico cuya concentración micelar crítica es 0.240 mM (Lichtemberg y col. 1983) su inclusión en el medio de incubación a concentraciones de 13.78 a 55 uM produjo una disminución gradual de la actividad alcanzando una inhibición del 43% a una concentración de 55 uM (figura 17).

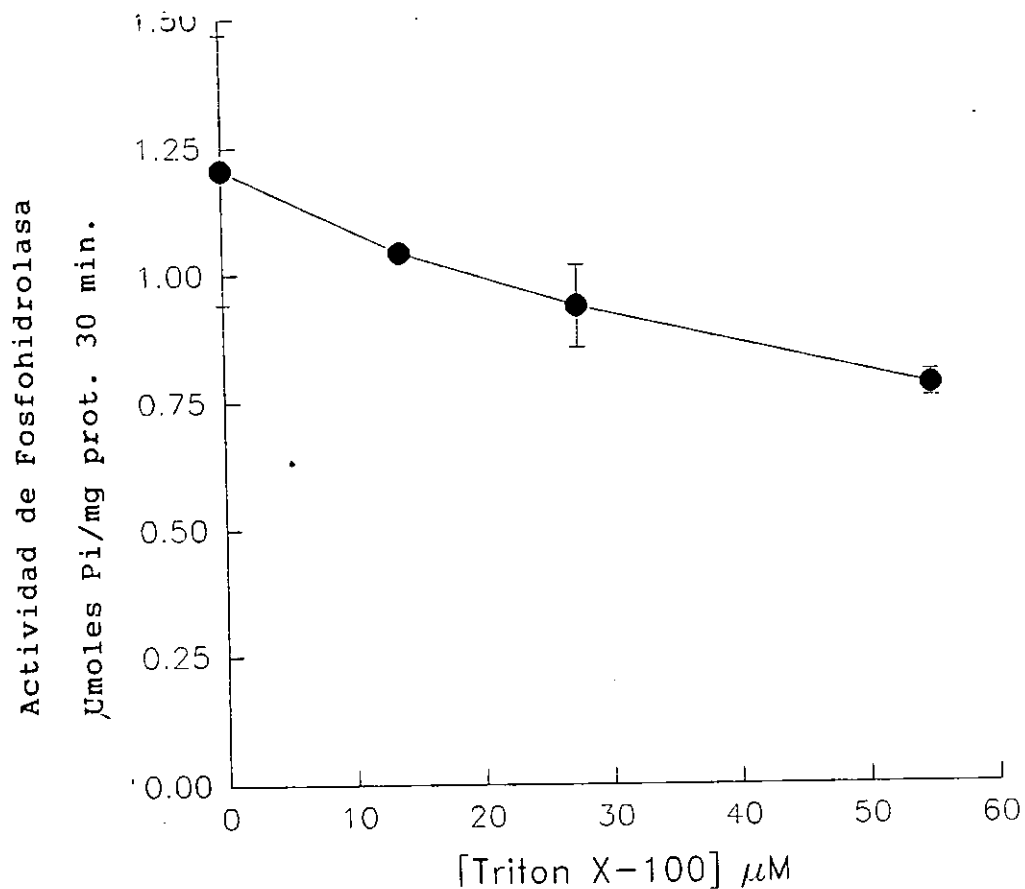
Los datos de las concentraciones usadas y de la relación proteína/detergente en cada caso se presenta en la tabla 2, la cual muestra una relación menor a la utilizada para activar a la enzima hepática.

Efecto del Detergente zwitteriónico o anfifílico CHAPS

El caso del detergente anfifílico CHAPS a diferentes concentraciones produjo una disminución de la glucosa-6-fosfohidrolasa, que no se modificó por la presencia o ausencia de CdI_2 (figura 18).

Este detergente fue usado en un rango de concentración que iba de 0.25 uM a 768 uM y la relación proteína/detergente en cada caso se presenta en la tabla 3, esta relación al igual que en el caso del Triton X-100 quedó por debajo de la relación utilizada por Watts y

FIGURA 17: EFECTO DE TRITON-X-100 SOBRE LA REACCION DE GLUCOSA-6-FOSFOHIDROLASA A 37°C



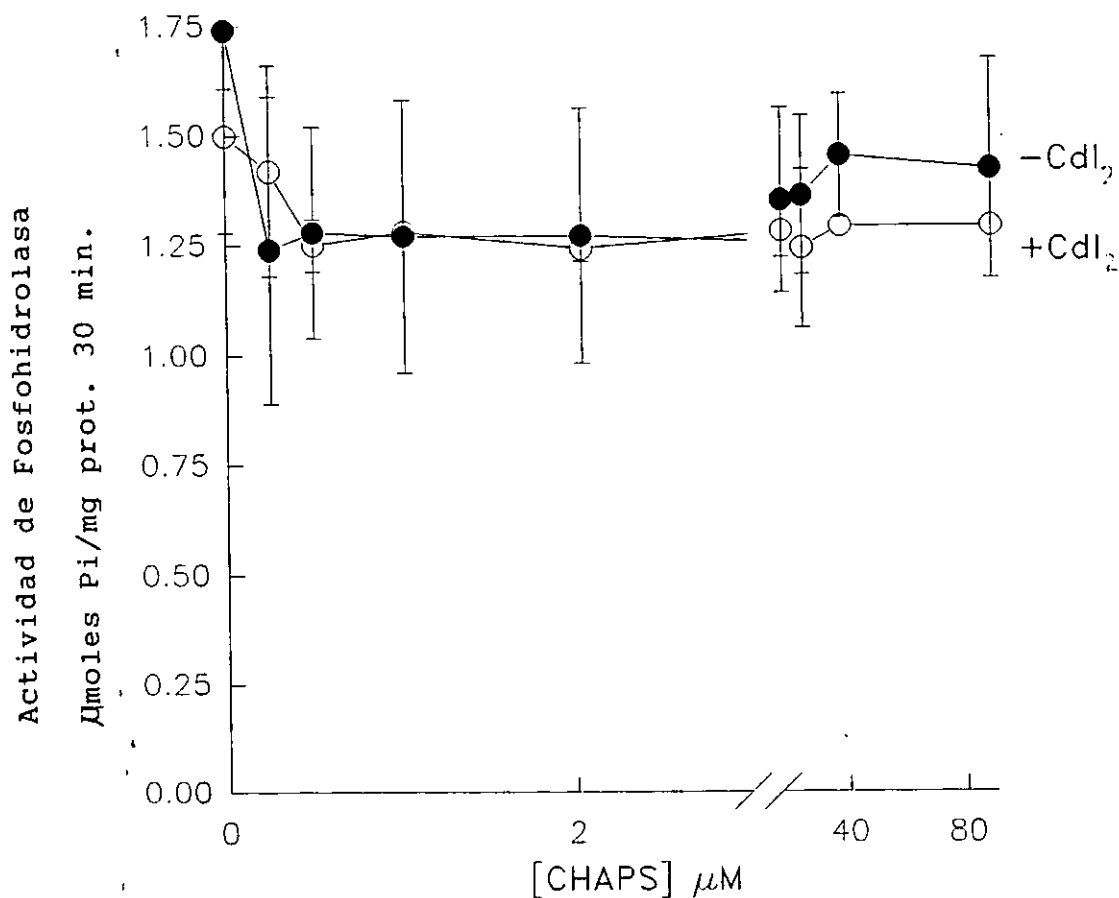
Actividad de G-6-Fosfohidrolasa testicular en presencia de distintas concentraciones de Tritón-X-100 preincubado 10 min. a 0°C sin sustrato, la actividad se inicio al adicionar G-6-P 25 mM al medio con detergente y 50 ug de proteína, después de 30 minutos de actividad se detuvo y cuantifico el Pi liberado. Los valores presentados son promedio con desviación estandar de 3 experimentos por triplicado.

TABLA 2: CONCENTRACIONES DE TRITON-X-100 Y SU RELACION CON PROTEINA

Concentración (μM)	Detergente (μg)	proteina/detergente
13.78	4.36	11.54
27.5	8.66	5.77
55	17.3	2.89

Las concentraciones de Tritón-X-100 son las utilizadas para determinar la latencia de la G-6-Pasa testicular. Se muestra la relación de proteína/detergente presente en cada concentración. Las concentraciones de detergente usadas son menores a la concentración micelar crítica (CMC) la cual es 0.3 mM.

FIGURA 18: EFECTO DE CHAPS SOBRE LA REACCION DE
GLUCOSA-6-FOSFOHIDROLASA A 37°C



Actividad de G-6-Fosfohidrolasa testicular en presencia de distintas concentraciones de detergente CHAPS preincubados 10 min. a 0°C en ausencia de sustrato, la preincubación se realizó en presencia (○) o ausencia (●) de CdI_2 2.5 mM. La actividad se inicio al adicionar 25 mM de G-6-P al medio con detergente y 50 μg de proteína testicular. Los valores son promedio de 3 experimentos por triplicado.

TABLA 3: CONCENTRACIONES DE CHAPS Y SU RELACION CON PROTEINA

Concentración (μM)	Detergente en 0.3 ml (μg)	proteina/detergente
0.25	0.05	1000
0.51	0.1	500
1.02	0.2	250
2.04	0.4	125
6.40	1.25	40
17.9	3.5	14.28
38	7.5	6.66
89.6	17.5	2.82
195	37.5	1.33
384	75	0.66
768	150	0.33

Las concentraciones de CHAPS son las utilizadas para determinar la latencia de la G-6-Pasa testicular, estas concentraciones se usaron incubando la proteína en el medio de incubación con detergente a 0°. Se muestra la relación de proteína/detergente presente en cada concentración usada. El detergente usado es menor a la concentración micelar crítica (CMC) la cual es 8 mM.

Faraj (1990) para activar a la enzima hepática.

Efecto del Desoxicolato

Se estudio el efecto de diferentes concentraciones de desoxicolato de sodio durante la reacción enzimática (de 7.7 a 770 μM) en presencia y ausencia de CdI_2 2.5 mM. La tabla 4 resume la relación proteína/detergente en cada una de las concentraciones usadas, estas relaciones iban desde rangos inferiores hasta rangos superiores a las utilizadas por Schuelze y col. (1985). El desoxicolato de sodio es un detergente aniónico con una concentración micelar crítica a 0 °C de 5 mM (Lichtemberg y col. 1983). A 0 y 20 °C no se observó aumento en la actividad de la glucosa-6-fosfohidrolasa tanto en presencia como en ausencia de CdI_2 (figura 19 y 20). A 37 °C sin CdI_2 si se observó un incremento del 44% en la hidrólisis de G-6-P (figura 19).

El aumento de la actividad por adición del detergente es equivalente a la latencia de glucosa-6-fosfatasa testicular, que alcanzó por lo tanto el 44%. Este incremento se alcanzó desde una concentración de 7.7 μM y se mantuvo constante hasta 385 μM del detergente (figura 19). La relación proteína/detergente en este rango de concentraciones alcanzó valores de 50 a 1.

Un hallazgo muy importante fue observar que en presencia de CdI_2 2.5 mM el desoxicolato produjo una inhibición en la actividad dependiente de la concentración de detergente empleada llegando a un valor de 43% (figura 20).

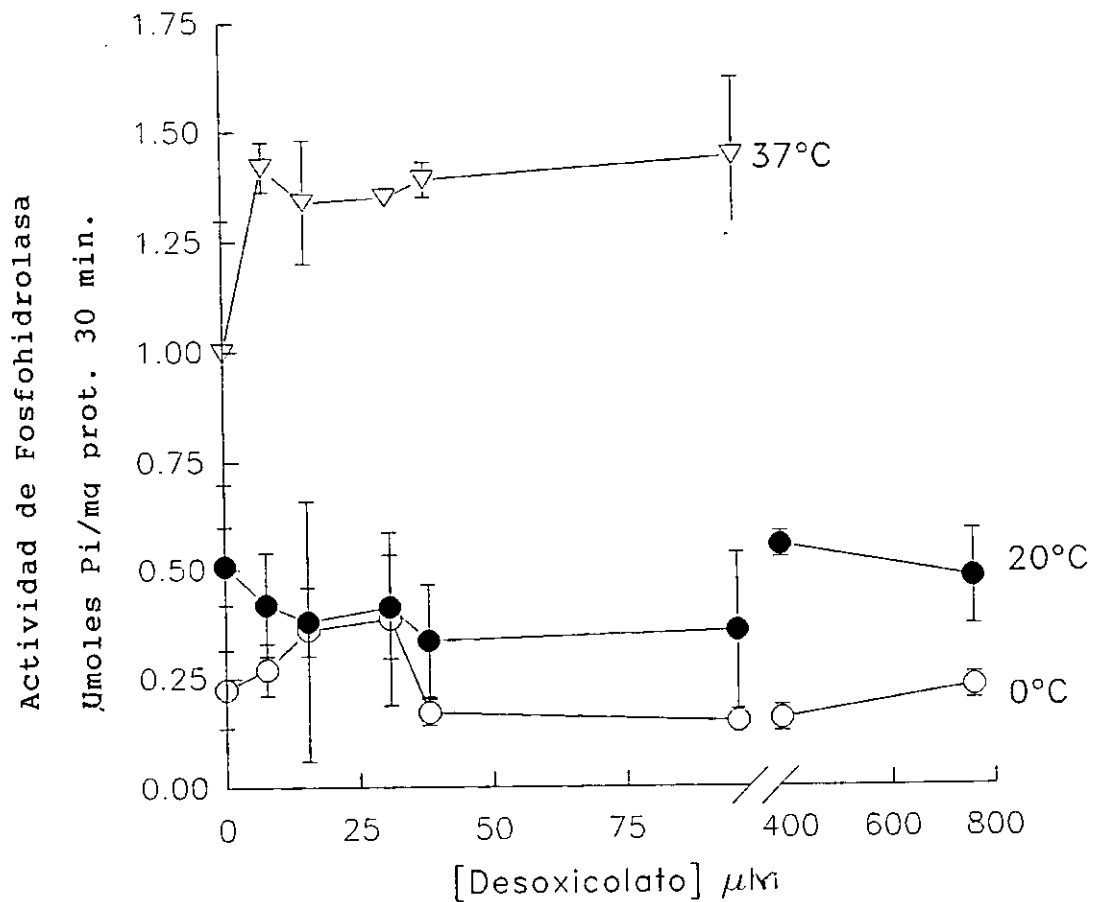
Comparando las relaciones de proteína/detergente (CHAPS, Tritón X-100 y desoxicolato) se observa que aun teniendo relaciones de proteína/detergente muy altas o muy bajas la actividad enzimática se ve disminuida.

TABLA 4: CONCENTRACIONES DE DESOXICOLATO DE SODIO Y
SU RELACION CON PROTEINA

Concentración (μM)	Detergente en 0.3ml (μg)	proteina/detergente
7.7	1	50
15.4	2	25
30.8	4	12.5
38	5	10
96	12	4.16
192	25	2
385	50	1
770	100	0.5

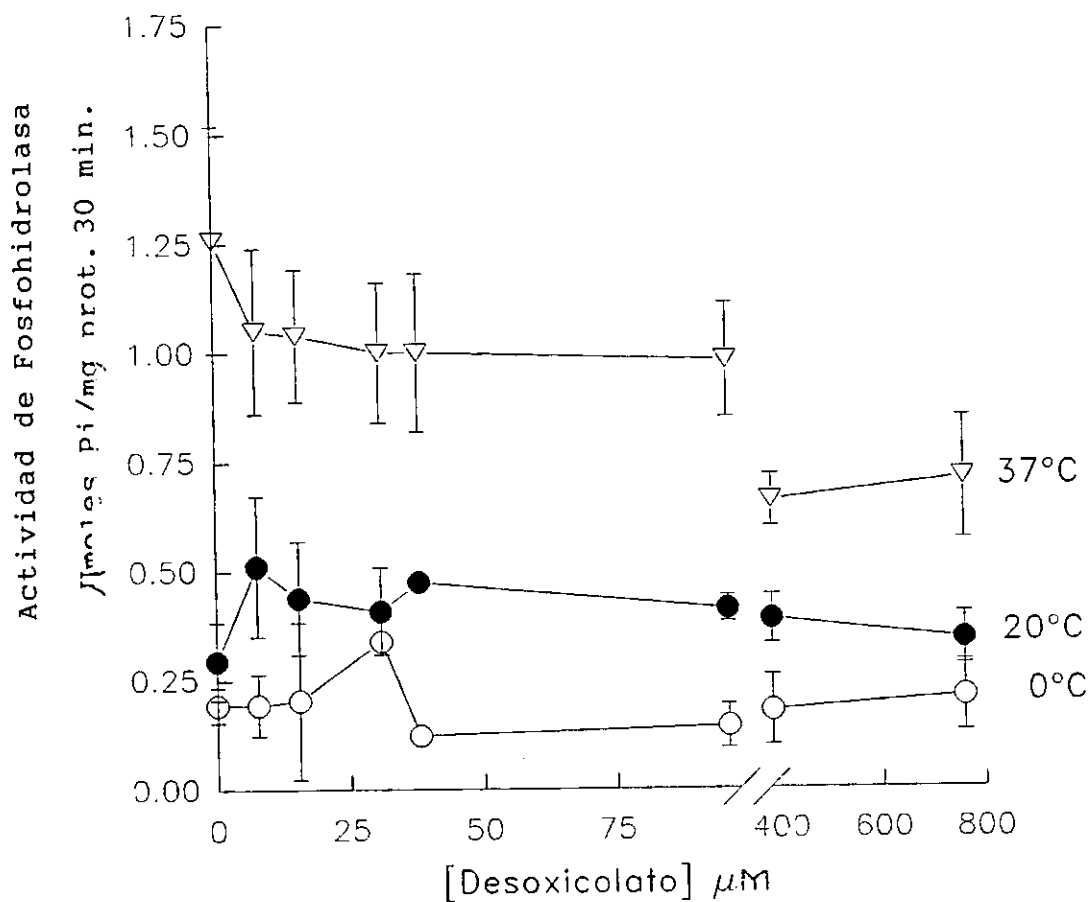
Las concentraciones de Desoxicolato de sodio son las utilizadas para determinar la latencia de la G-6-Pasa testicular, estas concentraciones se usaron incubando la proteína con detergente en el medio de incubación a 0°. Se muestra la relación de proteína/detergente usada en cada concentración. Las concentraciones de desoxicolato usadas es menor a la concentración micelar crítica (CMC) reportada la cual es 0.9 mM.

FIGURA 19: EFECTO DE DESOXICOLATO SOBRE LA REACCION DE GLUCOSA-6-FOSFOHIDROLASA A DIFERENTES TEMPERATURAS SIN CaI_2



Actividad de G-6-Fosfohidrolasa testicular en presencia de distintas concentraciones de desoxicolato de sodio preincubados 10 min. a 0°. en ausencia de sustrato y en ausencia de CaI_2 . La actividad se inició al adicionar 25 mM de G-6-P al medio con detergente y proteína microsomal, la incubación se realizó a diferentes temperaturas por 30 min.. Los valores son promedio con desviación estandar de 3 experimentos por triplicado.

FIGURA 20: EFECTO DE DESOXICOLATO SOBRE LA REACCION DE GLUCOSA-6-FOSFOHIDROLASA A DIFERENTES TEMPERATURAS CON CaI_2



Actividad de G-6-Fosfohidrolasa testicular en presencia de distintas concentraciones de desoxicolato de sodio preincubados 10 min. a 0°, en ausencia de sustrato y en presencia de CdI_2 . La actividad se inició al adicionar 25 mM de G-6-P al medio con detergente y proteína microsomal, la actividad fue determinada a diferentes temperaturas por 30 min.. Los valores son promedio con desviación estandar de 3 experimentos por triplicado.

Efecto del Desoxicolato Sobre la Reacción de Pirofosfatasa

En presencia de CdI_2 la adición de desoxicolato a diferentes concentraciones no estimuló la hidrólisis de PPI a ninguna de las 4 temperaturas ensayadas (0, 20, 32 y 37 °C), (figura 21).

B) Efecto de la Preincubación con el Detergente

Para asegurar la acción del detergente se decidió preincubar las vesículas membranales a 0 °C con distintas concentraciones de desoxicolato que iban desde 0.516 hasta 63 μM utilizando 600 μg de proteína y tomando alícuotas de 100 μg para el ensayo enzimático. La reacción de glucosa-6-fosfohidrolasa fue determinada a 20 y 37 °C con y sin CdI_2 2.5 mM. A 20 °C en ausencia de CdI_2 se observó un incremento del 5% que se mantuvo desde 0.8 hasta 60 μM (figura 22 A).

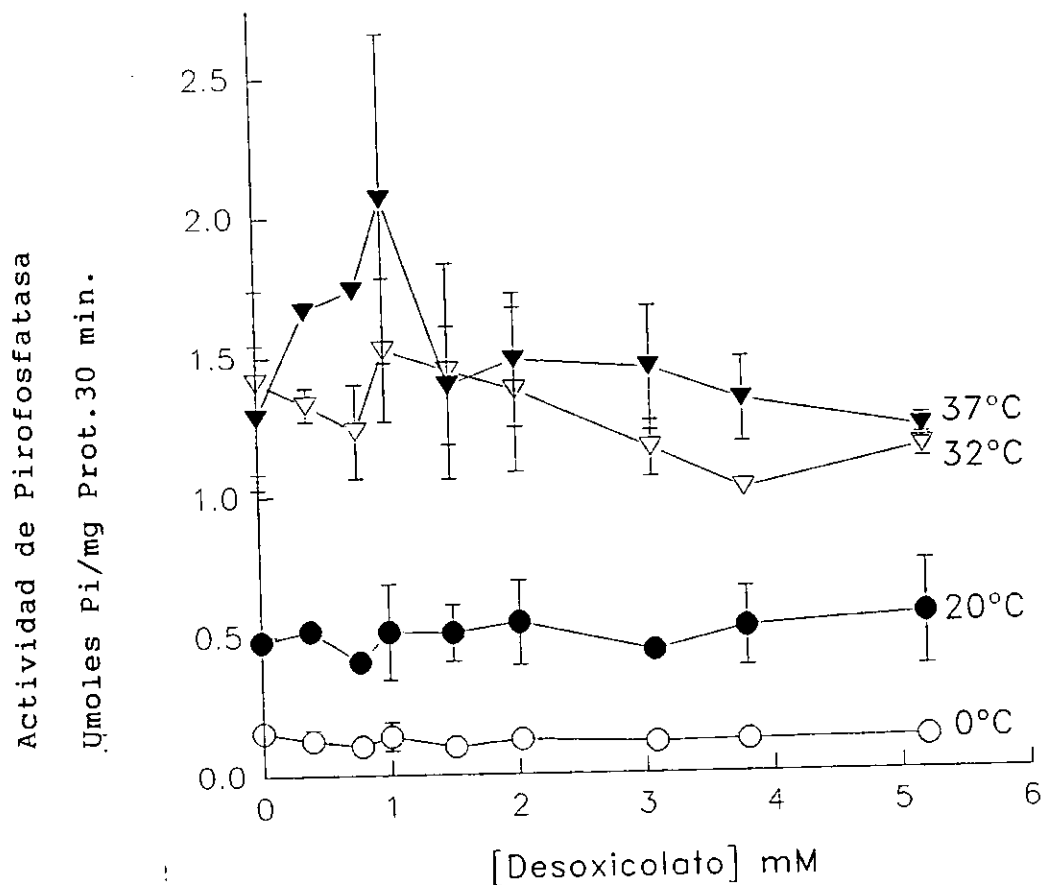
A 37 °C en presencia de CdI_2 la actividad se mantuvo más o menos constante. En ausencia de CdI_2 la actividad se inhibió en un 50% (figura 22 B).

C) Preincubación de la Fracción Membranal con Diferentes Concentraciones de Detergente y Determinación de la Actividad Enzimática en el Material Solubilizado y no Solubilizado a 0, 20 y 37 °C

A 0 °C sin CdI_2 con 0.01% del desoxicolato equivalente a una concentración de 241 μM se disolvió el 40% de la proteína y se recuperó en el sobrenadante.

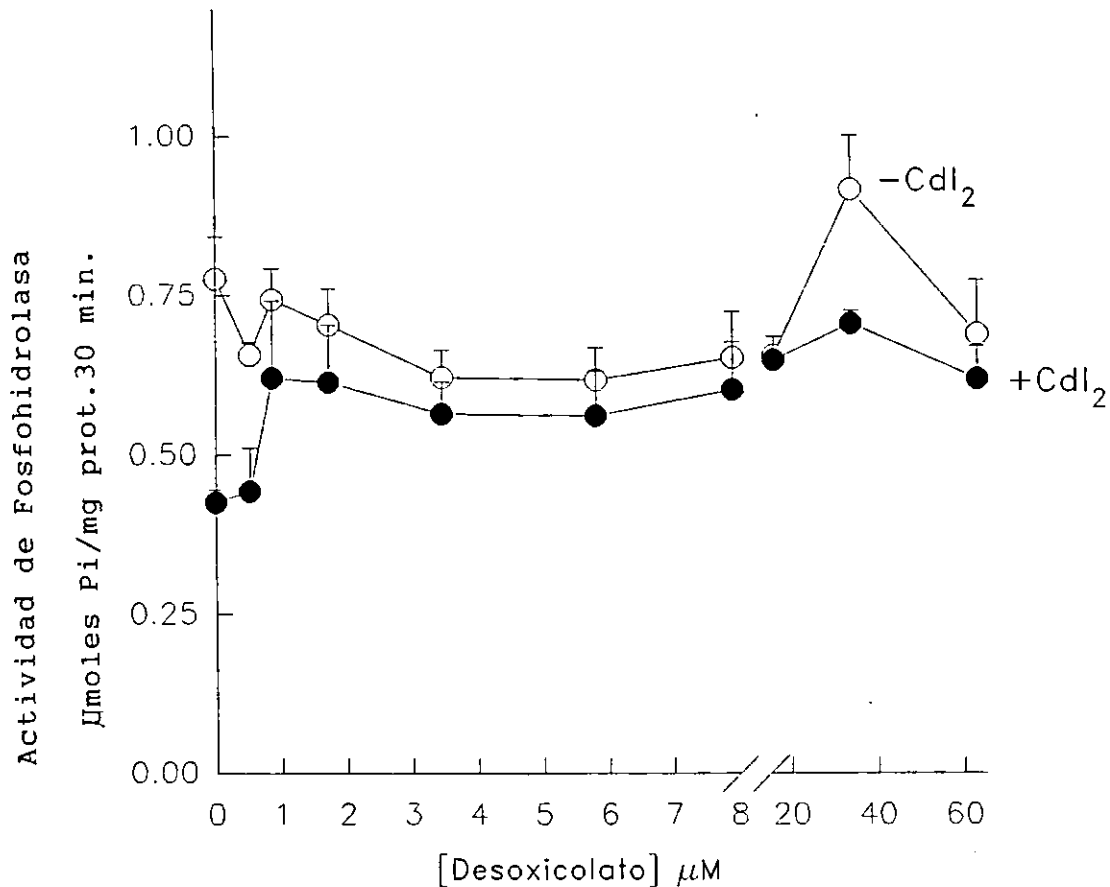
Se observó que la actividad del material insoluble y del solubilizado fue 3 veces mayor que la actividad de las vesículas sin preincubación con el detergente. La reacción de glucosa-6-fosfohidrolasa alcanzó niveles semejantes en las dos fracciones después del tratamiento con detergente (figura 23 A).

FIGURA 21: EFECTO DE DESOXICOLATO SOBRE LA REACCION DE PIROFOSFATASA A DIFERENTES TEMPERATURAS CON $C I_2$



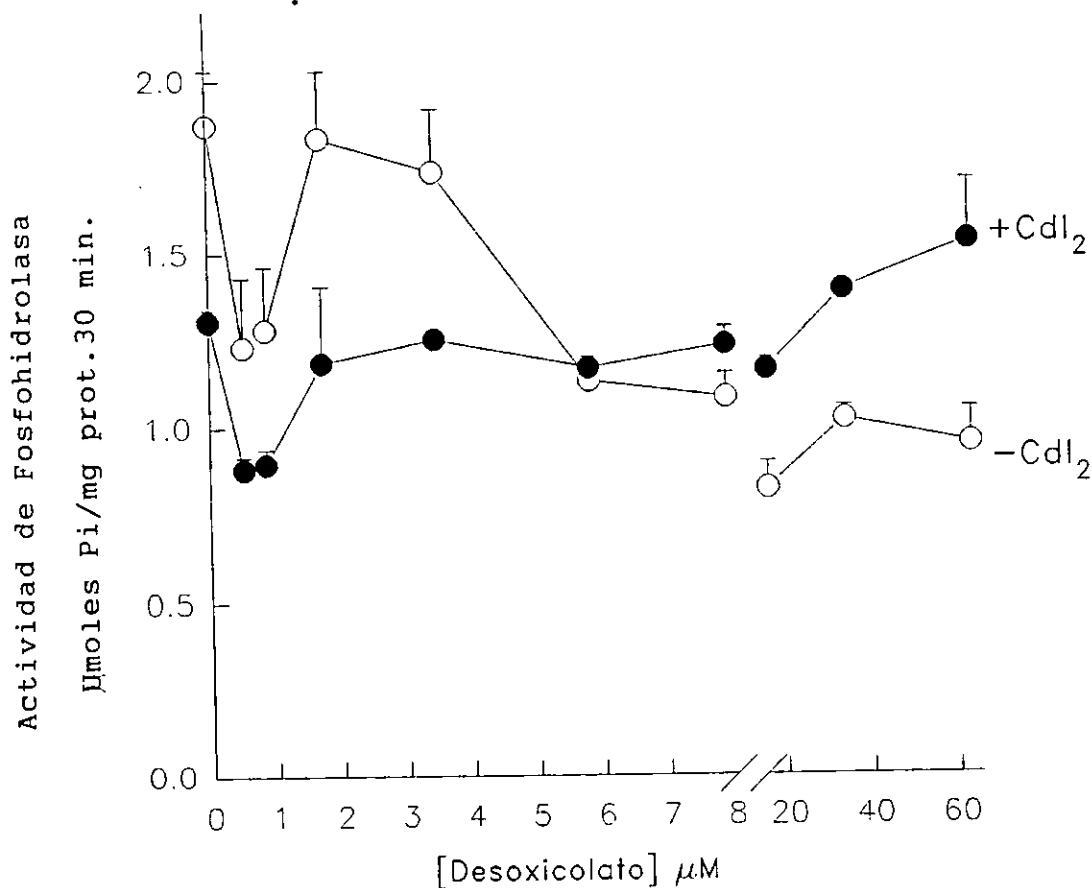
Actividad de pirofosfatasa de la enzima G-6-Pasa testicular en presencia de distintas concentraciones de desoxicolato de sodio preincubado 10 min. a 0° . La preincubación se realizó en ausencia de sustrato y en presencia de CdI_2 2.5 mM. La actividad se inicio por adición de pirofosfato de sodio 5 mM al medio de incubación con detergente y proteína microsomal, la actividad fue determinada a diferentes temperaturas por 10 min.. Los valores son promedio de 2 experimentos por triplicado.

FIGURA 22 A: EFECTO DE LA PREINCUBACION DE MICROSOMAS
 CON DESOXICOLATO DE SODIO A 20°
 SOBRE LA GLUCOSA-6-FOSFOHIDROLASA



Actividad de G-6-Pasa en presencia de distintas concentraciones de desoxicolato de sodio, preincubando 600 μg de proteína en distintas concentraciones de detergente, de la suspensión se tomó 100 μg de proteína incubándose en medio de incubación sin detergente en presencia (●) o ausencia (○) de CdI_2 2.5 mM. La actividad se inicio por adición de G-6-P 25 mM a 20°C. Los valores son promedio con desviación estandar de 3 experimentos por triplicado.

FIGURA 22 B: EFECTO DE LA PREINCUBACION DE MICROSOMAS
 CON DESOXICOLATO DE SODIO A 37°
 SOBRE LA GLUCOSA-6-FOSFOHIDROLASA



Actividad de G-6-Pasa en presencia de distintas concentraciones de desoxicolato de sodio, preincubando concentraciones de 600 μg de proteína en distintas concentraciones de detergente durante 15 min. a 0°. De la suspensión se tomó un volumen equivalente a 100 μg de proteína y se incubó en medio de incubación sin detergente tanto en presencia (●) o ausencia (○) de CdI₂ 2.5 mM. La actividad se inició por adición de G-6-P 25 mM a 37°C durante 30 min.. Los valores son promedio de 3 experimentos por triplicado.

A 0.1% (o 2.4 mM) de desoxicolato se observó una solubilización del 75% de las proteínas preincubadas. La actividad del sobrenadante y de la pastilla fue similar a la de las vesículas sin tratamiento pero mostro una gran variabilidad (figura 23 A).

A 1% o 24 mM de desoxicolato se solubilizó el 100% de las vesículas membranales y la actividad alcanzó un nivel 2 veces mayor al de las vesículas sin preincubación con el detergente (figura 23 A).

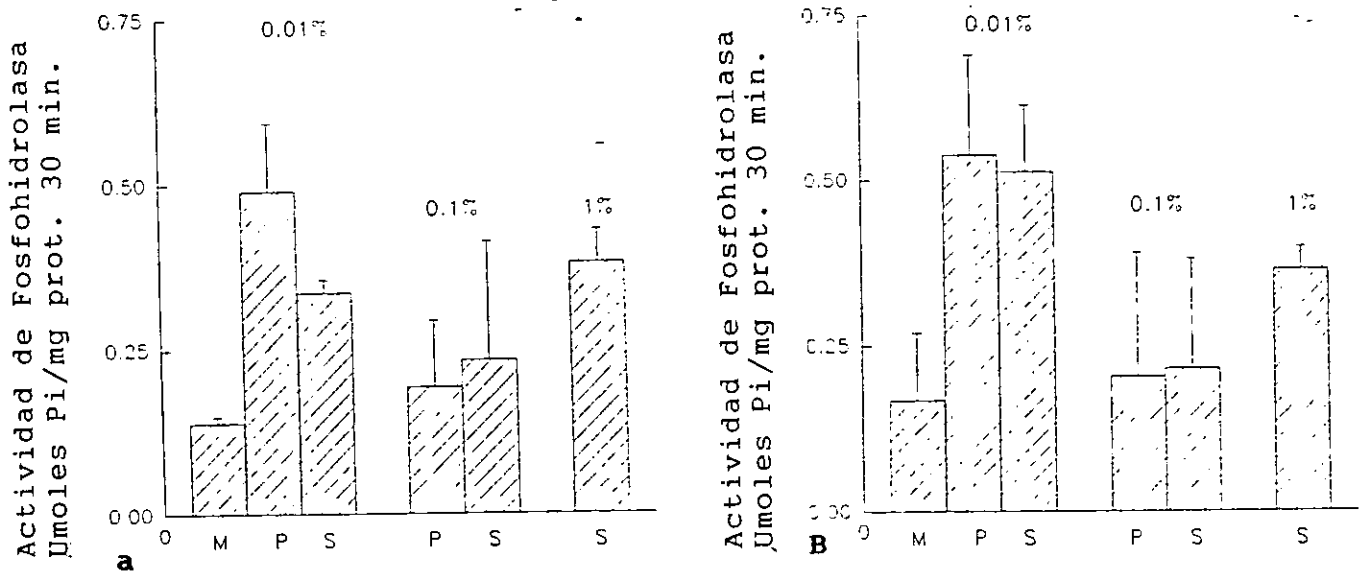
La inclusión de CdI₂ en el medio de incubación para determinar la reacción de glucosa-6-fosfohidrolasa, pero no durante el tratamiento con el detergente, no modificó el nivel de la actividad (figura 23 B).

Las vesículas tratadas con 0.01% o 24 uM de desoxicolato permitieron demostrar una latencia del 300% en la actividad de la fracción no solubilizada que no fue modificada por la presencia de CdI₂. La actividad de la fracción solubilizada si se afecto por la presencia del CdI₂, alcanzando solo una latencia de 200%.

A 20 °C y sin CdI₂ durante la reacción enzimática el tratamiento con desoxicolato 0.01% no modificó la actividad de la fracción solubilizada y de la pastilla y mostró variaciones importantes en su actividad (figura 24 A). a 2.4 mM (0.1%) de detergente la fracción no solubilizada aumento su actividad 50% y el sobrenadante no mostró cambios significativos. Con 24 mM (1%) de desoxicolato se observó una inhibición del 70% en la reacción de glucosa-6-fosfohidrolasa (figura 24 A).

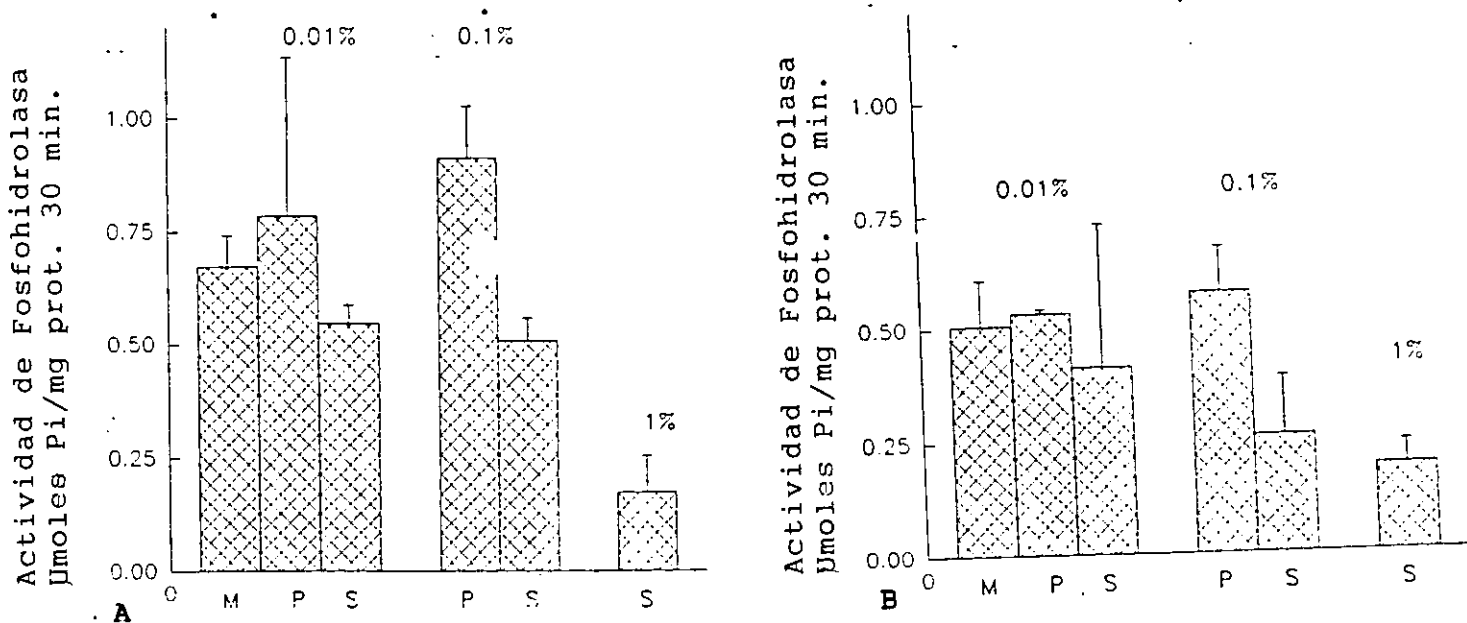
La presencia de CdI₂ en el medio de incubación durante la determinación de la actividad de las vesículas tratadas con 3 concentraciones de desoxicolato a 241 uM (0.01%) mostró una

FIGURA 23: EFECTO DEL TRATAMIENTO CON DESOXICOLATO
 SOBRE LA GLUCOSA-6-FOSFOHIDROLASA A 0°



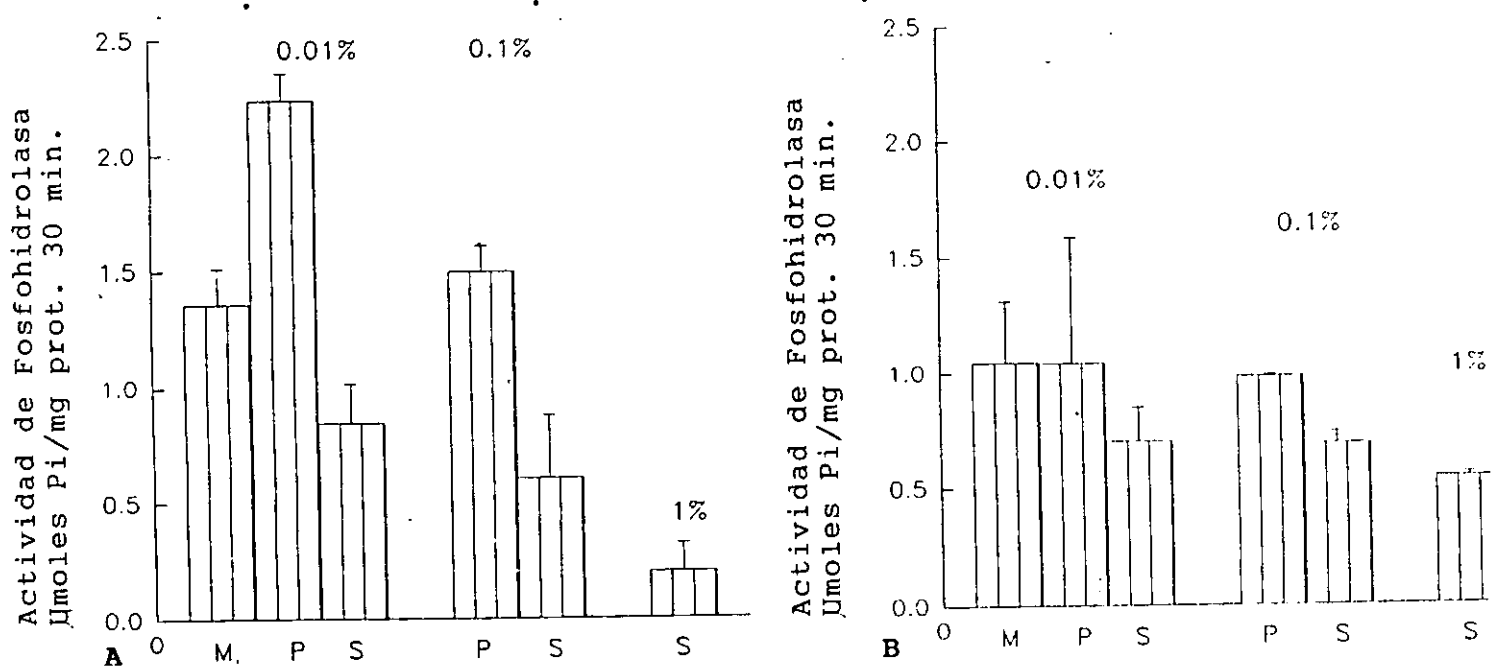
Actividad de Glucosa-6-Fosfohidrolasa tratada con diferentes concentraciones de desoxicolato a 0°C durante 15 min. La actividad fue medida en la porción solubilizada (S) y en la no solubilizada (P) separadas por centrifugación, así como en vesículas membranales sin tratar. La actividad fue medida en medio de incubación con 25 mM de G-6-P en ausencia de CdI₂ (figura A) como en presencia de CdI₂ 2.5 mM. (figura B), a temperatura de 0°C durante 30 min. Los valores presentados son promedio con desviación estandar de 3 experimentos por triplicado.

FIGURA 24: EFECTO DEL TRATAMIENTO CON DESOXICOLATO
 SOBRE LA GLUCOSA-6-FOSFOHIDROLASA A 20°C



Actividad de Glucosa-6-Fosfohidrolasa tratada con diferentes concentraciones de desoxicolato a 0°C durante 15 min. La actividad fue medida en la porción solubilizada (S) y en la no solubilizada (P) separadas por centrifugación, así como en vesículas membranales sin tratar. La actividad fue medida en medio de incubación con 25 mM de G-6-P en ausencia de CdI₂ (figura A) como en presencia de CdI₂ 2.5 mM. (figura B), a temperatura de 20°C durante 30 min. Los valores presentados son promedio con desviación estandar de 3 experimentos por triplicado.

FIGURA 25: EFECTO DEL TRATAMIENTO CON DESOXICOLATO
 SOBRE LA GLUCOSA-6-FOSFOHIDROLASA A 37°C



Actividad de Glucosa-6-Fosfohidrolasa tratada con diferentes concentraciones de desoxicolato a 0°C durante 15 min. La actividad fue medida en la porción solubilizada (S) y en la no solubilizada (P) separadas por centrifugación, así como en vesículas membranales sin tratar. La actividad fue medida en medio de incubación con 25 mM de G-6-P en ausencia de CdI₂ (figura A) como en presencia de CdI₂ 2.5 mM. (figura B), a temperatura de 37°C durante 30 min. Los valores presentados son promedio con desviación estandar de 3 experimentos por triplicado.

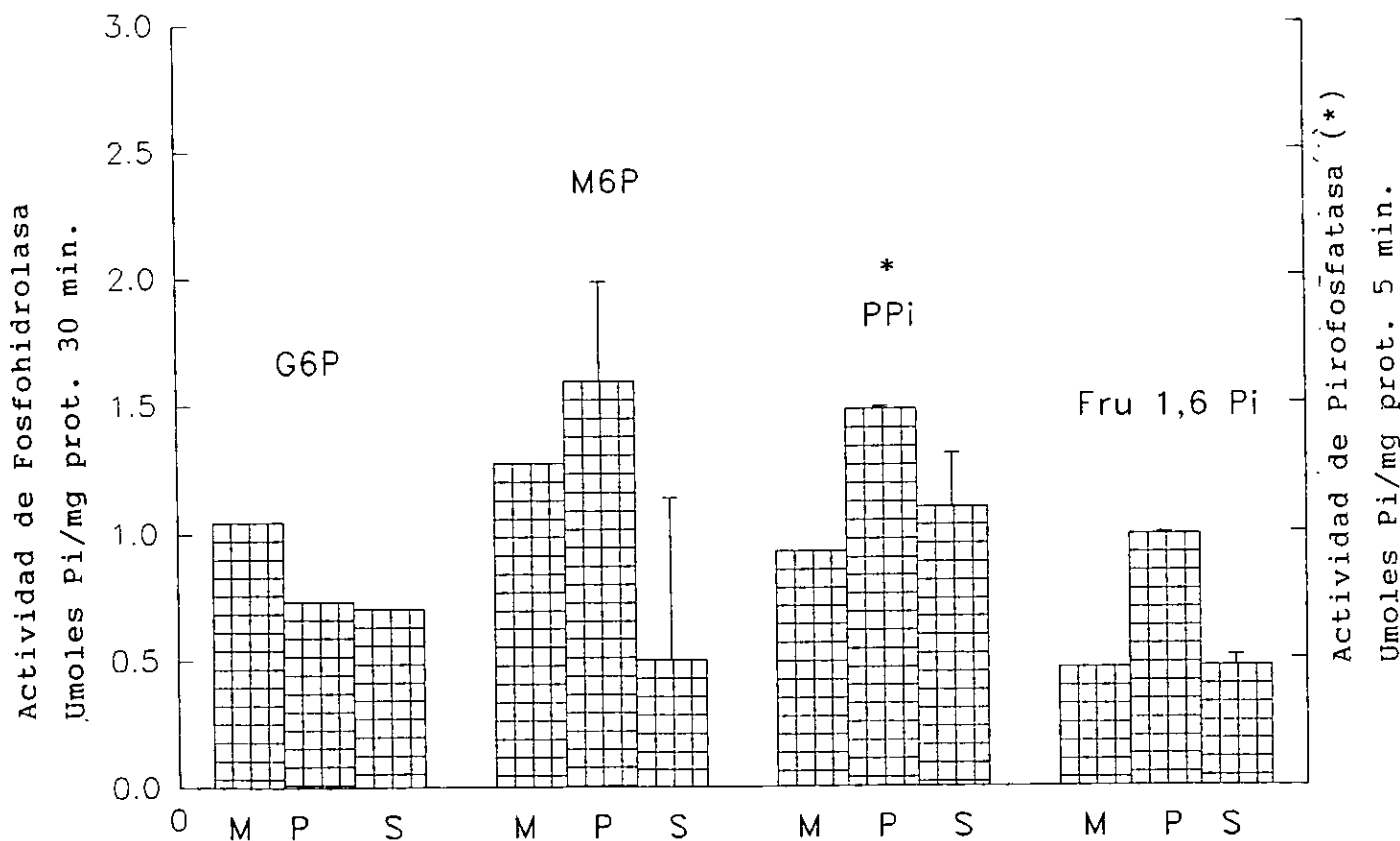
6. Efecto del Tratamiento con Desoxicolato Sobre la Membrana Microsomal

Las vesículas membranales antes del tratamiento con desoxicolato y sin CdI₂ en el medio de incubación mostraron capacidad para hidrólisis glucosa-6-fosfato (G-6-P), manosa-6-fosfato (M-6-P), pirofosfato de sodio (PPi) y fructosa-1,6-difosfato (F-1,6-DP). La actividad en presencia de G-6-P y M-6-P fue semejante, pero la hidrólisis de F-1,6-DP solo alcanzó el 24% del nivel que se alcanzó con los otros 2 azúcares. Después del tratamiento con desoxicolato 241 μ M (0.01%) la hidrólisis de M-6-P, F-1,6-DP y de PPi se incrementó en la fracción no solubilizada por el detergente. En la porción soluble la hidrólisis de G-6-P y de M-6-P fue inhibida en un 50 y 63% respectivamente.

La hidrólisis de PPi en la fracción solubilizada alcanzó el mismo nivel antes de la preincubación con el detergente (figura 26 A). En presencia de CdI₂ se observaron niveles menores de actividad con G-6-P y M-6-P pero no se modificó la actividad con PPi y F-1,6-DP. La actividad de la pastilla no solubilizada por el detergente incrementó 20% con M-6-P, 40% cuando el sustrato fue PPi y 100% con F-1,6-DP. Sin embargo con G-6-P no hubo incremento sino inhibición del 20%.

La actividad del sobrenadante con PPi y F-1,6-DP no se afectó por la presencia de CdI₂ en el medio de incubación (figura 26 B).

FIGURA 26 A: EFECTO DE DESOXICOLATO AL 0.01%
 SOBRE LA ESPECIFICIDAD DE SUSTRATO DE LA
 GLUCOSA-6-FOSFATASA TESTICULAR SIN CdI₂



Actividad de la especificidad de la G-6-Pasa despues del tratamiento con 0.01% de desoxicolato. La actividad fue medida en las fracciones solubilizada (S) y no solubilizada (P) asi como en un control no tratado con detergente (M), para lo cual se uso distintos sustratos fosfatados. La actividad enzimática se determinó en alicuotas de 50 ug de proteína en medio de incubación sin CdI₂. Los valores presentados son promedio con desviación estandar de 3 experimentos por triplicado.

DISCUSION

Los resultados obtenidos en el presente trabajo confirman y amplian las observaciones previas de Diaz y Trejo (1994), demostrando que las fracciones de testículo de rata inmadura que sedimentan a 9770 y 20000 x g están enriquecidas en la actividad de glucosa-6-fosfatasa. La aceleración que se requiere para sedimentar las vesículas testiculares con esta actividad es 5 veces menor a los reportados para hígado por varios autores (Waddell y Burchell, 1980; Schuelze y col. 1985) los cuales han utilizado la fracción membranal que sedimenta a 100 000 x g como fuente de esta enzima. Fisher y Stetten, (1966) reportaron que el 99% de esta actividad se recuperaba en la fracción que sedimenta a 120 000 x g. En el caso de la enzima testicular no se observa una fracción claramente enriquecida en esta actividad enzimática. El 60% de la actividad total se recupera en las 2 fracciones membranales y el resto se distribuye en las otras fracciones membranales.

Al analizar la distribución subcelular del contenido de proteína en cada fracción, observamos que la pastilla que sedimenta a 9770 x g y el citosol representa alrededor del 80% de la proteína total y el 20% restante se distribuye en las otras fracciones membranales restantes. Las fracciones de 9770 y 20000 x g representan menos del 10% de la proteína total y el 60% de la actividad total de la glucosa-6-fosfatasa, demostrando así su enriquecimiento en vesículas derivadas de retículo endoplásmico.

La fracción microsomal que sedimenta a 120 000 x g representa solo el 1% de la actividad total y el 3% de la proteína total. La

fracción testicular enriquecida con esta actividad podría corresponder a una fracción de retículo endoplásmico pesado como se ha descrito para el hígado.

Es muy importante señalar que en ratas de 38 días de edad el 60% de la población celular que constituye el epitelio germinal son espermátides (Clermont y Perey, 1957) y la fragmentación homogénea del retículo endoplásmico en vesículas ligeras, como en el caso de hígado no parece posible. Esto puede deberse a la organización altamente especializada del retículo endoplásmico en estructuras alrededor del flagelo y de los tubos caudales (Clermont y Perey, 1978). No existen reportes que señalen la distribución subcelular de esta enzima, con los cuales comparar nuestros resultados, pero estudios histoquímicos han revelado su presencia en el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi de las células del epitelio germinal (Yokoyama y Chang, 1977; Thorne-Tjomsland y col., 1991).

La semejanza en la distribución subcelular de las 2 reacciones catalizadas por la glucosa-6-fosfatasa testicular, fosfohidrolasa y pirofosfatasa, confirman que la glucosa-6-fosfatasa testicular esta asociada a las 2 fracciones de retículo endoplásmico que sedimentan a 9770 y 20000 x g. Fisher y Stetten (1966) observaron una actividad específica del mismo rango en estas 2 reacciones en la fracción microsomal de hígado. Este resultado es diferente al obtenido en el testículo inmaduro ya que la reacción de pirofosfatasa tiene una actividad 4 veces mayor a la de fosfohidrolasa. La actividad de pirofosfatasa asociada a estas fracciones no se incrementó por la adición de Mg^{2+} . Stetten y Taft (1964) observaron que en el hígado, esta reacción tampoco es estimulada por este ion. La presencia

ausencia de CdI_2 no afectó la distribución subcelular de la reacción de pirofosfatasa, descartándose así la participación de la fosfatasa ácida en la hidrólisis de pirofosfato. Sin embargo si se detectó la presencia de una pirofosfatasa inorgánica activada por Mg^{2+} en las fracciones que sedimentan a 40 000 y 120 000 x g y en el citosol. Estos resultados confirman y amplían observaciones previas de otros autores (Delhumeau-Ongay y col., 1973).

Al comparar la actividad de las otras 2 reacciones estudiadas de la glucosa-6-fosfatasa en el testículo y en el hígado, se observó que la reacción de glucosa-6-fosfohidrolasa fue menor en testículo que en hígado. Las actividades del homogeneizado total de testículo ya había sido comparada con otros órganos como el páncreas, el pulmón y el bazo por Colilla y col. (1975), quienes observaron que estos órganos tienen menor actividad que el hígado. Estos resultados son congruentes con la función que realiza el hígado de mantener la homeostasis de la glucosa en sangre (Cori y Cori, 1952). En el testículo esta enzima podría participar en ciclos fútiles y contribuir a la desaparición de ATP (Grootegoed y col., 1984).

El nivel de reacción de la pirofosfatasa de las enzimas testiculares y hepáticas son semejantes pudiendo sugerir que las enzimas de hígado es más apta para hidrolisar G-6-P y la de testículo para hidrolisar PPI.

Los resultados obtenidos confirman la termoestabilidad de la glucosa-6-fosfatasa testicular como se había observado previamente, dicha enzima tiene una actividad lineal por tiempos de hasta 60 minutos, aún cuando la temperatura de incubación se elevó hasta los 50 °C (figura 5). Sin embargo la adición de CdI_2 2.5 mM modificó el

comportamiento de la glucosa-6-fosfatasa frente al aumento de la temperatura de incubación, la máxima actividad se alcanzó a los 40 °C y se mantuvo constante a temperaturas mayores.

En ausencia de CdI_2 se observó una fase inicial de activación hasta temperaturas de 37 °C y una fase de inactivación a temperaturas superiores (figura de Arrhenius 6). La gráfica de Arrhenius reportada por Zakim y Dannenberg (1990) para la enzima hepática no muestra cambios en la pendiente cuando representa la actividad frente a diferentes temperaturas de incubación, hasta de 50 °C, pero si demuestran la inactivación de la enzima preincubada en ausencia de sustrato a temperaturas mayores de 37 °C. Es muy importante señalar que la concentración de sustrato utilizada por los autores mencionados fue 5 mM y que los valores reportados para la gráfica de Arrhenius corresponden a extrapolaciones a t_0 teóricos, ya que la actividad decae con el tiempo a temperaturas mayores de 37 °C. Estos mismos autores observaron que altas concentraciones de sustrato (es decir G-6-P 20 mM), protegían a la enzima de la inactivación térmica. Estas observaciones fueron confirmadas en el presente trabajo, donde al incubar a la enzima hepática con 25 mM de G-6-P se preservó la linealidad de la reacción por más de una hora. La adición de CdI_2 inhibió la reacción pero no modificó la linealidad de la hidrólisis.

Debido a que la glucosa-6-fosfatasa ha sido propuesta como una enzima con un sitio catalítico que puede hidrolisar diferentes sustratos se decidió determinar el comportamiento de la enzima testicular frente a diferentes temperaturas utilizando como sustrato PPI. La reacción de pirofosfatasa se incrementó con el aumento de la temperatura y a diferencia de lo observado para la reacción de

fosfohidrolasa, está reacción no fue inhibida por CdI_2 .

También se ha propuesto un grupo de translocadores específicos para glucosa-6-fosfato, pirofosfato y glucosa y se ha sugerido que su actividad con estos sustratos puede ser también modificada por la temperatura cuando la concentración de sustrato es baja (Waddell y Burchell, 1980). Sin embargo, la adición de los sustratos a concentraciones mayores de 10 mM mantienen la linealidad y la actividad alta (Nordlie y col., 1992).

Si el CdI_2 actuara sobre el sitio catalítico de la enzima su efecto habría sido igual con los 2 sustratos y la temperatura afectaría de igual forma ambas reacciones, pero esto no fue lo observado. Los resultados indican que los transportadores del sistema de glucosa-6-fosfatasa no son afectadas en forma similar por el CdI_2 . El transportador de glucosa-6-fosfato parece tener más grupos sulfhidrilos expuestos a temperaturas mayores de 37 °C. Esta diferencia en la sensibilidad de los transportadores a los agentes que actúan sobre los grupos sulfhidrilos también ha sido observada para hígado, observando que el más sensible es el transportador de G-6-P (T1) (Arion y col., 1980).

El efecto de la preincubación en ausencia de sustrato fue descrito por Zakim y Dannenberg (1990), quienes demostraron que la glucosa-6-fosfatasa del hígado podía manifestar por lo menos 2 estados conformacionales dependiendo de la temperatura e incubación y de la presencia o ausencia de detergente. La preincubación de la enzima en ausencia de sustrato a altas temperaturas induce un estado conformacional de menor actividad pero estable por tiempos largos. Este estado se podía alcanzar después de 5 minutos de preincubación a

45.5 °C en ausencia de sustrato, dando niveles de actividad correspondientes al 5% de la actividad total. La enzima de testículo mostró un comportamiento similar sólo cuando fue preincubada con CdI₂, pero a diferencia de la enzima hepática, el nivel de la enzima preincubada en ausencia de sustrato alcanzó el 50% de la actividad control.

Está actividad remanente no cambia cuando se preincuba a 40 °C pero si a 50 °C. Sin embargo, la preincubación sin sustrato y en ausencia de CdI₂ a 37 °C demostro que la enzima testicular es estable a esta temperatura hasta por 60 minutos. Estos resultados sugieren diferencias importantes entre la enzima testicular y hepática, los cuales pueden ser debidos a los diferentes ambientes hidrofóbicos de las membranas microsomales de ambos tejidos, haciendo que la enzima testicular no requiera del sustrato para protegerse de las diferentes temperaturas de incubación y que la enzima hepática si requiere para su protección. Posiblemente la concentración de glucosa-6-fosfato utilizada en estos experimentos permite saturar tanto a los transportadores como al sitio catalitico de la enzima y los protege de la inactivación por CdI₂.

La presencia de las translocasas de glucosa-6-fosfato y PPI fue explorada con diferentes detergentes en una variedad de condiciones experimentales.

Cuando la actividad enzimática se determinó en presencia de distintos tipos de detergente, no iónicos (Triton X-100), anfifílicos (CHAPS) y aniónicos (desoxicolato de sodio) no se observó que la actividad se estimulara.

El Triton X-100 inhibió la reacción a concentraciones menores

a la concentración micelar crítica. La adición de CHAPS produjo una disminución menor que la producida por el Triton X-100 a concentraciones muy por debajo de su concentración micelar crítica. La ausencia de un efecto estimulador contrasta con lo reportado por Schuelze y col. (1985) y por Watts y Faraj (1990). Con 3 mM del detergente CHAPS estos investigadores logran aumentar la actividad de la enzima hepática. Los resultados que se presentan con la enzima testicular fueron obtenidos a concentraciones mayores de detergente, con valores mucho menores de la relación proteína/detergente. El efecto directo del detergente sobre la enzima pudo haber causado la inhibición de la actividad. La presencia del detergente pudo haber bloqueado el acceso al sitio catalítico o haber impedido su asociación con la enzima y con ello promover cambios conformacionales y una inactivación térmica (Arion y Wallas 1982). Para descartar esta posibilidad otros autores han utilizado albúmina, que protege a la enzima y permite observar el efecto estimulante de los detergentes (Arion y Wallas, 1982). La adición de albúmina al medio de incubación permite la formación de micelas de albúmina/detergente/microsomas lo cual aumenta la relación proteína/detergente. En nuestro caso no se utilizó albúmina en el medio de incubación y la relación proteína/detergente fue baja.

Al usar CHAPS con y sin CdI_2 tampoco se observó un incremento de la actividad debido a que la concentración reportada a la cual se libera la latencia es 3 mM con una relación de proteína/detergente superior a la utilizada por nosotros, ya que al usar albúmina para estabilizar la reacción cambia la relación aparente de proteína microsomal/detergente (Watts y col., 1987) y por lo tanto no se

alcanzo la concentración para liberar la latencia de la enzima testicular. Este detergente pudo haberse asociado a la membrana microsomal provocando cambios conformacionales que bloquean el acceso del sustrato al sitio catalítico y por tanto disminuye su actividad.

La adición de desoxicolato de sodio al medio de incubación en diferentes concentraciones alcanzó relaciones de proteína/detergente iguales (16.1) y mayores a las reportadas por Snoke y Nordlie (1967) no obteniendo ningún incremento notorio que pudiera decir que se liberaba la latencia enzimática a temperaturas de 0 y 20 °C. Esto pudo deberse a un complejo formado por el detergente y el sistema enzimático que no permite el acceso del sustrato hacia el sitio catalítico (Arion y Wallas, 1982). A 37 °C si se observó un ligero incremento en ausencia de CdI_2 pero en presencia se observó la inhibición ya descrita.

En la actividad de pirofosfatasa tampoco se observó nada que indicara la liberación de la latencia reportada por Snoke y Nordlie (1967).

Schuelze y col. (1985) observaron que a bajas concentraciones de detergente Triton X-100 se solubiliza más a las proteínas de las membranas y a altas concentraciones el detergente solubiliza más fosfolípidos y concluyeron que el detergente influye en la barrera de permeabilidad (o sobre los acarreadores) y disminuye el transporte de sustratos, limitando el paso de estos para su hidrólisis. Este efecto pudo ocurrir con la enzima testicular que en presencia de los detergentes usados (Triton X-100, CHAPS y desoxicolato de sodio) su actividad es inhibida.

Utilizando el método de Schuelze y col. (1986) en el cual se

diluye la concentración del detergente de preincubación tampoco se observó un incremento notable de la actividad, aunque se inhibió solo un poco a temperatura de 37 °C, esto pudo deberse a que al diluir la concentración de proteína/detergente esta tiende al equilibrio de la concentración de monómeros y libera co-micelas resultando la reconstitución de estructuras intermediarias sensibles a la temperatura.

Cuando se usó el método de preincubación de los microsomas con desoxicolato separandó el material solubilizado del no solubilizado para determinar su actividad enzimática se observó que este tratamiento si permitió determinar la latencia de la glucosa-6-fosfatasa testicular. A una concentración de 241 mM se observó un incremento de hasta un 300% de la actividad de glucosa-6-fosfatasa.

Esta concentración es mucho menor que la reportada por Snoke y Nordlie (1967), la cual es de 2.55 mM; para observar la latencia de la enzima hepática. El mayor incremento se observó a 0 °C, en concordancia con lo reportado por Schuelze y col. (1985). A temperaturas mayores la actividad se incrementa, la latencia es menor y puede desaparecer, sobre todo si el medio de incubación contiene CdI₂. El efecto estimulante del detergente se pierde en presencia de este compuesto sobre todo a temperaturas mayores de 0 °C. Estos resultados sugieren que el CdI₂ pudiera tener efecto también sobre la enzima. Hay que hacer notar que por una parte se tendrían los efectos sobre los grupos SH dados por el Cd²⁺ y por otra los efectos caotrópicos del I⁻. La presencia del ión yoduro, puede modificar la estructura del agua y de las proteínas, hacer más solubles las

porciones hidrofóbicas de la glucosa-6-fosfatasa y de los transportadores y sumar sus efectos a los del detergente (Hatefi y Hanstein, 1969).

El ión yoduro podría tener efectos solubilizantes sobre el sitio catalítico de la enzima e inducir la inhibición de la actividad, sobre todo a temperaturas altas.

Esta interpretación es apoyada por el efecto del CdI_2 sobre la actividad de la enzima a diferentes temperaturas (gráfica de Arrhenius). En ausencia de CdI_2 la actividad enzimática después del tratamiento con desoxicolato no se ve afectada por la temperatura.

Nordlie y Arion en 1964 y Arion y col. en 1976 mencionan que la membrana del retículo endoplásmico hepático es permeable a la glucosa, a la manosa y a la glucosa-6-fosfato pero impermeable a la manosa-6-fosfato y a la fructosa-1,6-difosfato. La membrana del retículo endoplásmico hepático presenta transportadores específicos para la glucosa-6-fosfato, el pirofosfato y la glucosa; la manosa-6-fosfato y la fructosa-1,6-difosfato llegan al sitio catalítico cuando los microsomas han sido permeabilizados o han sido rotos por la centrifugación al separarlos de otras fracciones membranales, o porque al homogeneizarlos y separarlos por centrifugación hallan quedado en posición "in side out" (es decir lo de dentro hacia afuera), y por lo tanto es sitio catalítico de la enzima que da expuesto a los sustratos sin una barrera que le regule el acceso. La actividad con manosa-6-fosfato como sustrato ha sido propuesto como un indicador de la integridad de la membrana microsomal. Este sustrato es hidrolisado por la enzima hepática solamente en un 1% en comparación con la glucosa-6-fosfato.

La enzima de testículo presentó igual nivel de actividad tanto en la hidrólisis de manosa-6-fosfato como con glucosa-6-fosfato. Este comportamiento había sido reportado por Nordlie en 1981 quien demostró que cuando las membranas están dañadas hay la hidrólisis de esos sustratos en una proporción 1 a 1. Las vesículas membranales de testículo presentaron este tipo de proporción, sugiriendo que las vesículas membranales no están intactas o como si no presentaran transportadores selectivos de sustratos, como los propuestos para los microsomas de hígado, riñón e intestino delgado. Además presentaron una actividad con sustratos que la enzima hepática no utiliza en condiciones normales.

El hecho de que hasta el momento no se hallan podido aislar a los transportadores para comparar como son en variados tejidos imposibilita saber si esos transportadores son iguales o diferentes y por lo tanto puedan actuar distinto. Para finalizar el presente trabajo aporta algunos aspectos que apoyan la hipótesis de la presencia de los transportadores así como otros que no lo apoyan.

CONCLUSIONES

*La enzima glucosa-6-fosfatasa de testículo es capaz de realizar reacciones de fosfohidrolasa y pirofosfatasa.

*La adición de CdI_2 al medio de incubación modificó la termoestabilidad de la reacción de glucosa-6-fosfohidrolasa.

*La presencia de CdI_2 no modificó la termoestabilidad de la reacción de pirofosfatasa.

*La enzima testicular preincubada a altas temperaturas en ausencia de sustrato es capaz de mantener un 50% de la actividad original de la reacción de fosfohidrolasa en presencia de CdI_2 y en ausencia de este inhibidor mantiene un 100% de la actividad.

*El empleo de diferentes detergentes en el medio de incubación no permitió determinar la latencia de la enzima testicular.

*El tratamiento con desoxicolato 0.240 mM (0.01%) a 0°C permitió determinar la latencia de la enzima. La actividad de la glucosa-6-fosfatasa aumentó un 300%.

*La latencia de la enzima disminuye con el incremento de la temperatura.

*El CdI_2 cancela el efecto activador del detergente a

temperaturas mayores de 0 °C.

*Los microsomas o vesículas membranales del testículo son capaces de hidrolisar sustratos que no hidrolizan generalmente los microsomas de hígado (como la manosa-6-fosfato y la fructosa-1,6-difosfato).

*Es posible que las propiedades de los lípidos y las proteínas de las membranas testiculares utilizados en este estudio sean muy sensibles al aumento de la temperatura.

*Se requiere determinar si las vesículas membranales permanecen selladas a diferentes temperaturas.

BIBLIOGRAFIA

- Amar-Costesec, A. Beaufay, H. Wibo, M. y Thines-Sempadeux, F. (1974) Analytical study of microsomes from rat liver II preparation and composition of the microsomal fraction. *J. Cell Biol.* 61:201-212.
- Anchors, J.M. y Karnovski, M.L. (1975) Purification of cerebral glucose-6-phosphatase and enzyme involved in sleep. *J. Biol. Chem.* 250:6408-6414.
- Arion, W.J. Wallin, B.K. Lange, A.J. y Ballas, L.M. (1975) On the involvement of a glucose-6-phosphate transport system in the function of microsomal glucose-6-phosphatase. *Mol. Cell. Biochem.* 6:75-83.
- Arion, W.J. Lange, A.J. y Ballas, L.M. (1976) Quatitative aspects of relationship between glucose-6-phosphatase transport and hydrolysis for liver microsomal glucose-6-phosphatase system. *J. Biol. Chem.* 251:6784-6790.
- Arion, W.J. Lange, A.J. y Wallas, H.E. (1980) Microsomal membrane integrity and the interactions of phlorizin with the glucose-6-phosphatase system. *J. Biol. Chem.* 255:10387-10395.
- Arion, W.J. y Wallas, H.E. (1982) The importance of membrane integrity in kinetic characterization of the microsomal glucose-6-phosphatase system. *J. Biol. Chem.* 257:11217-11220.

- Bonting, S.L. Coravagio, L.L. Canady, M.R. y Howking, N.H. (1961) Studies on sodium-potasium activated ATP. Arch. Biochem Biophys. 45:916-923.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilization the principle of protein dye binding. Anal. Biochem. 72:248-254.
- Clermont, Y. y Perey, B. (1957) Quantitative study of the seminiferos in inmature rat spermiogenesis. Amer. J. Anat. 151:191-212.
- Clermont, Y. y Rambourg, A. (1978) Evolution of the endoplasmic reticulum during rat spermiogenesis. 151:191-212.
- Colilla, W. Jorgenson, R.A. y Nordlie, R.C. Mammalian carbamyl phosphate: glucose phosphotransferase and glucose phosphate phosphohidrolase: extended tissue distribution. Biochem Biophys. Act. 377:117-125.
- Cori, G.T. y Cori, C.F. (1952) Glucose-6-phosphatase of the liver in glicogen storage disease. J. Biol. Chem. 199:661-667.
- Davis, J.R. y Firlit, F.F. (1965) Effect of glucose on uptake of lysine- H^3 in cell of the seminiferous epithelium. Am. J. Physiol 209:425-432.
- Davis, J.R. (1969) Metabolic aspec of spermatogenesis. Biol. Reprod.

1:93-118.

-Delhumeau-Ongy, Trejo-Bayona, R. y Lara-Vilas (1973) Changes of $(Ca^{2+}Mg^{2+})$ adenosine triphosphatase activity in rat testis through maturation. J. Rep. Fert. 33:513-517.

-Díaz, M.A. y Trejo, R. (1994) Caracterización de la glucosa-6-fosfatasa de testículo de rata inmadura. tesis de licenciatura, biología, ENEP-Iztacala.

-Fisher, C.J. y Stetten, M.R. (1966) Parallel changes in vivo in microsomal inorganic pyrophosphatase, pyrophosphatase-glucose phosphotransferasa and glucose-6-phosphatase activities. Biochem. Biophys Acta. 121:102-109.

-Foster, J.D. Nelsan, L. Sukalski, K.A. Lusius, R.W. y Nordlie, R.C. (1991) Hysteritic behavior of the hepatic microsomal glucose-6-phosphatase system. Biochem. Biophys Acta. 118:9198-9205.

-Gazzoti, P. Solubilization and reconstitution of membrane proteins. Biochimie V. 1-315.

-Gomes, W.R. (1971) Oxigen consumption by seminiferous tubules and interstitial tissue of normal and criptorquidea rat testis. J. Reprod. Fert. 26:427-429.

-Grootegoed, J.A. Jansen, R. y Van Der Molen, J.H. (1984) The role of

BIBLIOTECA
UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

glucose, pyruvato and lactato in ATP production by rat spermatocytes and spermatids. Biochem. Biophys. Acta. 767:248-256.

-Hammersted, R.e. y Lardy, H.A. (1983) The effect of the substratum cycling on the ATP yield of sperm glycolysis. J. Biol. Chem. 258:8765-8768.

-Hartree, E.F. (1972) Determination of the protein: a modification the method the Lowry than gives a linear photometric response. J. Biochem. 48:422-427.

-Has, L.F. y Birne, W.L. (1960) The mechanism of glucose-6-phosphatase. J. Am. Chem. Soc. 82:947-954.

-Hatefi, Y. y Hanstein, W.G. (1969) Solubilization of particular protein and electrolites by chaotropic agents. Proc Nat. academic 62:1129-1136.

-Hiipaka, R.A. y Hammersted, R.O. (1978) Kinetic of the enzymatic activity and its relation to cellular interaction in the testis in the Wistar rat. Androl. 11:168-181.

-Hooker, C.W. (1970) The testis I. Editado por Johnson A. Gomes, W.R. Vandermark. N.L. Academic Press, London, 483.

-Jutte, N.H.P. Grootegoed, J.A. Rommerts, E.F.G. y Vander-Molen, H. (1981) Exogenous lactate is essential for metabolic activities

isolared rat spermatocytes. J. reprod. Fert. 62:399-405.

-Korman, M. (1967) J.Reprod. 14:427-431.

-Lanzetta, (1972) Malachite green sensitive method for quantification inorganic phosphate. Anal. Biochem.

-Lehninger, (1984) Bioquímica. Gluconeogenesis. 2ª edición Omega, Barcelona España. 623-668.

-Lichtemberg, D. Robson, R.V. y Dennis. E. A.

-Mancine, R.E. Phenos, J.C. Izquierdo, A. y Henrich, J.J. (1960) Of acute hypoglycemia on rat testis. PSEBM. 104:699-702.

-Means, A.R. y Hall, P.F. (1968) Protein biosynthesis in the testis role of adenosine triphosphato (ATP) in stimulation by glucose. Endocrinology. 83:8696-8705.

-Mita, M. y Hall, P.F. (1982) metabolism of round spermatids from rat: lactate as the preferred substrate. Biol. Reprod. 26:445-450.

-Nakamura, M. y Hall, P.F. (1976) Inhibition by 5-thio-D-glucose on protein synthesis in vitro by various types of cell from rat testes. J. Rep. Fert. 47:474-483.

-Nakamura, M. y Hall, P.F. (1977) Effect of 5-thio-D-glucose on the

synthesis in vitro by various types the cell from the rat testes. J. Rep. fert. 49:395-397.

-Nakamura, M. Romrell, L.J. y Hall, P.F. (1978) The effects the temperature in glucose on the protein biosynthesis by immature (round) spermatids from rat testes. J.Cell. Biol. 79:1-9.

-Nordlie, R.C. y Arion W.J. (1964) Evidence for the common identity of glucose-6-phosphatase, inorganic pyrophosphatase and pyrophosphate glucose phosphotransferase. J. Biol. Chem. 239:1680-1685.

-Nordlie, R.C. y Soodsma, J.F. (1966) Phosphotransferase activities of kidney glucose 6 phosphatase. J. Biol. Chem. 241:1719-1724.

-Nordlie, R.C. y Jorgenson, R.A. (1981) Latency and inhibitabilidad by metabolitos of glucose 6 phosphatase of permeable hepatocytes from fasted and fed rats. J. Biol. Chem. 256:4768-4773.

-Nordlie, R.C. Scott, H.M. Waddell, I.D. Hume, R. y Burchell, A. (1992) Analysis of human hepatic microsomal glucose 6 phosphatase in clinical conditions where the T₂ pyrophosphate/phosphate transport proteins is absent. Biochem. J. 281:859-863.

-Reczeck, A. y Ville (1982) A purification of microsomal glucose 6 phosphatase from human tissue. Biochem Biophys Res. Comm. 107:1158-1165.

-Setchell, B.P. (1970) The testis. Editado por Jhonson, Gomes, W.R. y Van Dermark, N.L. academic Press London, 483.

-Shuelze, H.U. Kanter, R. y Junker, B. (1985) Latency studies on rat liver microsomal glucose 6 phosphatase correlation of membrane modification and solubilization by triton X-114 with the enzymatic activity. Biochem. Biophys Acta 814:85-95.

-Snoke, R.E. y Nordlie, R.C. (1967) Comparative effects in vitro of various detergents on liver glucose 6 phosphate phosphohidrolase, inorganic pyrophosphate-glucose phosphotransferase and acid inorganic pyrophosphatase activities. Biochem. Biophys Acta. 139:190-192.

-Stetten, M.R. (1974) Metabolism of inorganic pyrophosphate. J.Biol.Chem. 239:3576-3583.

-Tang, X.M. Clermont, Y. y Hermo, L. (1988) Origin and fate of autophagosomes in Leyding cell of normal adults rats. J. Androl.9:284-293.

-Thorne-Tjomsland, g. Clermont, Y. y Tang, X. (1991) Glucose 6 phosphatase activities of endoplasmic reticulum and Golgi apparatus in spermatocytes and spermatids of the rat: an electron microscopic cytochemical study. Biol.Cell 71:33-41.

-Valkili, B. y Banner, M. (1981) The effects of N-alkil-maleimides on the activity of rat liver glucose 6 phosphatase. Biochem.J.

194:319-325.

-Vanha-Pertula, T.C. (1970) Chromatographic fraction and characterization of rat testicular acid phosphatase. *Biochem. Biophys. Acta.* 227:390-401.

-Waddell, I. y Burchell, A. (1980) A direct assay for each translocase of the hepatic microsomal glucose 6 phosphatase system. *Biochem. Soc. Trans.* 15:1125-1126.

-Waddell, I. Scott, H. Grant, A. y Burchell, A. (1990) Identification and characterization of a hepatic microsomal glucose transport protein. *Biochem. J.* 275:363-367.

-Watts, D.C. Faraj, I. y Moreland, B.H. (1987) Improved assay of detergent solubilized glucose 6 phosphatase. *Biochem. Soc. Trans.* 15:945-948.

-Watts, D.C. y Faraj, I. (1990) Glucose 6 phosphatase in myotonic-mice. *Biochem. Soc. Trans.* 260-261.

-Yokoyama, M. y Chang, J.P. (1977) Cytochemical study of glucose 6 phosphatase in chinese hamster testis. *Biol. Reprod.* 17:265-268.

-Zakim, D. y Dannenberg, A. (1990) Thermal stability of microsomal glucose 6 phosphatase. *J. Biol. Chem.* 265:201-208.

-Zysk, J.R. Bushway, A.A. Whistler, R.L. y Carlton, W.W. (1975)
Temporal sterelity produced on mice by 5-thio-D-glucose. J. Rep. Fert.
45:69-72.