

2 ej.  
145



# Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE CIENCIAS

ACTIVIDAD DE PIROFOSFATASA INORGANICA EN TESTICULO  
DE RATA A TRAVES DE LA DIFERENCIACION  
DEL EPITELIO GERMINAL

T E S I S

Que para obtener el título de:

B I O L O G O

presenta

ORDAZ CASTILLO HECTOR



1986



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **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 está 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.

## ABREVIATURAS UTILIZADAS

ABP	Proteínas fijadoras de andrógenos
ADN	Acido desoxirribonucleico
ADP	Adenosin difosfato
AMPc	Adenosin monofosfato ciclico
ARN	Acido ribonucleico
ARNt	Acido ribonucleico de transferencia
ATP	Adenosin trifosfato
ATPasa	Adenosin trifosfatasa
BSA	Albúmina de suero de bovino
Ca <sup>++</sup>	Iones calcio
CoA	Coenzima A
EDTA	Sal tetrasódica del ácido etilén dinitrilo tetracético
FAD <sup>+</sup>	Flavin adenin dinucleótido ( forma oxidada )
FeSO <sub>4</sub>	Sulfato de fierro
FSH	Hormona estieulante del folículo
B6PDH	Deshidrogenasa de la glucosa-6-fosfato
HClO <sub>4</sub>	Acido perclórico
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Acido sulfúrico
IDH	Deshidrogenasa isocitrica
K <sub>m</sub>	Constante de Michaelis ( afinidad enzima - sustrato )
LDH-X	Deshidrogenasa láctica, isoenzima X
LH	Hormona Luteinizante
Mg <sup>++</sup>	Iones magnesio

MnCl<sub>2</sub> Cloruro de manganeso  
NaCl<sub>2</sub> Cloruro de sodio  
NAD<sup>+</sup> Nicotinamida adenina dinucleótido ( forma oxidada )  
NADP<sup>+</sup> Fosfato de nicotinamida adenina dinucleótido ( forma oxidada )  
Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> Fosfato disódico  
(NH<sub>4</sub>)<sub>7</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub> Heptamolibdato de amonio  
pH Potencial de hidrogeniones  
PPi Pirofosfato de sodio  
TEA Clorhidrato de trietanolamina  
Tris Trihidroximetil amino metano  
Zn<sup>2+</sup> Iones zinc

## I N D I C E

	Pag.
INTRODUCCION	1
MATERIAL Y METODOS	23
RESULTADOS	31
DISCUSION	57
RESUMEN Y CONCLUSIONES	65
BIBLIOGRAFIA	67

## I N T R O D U C C I O N

### 1.1. TESTICULO.

#### 1.1.1. Generalidades.

Las gónadas masculinas o testículos tienen en los mamíferos una ubicación externa al abdomen. Se presentan en número de dos y están localizados en el escroto.

Esta situación anatómica repercute en muchas de sus características funcionales, ya que implica que las células se desarrollan a una temperatura hasta de 5 °C por debajo de la del resto de las células del organismo ( 23,31 ).

Cada testículo es un cuerpo ovoide, y se considera como glándula mixta, ya que está conformado tanto por tejido exócrino como endócrino. Los componentes esenciales del testículo son los túbulos seminíferos y el tejido intersticial que los rodea. Están cubiertos por una capa gruesa ( tónica albugínea, rica en tejido fibroso blando ), que a nivel del borde posterior se engrosa para penetrar en la glándula y formar así un tabique incompleto. Ahí la porción engrosada de la cápsula recibe el nombre de mediastino. Este se encuentra acribillado de conductos revestidos de epitelio, formando el rete testis, en cuyos espacios se vacía el contenido de la luz de los túbulos seminíferos.

La citología de los testículos puede ser dividida en tres áreas:

- 1 ) Túbulos seminíferos : Células de la lámina basal o lámina propia, células de Sertoli y células del epitelio germinal.
- 2 ) Tejido intertubular : Células de Leydig, tejido conectivo y vasos sanguíneos y linfáticos.
- 3 ) Túnica albugínea : Células de tejido fibroso blando.

Los túbulos seminíferos conforman la parte exócrina del testículo. Están limitados por el complejo lamelar basal, carecen tanto de vasos sanguíneos como linfáticos y por consiguiente presentan una hipoxia relativa ( 32 ).

Tienen una secreción de tipo holócrino ( los productos de secreción se acumulan en el interior de los cuerpos celulares, las células se mueren y son expulsadas junto con la secreción que contienen ), cuyo producto final está constituido principalmente por los espermatozoides y el fluido testicular que los acompaña (23).

En el interior de los túbulos seminíferos se encuentran las células de Sertoli o células nutricias y las células del epitelio germinal. La diferenciación de estas últimas constituye el proceso de la espermatogénesis.

Los estudios morfológicos de Clermont ( 21 ) sobre la espermatogénesis de las principales especies de mamíferos, han demostrado una secuencia característica de desarrollo para cada especie, incluyendo una cronología muy exacta del proceso.

La espermatogénesis se divide en tres fases (ver esquema adjunto)

1 ) Replicación de las células primordiales o espermatogonias, que son células somáticas diploides.

2 ) Los procesos meióticos, que incluyen a los espermatocitos primarios y secundarios.

3 ) Espermiogénesis, que consiste en la transformación de células haploides, las espermátidas, cuya última fase son los espermatozoides.

Las células del epitelio germinal reciben diversos nombres de acuerdo con su estadio de diferenciación.

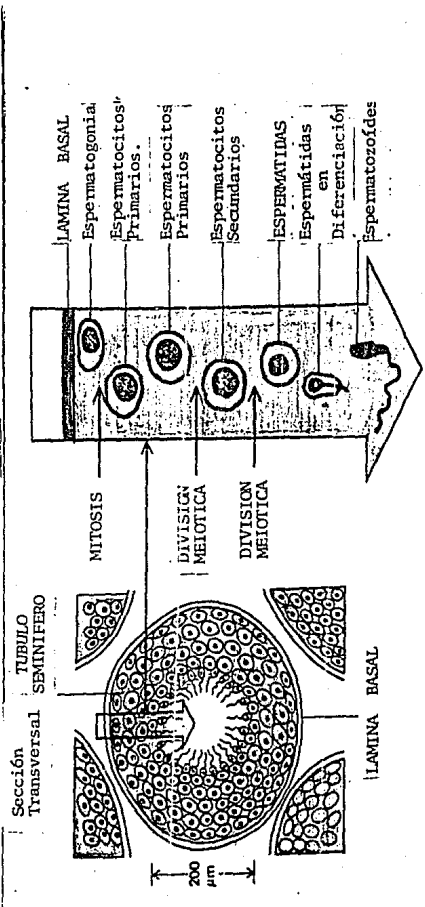
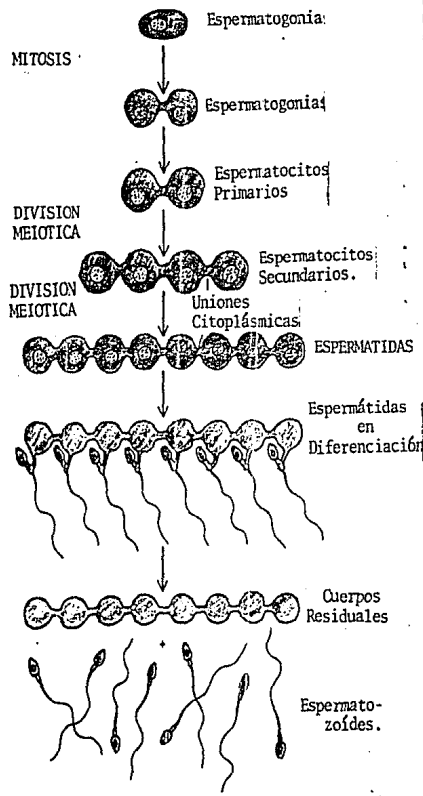
Las espermatogonias son las células más primitivas del epitelio germinal. Localizadas junto a la membrana basal, se han descrito tres tipos de ellas ( A, obscura; Ap clara y B ), basándose principalmente en las diferencias de su estructura nuclear (23).

Después de varias divisiones mitóticas y de la diferenciación de la mayoría de las células hijas, dan lugar a los espermatocitos primarios preleptotenos, que constituyen el comienzo de la larga profase de la primera meiosis. Los cambios morfológicos que muestran los espermatocitos primarios durante esta etapa han permitido distinguir entre ellos diversos estadios definidos : preleptoteno, leptoteno, zigoteno, paquiteno y diploteno (56), que son células tetraploides.

El final de la primera división meiótica ocurre rápidamente y da lugar a los espermatocitos secundarios, que son células diploides.



# Espermatogénesis



Los espermatocitos secundarios son más pequeños que los espermatocitos primarios. Son vistos con poca frecuencia en un corte de testículo, ya que su tiempo de vida es relativamente corto (21,56). Presentan una segunda división meiótica, sin una síntesis previa de ADN, generando las células haploides conocidas como espermátidas. Estas, a través de numerosas modificaciones tanto morfológicas como metabólicas ( en la rata se distinguen 19 fases definidas ) ( 56 ), conocidas bajo el nombre de espermiogénesis, generan los espermatozoides. Estas células terminales son expulsadas al lúmen por la célula de Sertoli, en un fenómeno llamado espermiación.

Durante la espermiogénesis ya no ocurre una división celular. El proceso requiere de una alta coordinación en la reorganización de núcleos y citoplasma junto con el desarrollo del flagelo. Los cambios que suceden pueden ser subdivididos a su vez en las siguientes fases : transformaciones en el núcleo, desarrollo del acrosoma, formación del tallo, redistribución y pérdida del citoplasma y finalmente la espermiación.

Las células de Sertoli se extienden radialmente desde la membrana basal del epitelio seminífero hasta el lúmen del túbulo, y representan del 15 al 20 % de la población celular del testículo.

El citoplasma de las células de Sertoli se extiende entre los espermatocitos y espermátidas formando una red que literalmente "abraza" a las células germinales, creándoles a cada una un microambiente particular.

Conforme se va dando el proceso de diferenciación, aquellas células germinales que están unidas entre sí por puentes intercitoplásmicos emigran sincrónicamente de la base hacia el lumen del epitelio, lo que ha hecho pensar en un control riguroso de la diferenciación a través de las células de Sertoli.

Las uniones herméticas que forman entre sí las células de Sertoli constituyen la barrera hematotesticular, que divide funcionalmente al epitelio seminífero en dos compartimentos. En el más externo se encuentran sólo las espermatogonias. En el interno, a partir de la etapa más temprana de los espermatocitos el resto de las células germinales, aisladas de una irrigación directa ( 21,23 ).

Los túbulos seminíferos están rodeados de tejido conectivo rico en una red vascular acompañada de fibroblastos, macrófagos, pequeños nervios, vasos linfáticos y grupos de células de Leydig.

Fawcett y col. (28) dieron una descripción detallada de la morfología del tejido intersticial, describiendo cuatro patrones básicos de acuerdo con la abundancia de las células de Leydig y las relaciones entre los volúmenes relativos de tejido linfático y conectivo intertubular. Al nacimiento, el tejido intersticial es abundante y es productor de los andrógenos involucrados en el mecanismo que imprime en el cerebro la definición sexual que se expresará en el animal adulto en órganos como el hígado (25), que desarrolla el aparato enzimático para catabolizar las hormonas esteroideas masculinas. En el sexto día de edad de la rata el tejido intersticial involuciona para volver a desarrollarse en la pubertad.

Usando métodos citológicos y marcaje con timidina tritiada, la cinética de la espermatogénesis ha sido estudiada con gran detalle en varias especies de mamíferos (21,23).

Durante los primeros días de edad los túbulos son primitivos y sólo contienen células de soporte (precursores de las células de Sertoli) y gonocitos (precursores de las espermatogonias).




































Después de los 4 días de edad se inicia la proliferación de las células germinales, consistente en una división mitótica diferente a las divisiones simples de las células germinales primordiales durante la migración y establecimiento temprano en las gónadas.

A los 7 días han desaparecido totalmente los gonocitos y a los 12 días de edad aparecen los espermatoцитos más primitivos. En estos animales considerados prepúberes, las células germinales predominantes son las espermatogonias. Entre los 14 y los 16 días se inician los preámbulos de la pubertad(66). La hipófisis secreta la gonadotropina FSH, cuyo blanco principal, la célula de Sertoli, sintetiza las proteínas fijadoras de andrógenos(ABP). De este modo, cuando la hipófisis secreta LH, cuyo blanco es la célula de Leydig, ésta produce andrógenos, parte de los cuales encuentran sus receptores específicos en la célula de Sertoli(92)

En las ratas de 15 a 18 días de edad, las células de Sertoli ya no presentan mitosis(66). Los espermatoцитos muestran estadios más avanzados de maduración, que culminan a los 23 días de edad, en que comienza la aparición de las espermátidas más primitivas.

El proceso de espermiogénesis se completa a los 45 días de edad, en que aparecen los primeros espermatozoides. Este momento se considera el inicio de la madurez sexual en estos roedores. La precisión cronológica con que aparecen los diversos tipos celulares permite seleccionar la población de células que se desea tener presente en forma mayoritaria en el testículo en un momento dado del proceso de maduración. Esto se logra por medio de la selección adecuada de la edad del animal de experimentación, tal como se resume gráficamente en el cuadro sinóptico adjunto .

## Cuadro sinóptico Diferenciación del testículo de la rata

EDAD (días)	UBICACION	TEMPERATURA (°C)	DESARROLLO DEL EPITELIO GERMINAL	DIFERENCIACION MORFOLOGICA MITOCONDRIAS	SINTESIS		
					ADN	ARN	Proteínas
0-6	Abdominal	37	 Espermatogonias primordiales				
10-12 Prepubertad	Abdominal	37	 Espermatoцитos primarios preleptotenos				
14-16 Pubertad (preánbulo)	Comienza el descenso al escroto	36	 Paquitenos primitivos				
21 Pubertad establecida	Escrotal	35	 Paquitenos Tardíos				
26-40 Adolescencia	Escrotal	33	 Espermátidas				
45	Escrotal	33	 Espermatozoides				
60-90 Adultas	Escrotal	33	 Espermatozoides capaces de fertilizar				

(Ref. 1) (Ref. 65) (Ref. 24)

### 1.1.2. Aspectos endócrinos.

A partir de la pubertad ( en la rata , después de los 15 días de edad ) las funciones del testículo son controladas hormonalmente por un sistema complejo de interacciones que incluyen el sistema nervioso central extrahipotalámico, el hipotálamo, la glándula pituitaria y las gónadas (66).

Las gonadotrofinas que regulan la fisiología testicular son dos hormonas proteicas secretadas por la hipófisis : la hormona estimulante del folículo ( FSH ) y la hormona luteinizante (LH).

Durante la pubertad existen cambios en la sensibilidad testicular hacia gonadotrofinas, estimulación y cambios en la biosíntesis de andrógenos e incremento en la producción de testosterona.

La disponibilidad de gonadotrofinas marcadas radioactivamente ha permitido la identificación de los sitios receptores de LH sobre las células de Leydig ( 91 ) y los de la FSH sobre los túbulos seminíferos(60).

La función precisa de la FSH en los procesos de la espermatogénesis parece incierta. Se sabe que la iniciación de la espermatogénesis requiere su presencia, aunque parece no incrementar la velocidad de la misma. La estimulación de las células germinales ocurre a nivel de las espermatogonias.

La FSH juega un papel indirecto en los procesos de esteroidogénesis durante la pubertad. Interviene en el

metabolismo celular de las células de Sertoli, lo cual ha permitido sugerir las probables funciones de éstas dentro de la espermatogénesis, como el ser responsables de mantener la barrera hematotesticular y su relación con el origen del fluido en los túbulos seminíferos.

Los receptores de la FSH, se localizan a nivel de la membrana celular espermatogonial y de la parte basal de las células de Sertoli. El efecto hormonal se traduce en una activación de la adenil-ciclasa y en un decremento en la actividad de la fosfodiesterasa del AMP cíclico ( 21 ).

La LH estimula la actividad de adenil ciclasa en las células de Leydig. La ocupación de sólo una pequeña porción de receptores de LH es suficiente para estimular la producción de testosterona ( 21 ). Los efectos de la LH sobre la espermatogénesis parecen ser mediados a través de la estimulación de la síntesis de testosterona.

El AMP cíclico media los efectos de la LH sobre la esteroidogénesis. Las células de Leydig del testículo de rata contienen 2 formas de protein-cinasas dependientes de AMP cíclico.

Algunos eventos nucleares pueden estar asociados a la forma en que estimula la LH. La síntesis continua de una(s) proteína(s) con una vida media corta es necesaria para la acción de la LH ( 24 ).

Aunque la literatura acumulada en relación con los aspectos endócrinos del testículo es sumamente voluminosa, no existe



ningún informe en el que se relacione un efecto directo de las hormonas sobre la pirofosfatasa inorgánica. En el inciso sobre metabolismo testicular se señalan algunas correlaciones indirectas que pueden inferirse.

### 1.1.3. Metabolismo testicular

En los estudios relacionados con el metabolismo del testículo tradicionalmente se ha considerado que el problema fundamental en la interpretación de los resultados es la heterogeneidad de los tipos de células presentes en la población que constituye la gónada (1).

Este hecho ha empujado a numerosos autores a considerar que el fenómeno metabólico que se estudia puede corresponder al tipo celular más abundante en la etapa de diferenciación que se esté observando. En términos generales es importante subrayar la influencia que pueden tener para un aspecto determinado del metabolismo testicular: el aporte sanguíneo limitado, con la consecuente hipoxia relativa, y la temperatura fisiológica en que se encuentra, dada su ubicación escrotal.

En lo que toca al epitelio germinal, a estos factores se suma la situación de aislamiento en que se desarrolla, debido a la barrera hematotesticular. El hecho es que en la literatura científica se han ido acumulando informes sobre isoenzimas específicas del testículo, en acuerdo con las predicciones hechas hace más de quince años ( 32 ).

Para hacer más complejo el panorama, el metabolismo testicular sufre cambios muy marcados a través de la maduración de la gónada (32,33) muchos de ellos bajo una influencia hormonal ( 92 ). Así, a diferencia del testículo inmaduro, el adulto parece depender en forma absoluta de la glucosa como sustrato exógeno. En la rata, sus reservas de carbohidratos son prácticamente nulas. Se ha sugerido que es capaz de oxidar lípidos, lactato y glucosa, aunque no deja de ser peculiar que sólo el 20 % de ésta se convierta en  $CO_2$ . El ciclo de las pentosas tiene una actividad modesta, particularmente en el estado adulto ( 32 ).

Presenta el testículo una glicólisis muy activa, tanto en anaerobiosis como en aerobiosis (32,36), y existen evidencias que apuntan al funcionamiento del ciclo de los ácidos tricarbóxicos. Sin embargo, se ha sugerido que el ciclo pudiera tener importancia como proveedor de metabolitos generadores de aminoácidos, de purinas y pirimidinas, útiles en la síntesis de macromoléculas (32 ).

La glucosa parece ser indispensable para apoyar la síntesis de ATP (61 ) cuya concentración en este órgano es casi tan alta como en el cerebro.

Una parte del ATP es producida por la vía glicolítica y otra es generada por la mitocondria. A pesar de que se ha demostrado que una parte de la ATPasa mitocondrial testicular está laxamente unida a la membrana (94 ), el resto funciona como ATP sintetasa. En preparaciones mitocondriales de hígado de rata la

relación entre ATPsintetasa: ATPasa es del orden de 30: 1, mientras que en sus homólogas de testículo es de 3: 1.

En el campo de la bioenergética, la interrelación entre los compartimentos intra y extramitocondriales tampoco es clara. En animales inmaduros el testículo presenta un efecto Crabtree (32), que consiste en la inhibición del consumo de oxígeno por la adición de glucosa. Este efecto desaparece en el adulto. Tanto en ratas inmaduras como en adultas el efecto Pasteur es tan sólo de un 60 % ( 90 ). Por último, correspondiendo a una diferenciación morfológica del organelo, previamente descrita (93), recientemente se ha encontrado una verdadera diferenciación funcional de la mitocondria (27). La fosforilación oxidativa es más activa en animales prepúberes que en adulto, la mitocondria de animales prepúberes presenta diferente proporción entre las deshidrogenasas isocitricas dependientes de  $NADP^+$  y  $NAD^+$  que la hallada en mitocondrias de testículo maduro, la citocromo c oxidasa muestra una caída dramática en su actividad durante la pubertad ( 27 ). A partir de la proliferación de los espermatocitos primarios, las mitocondrias presentan una isoenzima peculiar de la deshidrogenasa láctica (LDH-X) (32) y en testículo adulto se ha descrito un citocromo c diferente del citocromo c de las células somáticas ( 19 ).

Todo este conjunto de datos que aporta la literatura sugiere que el testículo puede valerse de caminos alternos para producir energía y que estas vías son variables dependiendo del estadio de maduración del órgano.

En lo que toca a la síntesis de macromoléculas el panorama es interesante, ya que principalmente en la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas el pirofosfato inorgánico juega un papel importante en conjunción con la pirofosfatasa inorgánica, como se detalla en el inciso 1.2.

En testículo de ratón se ha encontrado una mayor velocidad de síntesis de ARN durante la etapa de diplotenos, en relación con la encontrada durante las etapas de leptotenos y zigotenos. Según ese estudio durante la espermiogénesis ya no se detectó síntesis de ARN ( 34 ).

Dado que la síntesis de proteínas parece continuar hasta etapas avanzadas de la espermiogénesis, se concluyó que es probable que se realice sobre moléculas de ARN previamente sintetizadas ( 34 ).

En cuanto a la síntesis de ADN, ésta se realiza en la profase de la primera meiosis, lo que da por resultado que los espermatocitos primarios sean células tetraploides ( 1 ). La síntesis de ADN no se ha demostrado ni en espermatocitos secundarios, que son células diploides, ni en las espermatidas, que son células haploides. En ambos tipos celulares ya no se sintetiza el ADN, excepto en las mitocondrias ( 39 ).

## 1.2. PIRÓFOSFATO Y PIRÓFOSFATASAS INORGANICOS (E.C.3.6.1.1)

El pirofosfato inorgánico ( PPI ) existe en las células ya sea como sustrato o como producto de numerosas reacciones que ocurren en diversos caminos metabólicos y en varios compartimentos intracelulares(5,37,82). Actúa como un agente quelante con una alta afinidad para iones metálicos divalentes, por lo que en forma libre inhibe a las enzimas activadas por estos iones, tales como la glucosa-6-fosfatasa y la fosfatasa alcalina ( 10,15,17,29 ).

En este contexto, la concentración intracelular de PPI puede ser significativa como un efector metabólico para algunas reacciones enzimáticas(37,88)por lo que las enzimas que rompen el PPI juegan un papel importante en la regulación de los procesos metabólicos (2,35,50). Una estimación aproximada de dicha concentración intracelular fué realizada por Guynn y col. (37) obteniendo valores de 1.7 nmol/g tejido húmedo de PPI libre en el citoplasma de hígado de rata.

En muchos organismos se ha demostrado el papel biológico del pirofosfato (5,44,82) y la importancia de éste en la mayoría de las reacciones anabólicas. Sin embargo, hace algunos años se consideraba que el PPI formado en la mayoría de los caminos anabólicos no tenía relevancia, considerándosele como un producto de desecho. Por otra parte, un conjunto de evidencias han permitido entender el papel del pirofosfato en el metabolismo de algunos organismos tanto procariontes como eucariontes (82), en

forma de donador de energía y dando la direccionalidad a ciertas reacciones, como se describe más adelante.

El PPI es producido en un sinnúmero de reacciones, incluyendo la activación de los aminoácidos por las amino-acil ARNT sintetetas, la activación de los ácidos grasos por la tiocinasa a partir de ésteres de acil-CoA, la activación de los carbohidratos por la uridil transferasa ,etc.(37). En las células de mamíferos, *in vitro* ( 12,78,89 ), es un producto común en el metabolismo de grasas, como es la conversión de acetato a acetyl CoA, vía acetyl-CoA sintetasa y la activación de los ácidos grasos de cadena mediana y larga ( acil-CoA ligasa ). Asimismo, participa en la síntesis de urea a través de la actividad de arginosuccinato sintetasa y en la síntesis de glucógeno a través de la UDP-glucosa pirofosforilasa.

Además, el PPI puede ser sustrato en reacciones catalizadas por la pirofosfatasa inorgánica ( EC 3.6.1.1.) y reacciones de transfosforilación catalizadas por la glucosa-6-fosfatasa y la fosfatasa alcalina (72 ). Se ha encontrado que el PPI puede ser el donador único de fosfato para la formación de fosfoenolpiruvato a través de la acción de la fosfopiruvato carboxilasa en la bacteria ácido-propiónica (99).

Con respecto a la distribución subcelular del PPI se puede relacionar de acuerdo con las reacciones en las que interviene. Por ejemplo, la activación de ácidos grasos ocurre en la mitocondria, la activación de aminoácidos, la uridino-fosfato glucosa pirofosforilasa y la FAD pirofosforilasa están presentes en el citosol y la cohil-CoA sintetasa se encuentra en la

fracción microsomal. De lo anterior se desprende que el papel metabólico de este compuesto en varios tejidos y fracciones subcelulares es de interés considerable.

En 1966, Baltscheffsky ( 3 ) informó que el PPI tiene un papel en la formación de polifosfatos, además de funcionar como un intermediario en la transferencia de grupos fosfato en microorganismos.

Comparándolo con el ATP, el PPI se forma más rápidamente por la respiración en *Acetobacter suboxydans* y en extractos libres de células en *Escherichia coli* (40). Por otro lado, la fosfoenolpiruvato carbocinasa aislada de bacterias ácido propiónicas utiliza exclusivamente el PPI como donador de fosfato (99 ). Más tarde se observó que el PPI puede estar directamente relacionado con la respiración, tanto en el metabolismo de organismos inferiores como superiores (54,58,82).

El PPI puede tener en algunas reacciones bioquímicas una función similar a la del ATP ( 98 ). Mansurova, en 1975, estudió la posibilidad de la formación de PPI y su utilización para la síntesis de ATP en las mitocondrias de hígado de rata ( 57 ).

El PPI reemplaza al ATP como fuente de energía en ciertas reacciones de la fermentación en *Entamoeba histolytica* y en *Propionibacterium shermanii* ( 98 ).

El PPI se ha considerado como una fuente de energía debido a su enlace de alta energía. Diversos autores citados por Flodgaard (30 ) han intentado entender el papel del PPI y han señalado la importancia de obtener datos termodinámicos exactos

sobre su hidrólisis, particularmente en las condiciones de pH y de fuerza iónica que prevalecen en la célula.

En la ausencia de cationes divalentes la energía libre de hidrólisis de PPI es cercana a la de los enlaces  $\beta$  o  $\gamma$  del ATP. En presencia de iones magnesio el  $\Delta G^\circ$  para la hidrólisis del PPI es relativamente menos negativo (ya que el producto de esta hidrólisis es diferente a la del ATP por no estar tan fuertemente quelado con  $Mg^{2+}$ ), debido a una afinidad diferente de ambos sustratos por el  $Mg^{2+}$ . Es decir, se explica porque es más fuerte la unión  $ATP-Mg^{2+}$  que la unión  $PPI-Mg^{2+}$ .

La energía libre de hidrólisis del PPI en el hígado de la rata fue estimada por Nordlie y col. ( 71 ) en  $-4$  kcal / mol, mientras que Wood ( 78 ) dió una estimación de  $-5.27$  kcal / mol.

En bacterias fotosintéticas como *Rhodospirillum rubrum* ( 49 ) el PPI es un donador de energía para la reducción del citocromo b (4) la transhidrogenación de los piridín nucleótidos, la reducción del  $NAD^+$  y la síntesis de ATP ( 49 ).

En hígado de rata (43), en el paso de la glucosa a glucosa-6-fosfato y de la fructosa-6-fosfato a fructosa-1,6-difosfato, las concentraciones de metabolitos parecen estar controladas por las relaciones  $PPI/PI$ .

En amibas parásitas ( 82 ) existen varias cinasas dependientes de PPI. Tres o cuatro funcionan en el camino glicolítico y otra en relación con el metabolismo del acetato.

Además de haber una gran concentración de pirofosfato intracelular, el consumo neto de PPI por glicólisis es de 1.0



mol / mol de glucosa convertida a piruvato. El organismo puede conservar todo el PPI generado por procesos anabólicos y esta cantidad ser insuficiente para mantener continua la glicólisis. El PPI adicional puede provenir de otras fuentes. Invariablemente en los organismos aeróbicos existen algunas reacciones reversibles que conservan la energía del PPI.

La concentración intracelular de PPI depende principalmente de la actividad de pirofosfatasa inorgánica (88).

Se ha descubierto un número considerable de sistemas enzimáticos parecidos a la ATPsintetasa, en los que la energía del proceso sintético es incrementada a expensas de la ruptura del enlace  $\beta$ -anhidrido, como en la molécula de ATP.

La presencia de enzimas que catalizan la hidrólisis de pirofosfato inorgánico ( PPI ) se considera generalizada en la escala filogenética.

La pirofosfatasa inorgánica juega un papel importante en dirigir las reacciones anabólicas, catalizando las hidrólisis del PPI formado (51). Posteriormente, el ortofosfato producido contra varios procesos químicos incluyendo la glicólisis y la respiración, de ahí la importancia regulatoria de las pirofosfatasas (51,52).

Las pirofosfatasas pueden ser dependientes o no de  $Mg^{2+}$  (43). Sin embargo la mayoría lo son (81).

Se han examinado las pirofosfatasas básicamente en el núcleo (16), en la mitocondria (57,70) y en la fracción microsomal del

hígado de la rata (71) ; en levadura (16) , en eritrocitos (85) y en el cerebro de la rata (16) .

Los estudios sobre la distribución subcelular de la actividad de pirofosfatasa inorgánica han sido escasos. Hay informes relativos a páncreas de paloma (77) y a hígado de rata (69) . En ambos estudios la mayor actividad se localizó en el citosol, siendo superior al 90 % .

Posteriormente los estudios se encaminaron a la caracterización de la pirofosfatasa inorgánica citosólica en hígado de rata (37) , hígado de ratón (43) y la correspondiente a la fracción microsomal de hígado de rata ( 71 ) . Por otra parte se ha estudiado el posible papel de la pirofosfatasa mitocondrial en los sistemas transductores de energía (53) . Se han caracterizado dos tipos de ellas: una en la membrana y otra en la matriz mitocondrial ( 57,58 ) .

También se han realizado estudios referentes al papel de las pirofosfatasas bacterianas como fuente de energía (51) en los procesos de fotosíntesis ( 3 ) , sistema transportador de electrones (67), síntesis de ATP (49,73), formación del potencial de membrana (6,80) y algunas reacciones en las cuales el PPI reemplaza al ATP ( 98 ) .

Se ha estudiado detalladamente la pirofosfatasa inorgánica de levadura ( 16 ) , de *Escherichia coli* ( 48 ) y recientemente se publicó una revisión sobre las pirofosfatasas inorgánicas microbianas ( 55 ) .

En lo que toca al reino vegetal, se ha encontrado actividad

de pirofosfatasa inorgánica en hoja de maíz ( 10 ). En plantas superiores se ha relacionado con la respiración y la fosforilación oxidativa ( 54 ).

Parece evidente la ubicuidad de la actividad de pirofosfatasa inorgánica. Sin embargo, hasta donde sabemos no ha sido estudiada en un tejido durante el proceso de su diferenciación.

Ya que el testículo de la rata provee un modelo de diferenciación celular con cronología definida, decidimos encaminar nuestro estudio a resolver las siguientes preguntas :

- 1 ) ¿ Qué características presenta la actividad testicular de pirofosfatasa inorgánica ?
- 2 ) ¿Cuál es su localización intracelular en el testículo ?
- 3 ) ¿ Varía la actividad durante la diferenciación del epitelio germinal ?

## MATERIAL Y MÉTODOS

### 2.1. Determinación de fosfato inorgánico.

Para determinar el fosfato producido en la reacción enzimática catalizada por la pirofosfatasa inorgánica se empleó el método de Bonting y col. ( 14 ) modificado por Delhumeau-Ongay y col. ( 26 ).

El fosfato inorgánico forma un complejo de color azul con un reactivo de molibdato de amonio en ácido sulfúrico y sulfato de fierro. El complejo colorido, de fosfomolibdato de amonio, sigue la ley de Lambert y Beer y es estable durante 20 horas.

El reactivo fue preparado inmediatamente antes de su uso, agregando 4.0 g de  $\text{FeSO}_4$  a 100 ml de solución de heptamolibdato de amonio (  $(\text{NH}_4)_7\text{Mo}_7\text{O}_{24}$  ) al 1 % en  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1.15 N.

En cada experimento, además de la determinación del contenido de Pi en las muestras, se incluyó una curva estándar. Esta consistió en 8 tubos, con concentraciones crecientes de fosfato disódico ( 0 a 25  $\mu\text{g}$  de fósforo ), 0.5 ml de  $\text{HClO}_4$ , a una concentración final de 5.2 % , 1.5 ml del reactivo arriba señalado y el volumen de agua desionizada necesario para tener un volumen total de 3.0 ml.

La cantidad de fosfato inorgánico producido en la reacción enzimática fue determinada en 1.5 ml del problema ( que contenía  $\text{HClO}_4$  ) y se adicionó 1.5 ml del reactivo. Se dejó

desarrollar el color durante 20 minutos, y se determinó la absorbencia de las muestras problema y de la curva estándar a 700 nm. en un espectrofotómetro Pye Unicam.

Para poder tener valores de absorbencia confiables y un valor pequeño en el blanco de la curva estándar de Pi, los tubos utilizados en el ensayo fueron previamente enjuagados alrededor de 15 veces con agua destilada para eliminar la presencia de fosfato remanente del lavado usual con detergentes.

## 2. Preparación de partículas subcelulares de testículo de rata.

Se utilizaron ratas albinas machos, de la cepa Sprague Dawley. El número de animales utilizados en cada experimento varió, de acuerdo a la tabla 1, para obtener alrededor de 2.5 g de tejido húmedo.

Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical y decapitados para desangrar al máximo posible. Los testículos fueron extraídos rápidamente y colocados en un vaso de precipitados conteniendo el medio siguiente (medio "A"): sacarosa 250 mM, TEA 3.0 mM y EDTA 0.1 mM a pH 7.4, a 0 °C; posteriormente se desecharon la túnica albugínea y la arteria espermática. Se colocaron los testículos en un vaso con medio "A" frío, previamente pesado. Por tara diferencial se calculó el peso húmedo de tejido testicular. Se procedió a picar finamente el tejido con unas tijeras. Todas las operaciones siguientes se realizaron en hielo, a menos que se indique otra temperatura.

T A B L A I

NUMERO DE RATAS DE LA CEPA SPRAGUE DAWLEY  
UTILIZADAS EN CADA EXPERIMENTO

EDAD (días)	11	14	16	21	26	40	60 a 90
NUMERO -- DE RATAS	50	45	40	18	15	4	1 a 2

El homogeneizado total se obtuvo en un aparato de Potter-Elvehjem, con 4 a 5 golpes de vástago, para preservar las estructuras subcelulares. Se adicionó el volumen de medio "A" suficiente para lograr una concentración final de tejido al 10 % ( P/V ). El homogeneizado se filtró a través de lana de vidrio.

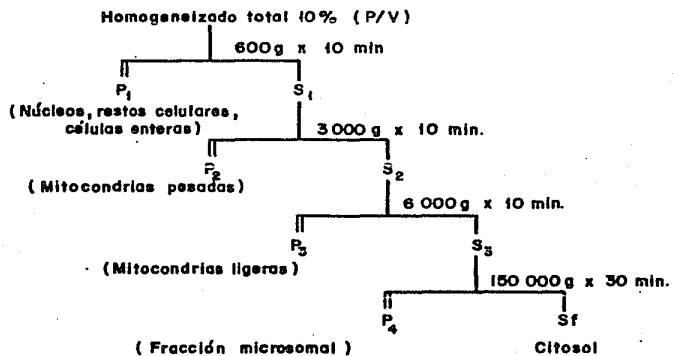
2.2.1. La obtención de las fracciones subcelulares se llevó a cabo según el esquema de centrifugación diferencial adjunto.

Las 3 primeras centrifugaciones se realizaron en una centrifuga refrigerada Internacional, modelo PR-2, dotada de un rotor excéntrico # 296. La centrifugación a 150 000 g se llevó a cabo en una ultracentrifuga Beckman-Spinco, modelo LB-M, en un rotor 50 - Ti .

Cuando se intentó dilucidar si la actividad encontrada en las fracciones subcelulares particuladas era intrínseca o se debía a una contaminación de la fracción soluble ( citosol ), se procedió a emplear una de las dos estrategias que se describen a continuación.

2.2.2. Tanto la pastilla P<sub>2</sub> como la P<sub>3</sub> fueron lavadas una vez, resuspendiéndolas en un volumen aproximado de 2.0 ml. De ahí se tomó una alícuota de 1.0 ml para la determinación enzimática, mientras que la alícuota restante se resuspendió en su volumen original de medio "A" y fue centrifugada a la misma velocidad y tiempo empleados para obtenerla. Cada una de las pastillas fue resuspendida en un volumen original de 1.0 ml de medio "A" y ahí se determinó la actividad enzimática.

**ESQUEMA DE FRACCIONAMIENTO DE PARTICULAS SUBCELULARES  
DE TESTICULO DE RATA POR CENTRIFUGACION DIFERENCIAL**





**2.2.3.** El sobrenadante de P<sub>i</sub> fue centrifugado a 6 000 g. La pastilla resultante se resuspendió en un volumen de 2.0 ml ; 1.0 ml se empleó para la determinación de la actividad de pirofosfatasa inorgánica y el 1.0 ml restante se llevó al volumen de medio "A" en el cual se obtuvo la pastilla a 6 000 g la primera ocasión. Se repitió la centrifugación a 6 000 g. El sobrenadante fue descartado y la pastilla nuevamente se resuspendió en 2.0 ml. Se tomó una alícuota de 1.0 ml para determinar la actividad y el resto se llevó de nuevo al volumen original con medio "A". La operación se repitió una vez más. La pastilla final fue resuspendida en un volumen de 1.0 ml de medio "A".

En cada una de las muestras se determinó la actividad de pirofosfatasa inorgánica así como la de una enzima marcadora del citosol ( Glucosa -6-fosfato deshidrogenasa ) y una marcadora de la fracción mitocondrial ( Deshidrogenasa isocítrica dependiente de NAD<sup>+</sup> ).

## **2.3. Ensayos enzimáticos**

### **2.3.1. Determinación de pirofosfatasa inorgánica**

En los experimentos iniciales se utilizó el método descrito por Delhumeau-Ongay y col (26). La actividad enzimática se expresó como  $\mu\text{moles de fosfato inorgánico producido} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$  de tejido húmedo o como  $\mu\text{moles de fosfato inorgánico producido} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  de proteína ( actividad específica ).

Los tubos de incubación contenían el volumen correspondiente a 3 alícuotas del medio de incubación (0.5 ml/alícuota) y fueron procesados por duplicado o triplicado. La reacción enzimática fue iniciada al adicionar el pirofosfato al medio de incubación.

Los tiempos cero contenían el volumen correspondiente a una alícuota y se procesaron separadamente por duplicado, agregando  $\text{HClO}_4$  al 6 % antes de agregar el sustrato. El valor de fosfato inorgánico determinado en los tiempos cero se restó de cada uno de los valores obtenidos a los distintos tiempos en que se midió la actividad de la enzima.

Las condiciones óptimas para la determinación de la actividad de pirofosfatasa inorgánica se detallan en el capítulo de " Resultados ".

A los tiempos indicados cada alícuota fue depositada en tubos que contenían 2.5 ml de  $\text{HClO}_4$  al 6 % a 0 °C.

Después de dejar reposar los tubos alrededor de 15 minutos a 0 °C para favorecer la precipitación total de las proteínas, se centrifugaron en una centrifuga Internacional refrigerada PR-2 durante 10 minutos a 2,500 rpm. Se decantó el sobrenadante y se tomó una alícuota de 1.5 ml para determinar el fosfato inorgánico producido en la reacción.

### 2.3.2. Determinación de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa

Se midió la actividad enzimática según el método de

Bergmeyer ( 11 ), bajo condiciones de velocidad inicial. Se determinó la absorbencia del NADPH producido en la reacción a 340 nm, en un espectrofotómetro Pye Unicam provisto de un registrador automático. La celdilla contenía :  $\text{NADP}^+ \text{NaH}_2$  0.5 mM , glucosa-6-fosfato 0.67 mM, 50  $\mu\text{l}$  de preparación enzimática (aproximadamente 500  $\mu\text{g}$  de proteína), TEA 40 mM, pH aparente de 7.4 , en un volumen final de 1.0 ml, a temperatura ambiente.

### 2.3.3. Determinación de deshidrogenasa isocítrica - $\text{NAD}^+$

Se midió la actividad enzimática según el método de Plaut (76), bajo condiciones de velocidad inicial. Se determinó la absorbencia del NADH producido en la reacción a 340 nm, como en el caso anterior. La celdilla contenía :  $\text{NAD}^+$  0.33 mM, isocitrato de sodio 5.33 mM, ADP 0.67 mM,  $\text{MnCl}_2$  1.33 mM, 25  $\mu\text{l}$  de preparación enzimática (aproximadamente 250  $\mu\text{g}$  de proteína ), tris-acetato 33.3 mM, pH aparente de 7.2, en un volumen final de 1.0 ml, a temperatura ambiente.

## 4. Determinación de proteína

De todas las fracciones subcelulares obtenidas se conservaron alícuotas a  $-20^\circ\text{C}$  para determinar posteriormente su concentración de proteína por el método de Hartree ( 38 ).

## RESULTADOS

### Determinación de fosfato inorgánico (Pi) en presencia de pirofosfato inorgánico (PPi)

En vista de que se ha informado en la literatura que el PPi (sustrato de la pirofosfatasa inorgánica) interfiere en la determinación de Pi (producto de la reacción) (9,41,42,45,86,97), fue importante definir, en primer término, si se presentaba tal interferencia al emplear el método de Bonting (14), previamente utilizado en el laboratorio para medir Pi.

Según los datos presentados en la figura 1, la absorbencia del complejo colorido es muy semejante en presencia y ausencia de PPi 1 mM. La inhibición máxima observada fue de un 6.5 %, a una concentración de Pi de 25  $\mu\text{g} / \text{ml}$  ( 0.2 mM ).

En los experimentos subsiguientes se determinó el Pi por el método de Bonting sin aplicar otra corrección que la substracción sistemática de los valores obtenidos en los tiempos cero, según se detalla en el capítulo de "Métodos".

### Cinética enzimática

Con la finalidad de estudiar las características cinéticas de la pirofosfatasa inorgánica se retomaron los datos preliminares y condiciones obtenidas en un trabajo anterior, Delhumeau-Ongay y col. (26), en un homogeneizado total de testículo de rata adulta, y se procedió a estudiar el efecto de las variables siguientes sobre la actividad enzimática :

tiempo, concentración de sustrato, concentración de enzima, pH, temperatura y metales divalentes.

Con respecto a la variable tiempo (fig 2) la actividad enzimática mostró linealidad hasta 2.5 minutos y alcanzó una meseta a los 5 minutos. Por esta razón, para trabajar siempre en condiciones de velocidad inicial, en experimentos posteriores se determinó la actividad de la enzima a los 30 y 60 segundos.

El efecto de la variación en la concentración de sustrato sobre la actividad enzimática se presenta en la figura 3.

Puede observarse que la velocidad máxima se obtuvo a una concentración de 1.0 mM. En cambio a 10 mM fue 30 % menor que aquella. En vista de que se ha descrito que el complejo  $\text{PPi-Mg}^{2+}$  es el verdadero sustrato de la enzima (30,63), pensamos que esta baja en la actividad podría deberse al hecho de haber alterado la estequiometría  $\text{PPi-Mg}^{2+}$ .

Esta posibilidad se exploró estudiando, en primer término, el efecto de la variación de  $\text{Mg}^{2+}$  a una concentración fija de  $\text{PPi}$  (1.0 mM) (fig 4) y después variando simultáneamente la concentración de  $\text{PPi}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  (tabla 2).

Además de confirmar el requerimiento del ión  $\text{Mg}^{2+}$ , observamos que la actividad se mantuvo en niveles comparables mientras la relación entre las concentraciones de  $\text{PPi}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  fuera 1:1 o hubiera predominio del segundo. Esto podría interpretarse como una ligera inhibición por la presencia de  $\text{Mg}^{2+}$  libre debida a la acción del catión sobre la enzima. Por otra

parte, el aumento de  $\text{PPi}$  con respecto al  $\text{Mg}^{2+}$  produciría la inhibición de la enzima por competencia con el verdadero sustrato ( $\text{PPi} - \text{Mg}^{2+}$ ). En cambio en la relación 5:1 ó 10:1 la actividad disminuyó considerablemente.

La figura 5 muestra el efecto de la variable "concentración de enzima" sobre la actividad. Al graficar los datos experimentales se obtuvo linealidad hasta 0.25 mg de proteína, por lo que en experimentos posteriores se eligió un volumen de 0.05 ml (aprox. 0.25 mg de proteína) por 0.5 ml de medio de incubación para el ensayo. Esto concuerda con lo observado en la fig. 3, que para 0.25 mg el máximo de actividad es a una concentración de 1.0 mM. de pirofosfato.

A continuación se realizó el estudio del efecto de la variación del pH sobre la actividad enzimática. La curva presentó un máximo de actividad a pH 7.5. A pH más alcalino fue disminuyendo, pero aún fue considerable a pH 9.0 (fig 6).

Con el fin de observar la estabilidad de la enzima frente a cambios de temperatura se midió la actividad de la pirofosfatasa inorgánica a 37°C, después de preincubar durante 30 minutos a temperaturas diversas: 0, 10, 20, 30, 33, 35, 37, 39, 41 ó 50 °C (fig 7).

La actividad se fue incrementando conforme aumentó la temperatura de preincubación, lo cual sugiere que la enzima es estable a temperaturas elevadas y sensible a las temperaturas bajas.

El experimento en el que se estudió el efecto de la variación en la temperatura sobre la actividad enzimática se presenta en la figura 8a.

Al medir la actividad de pirofosfatasa inorgánica, realizando una preincubación a 37°C durante 5 minutos y posteriormente una segunda preincubación a 0, 10, 20, 30, 33, 35, 37, 40, 50 ó 60°C durante 5 minutos, se observó una actividad siempre creciente. La gráfica de Arrhenius ( fig. 8b ) construida con los datos de la figura 8a, muestra un punto de quiebre a los 20 °C. Los valores de energía de activación de la enzima fueron -26.7 Kcal / mol por encima del punto de quiebre y -28.5 Kcal / mol por abajo del punto de quiebre.

El hecho de que el punto obtenido a 60°C ( fig. 8a ) estuvo por debajo de la línea exponencial podría deberse a que se sabe que el pH se altera con la temperatura ( el pK del Tris cambia - 0.028 unidades de pH/°C ) (75) y en nuestras condiciones no se realizó el ajuste correspondiente.

En un estudio cinético realizado por Moe y col. en levadura (64), los autores presentan un modelo en el cual el  $Zn^{2+}$  tiene un papel dual, uno como activador de la enzima, en calidad de ión  $Zn^{2+}$  libre y uno de sustrato, formando el complejo  $PPi-Zn^{2+}$ . Por tal motivo decidimos probar la respuesta de la pirofosfatasa inorgánica en un homogeneizado total, a diferentes concentraciones de  $Zn^{2+}$ . En nuestro sistema no encontramos actividad en un rango de concentración de 0.1 mM a 10 mM de  $Zn^{2+}$  con una concentración de 1.0 mM de  $PPi$ . (figura 9). Igual resultado negativo se obtuvo en presencia de  $Ca^{2+}$ , es decir el

$\text{Ca}^{2+}$  no forma un verdadero sustrato con el PPI, tal como lo hace el  $\text{Mg}^{2+}$ , lo cual concuerda con el papel inhibitorio que se le ha atribuido a este ión metálico divalente ( 7,74,95 ).

En función de los resultados arriba detallados, las condiciones del ensayo enzimático que se eligieron para estudios posteriores se resumen en la tabla 3.

En un trabajo anterior del laboratorio ( 94 ) se informó que la albúmina de suero de bovino ( BSA ) al 1 % afecta la respiración de las mitocondrias de testículo de rata, estimulando la del estado 3 e inhibiendo la del estado 4. Además, aumenta la actividad de la ATP sintetasa. Por ello se exploró el efecto de la BSA sobre la pirofosfatasa. Ni la adición de albúmina ( 1 % ) al medio de homogeneización, ni su adición directa al medio de incubación al medir la actividad, tuvieron un efecto significativo sobre la pirofosfatasa inorgánica ( Tabla 4 ).

#### Distribución subcelular de la actividad de pirofosfatasa inorgánica

Con el fin de estudiar la distribución subcelular de la actividad de pirofosfatasa inorgánica, se llevó a cabo un ensayo enzimático de acuerdo con las condiciones resumidas en la Tabla 3 y empleando el esquema de centrifugación diferencial señalado en el capítulo de "Material y Métodos".

La mayor actividad ( 90 % ) se localizó en el citosol, mientras que el porcentaje restante correspondió a las fracciones particuladas. Aunque un 8 % correspondió a la fracción nuclear,



es posible que la actividad encontrada en esa fracción se deba fundamentalmente a las células no fragmentadas y restos citosólicos contaminantes.

La actividad mitocondrial detectada no pareció asociarse preferentemente con mitocondrias pesadas o ligeras (0.9 % en cada una de ellas) y en cuanto a la fracción microsomal, presentó una actividad aún menor, como puede apreciarse en la figura 10 y en la tabla 5. En la misma tabla se expresan además los datos como  $\mu\text{moles Pi} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  de proteína. Al expresar los resultados por  $\text{mg}$  proteína (actividad específica) se conserva el patrón de distribución subcelular, localizándose en la fracción citosólica la mayor actividad específica de pirfosfatasa inorgánica; se observa que los valores correspondientes a las fracciones subcelulares mitocondriales, a pesar de ser bajos, son relativamente constantes, lo cual sugiere la posibilidad de que se trate de una actividad mitocondrial.

Sin embargo, para poder determinar si se debía a una contaminación citosólica se procedió a lavar la pastilla obtenida a 6 000g de acuerdo con el esquema de centrifugación. Se expresan los datos de 4 experimentos como  $\mu\text{moles Pi} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$  de tejido húmedo y como  $\mu\text{moles Pi} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  de proteína. Se observa que el valor promedio de la actividad de la pastilla a 6 000 g lavada una primera vez disminuyó hasta en un 75 %; posteriormente al lavar una segunda vez la actividad disminuyó un 10 % más, quedando un 15 % de la actividad original con una desviación estándar pequeña (tabla 6).

Debido a las bajas actividades encontradas, se estimó pertinente realizar un experimento en donde se cuantificaran simultáneamente la actividad de pirofosfatasa inorgánica y una enzima marcadora de citosol ( glucosa-6-fosfato deshidrogenasa ) ( 11 ) y una enzima marcadora de mitocondrias ( deshidrogenasa isocitríca -  $\text{NAD}^+$  ) ( 76 ).

Es evidente que la actividad de pirofosfatasa inorgánica encontrada en citosol es de origen citosólico, puesto que la enzima marcadora de mitocondrias no tuvo actividad alguna en el citosol. Igual consideración merece la actividad de pirofosfatasa hallada en  $P_2$  3 000 g, ya que la enzima marcadora de citosol no tuvo actividad en esta pastilla. En cambio, la actividad de pirofosfatasa hallada en  $P_2$  6 000 g, tuvo un 1.58 % de contaminación citosólica, motivo por el cual se corrigió el valor encontrado experimentalmente ( tabla 7 ).

Con el objeto de confirmar la existencia de la pirofosfatasa mitocondrial, se hicieron diversos intentos para extraerla. Se utilizó, en primer término, el detergente tritón X-100 a una concentración final de 0.2 % en la suspensión mitocondrial. La presencia del detergente provocó turbidez al tratar de medir el fosfato producido. El efecto se repitió al agregar directamente el tritón X-100 a los tubos de la curva estándar, en medio ácido o a pH neutro, y a menores concentraciones de detergente. Igual interferencia se obtuvo con lubrol PX al 1 % y con saponina en dos condiciones distintas:

- a) 0.25 mg / ml, 30 minutos de incubación a 4 °C.
- b) 1.0 mg / ml, 30 minutos de incubación a 37 °C.

Para evitar este fenómeno se pensó en sonicar la fracción mitocondrial durante tiempos variables. La tabla 8 muestra los resultados de este experimento.

Aunque la actividad basal fue pequeña, posteriormente se incrementó al aumentar el tiempo de sonicación.

El hecho de haberse quintuplicado a los 2 minutos sugiere que en efecto se trata de una enzima mitocondrial que se fué liberando progresivamente con el tratamiento. Cuatro minutos de sonicación, sin embargo, resultaron excesivos.

#### Actividad de pirofosfatasa inorgánica en testículo de rata, a través de la maduración.

Para estudiar el patrón de la actividad de pirofosfatasa inorgánica citosólica a través de la diferenciación del epitelio germinal, fueron seleccionadas 6 edades representativas de etapas definidas de dicha diferenciación, de acuerdo con el cuadro 1.

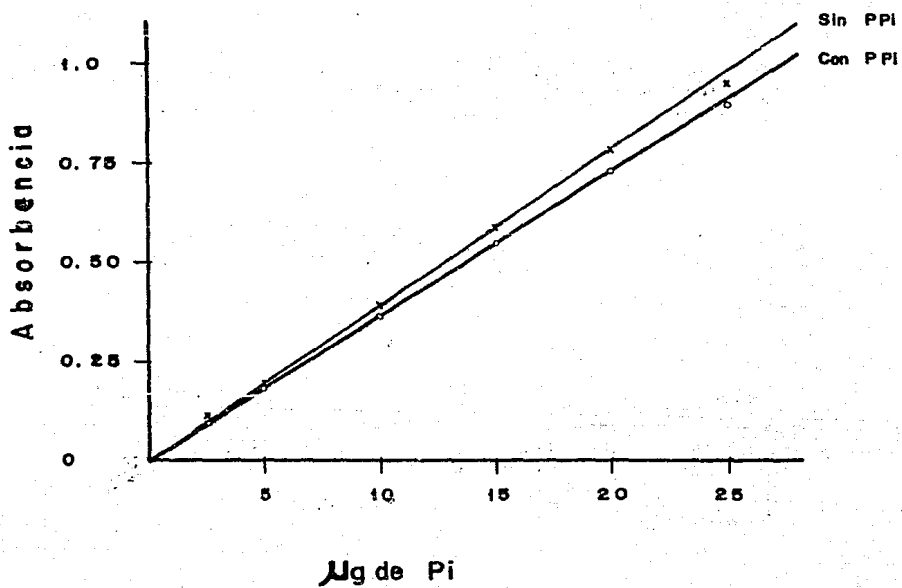
Puede verse en la figura 11 que a los 11 días de edad (prepubertad) la actividad fue significativamente menor ( $0.01 < p < 0.02$ ) que en animales mayores; se incrementó al inicio de la pubertad (14 - 16 días de edad) y una vez establecida se mantuvo en valores constantes.

**Fig 1.- Efecto del pirofosfato de sodio (PPI) 1 mM ,  
en la determinación de fosfato inorgánico (Pi).**

El fosfato inorgánico se determinó según el método señalado en el capítulo de "Material y Métodos". Además del volumen adecuado de una solución estándar de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  ( 50  $\mu\text{g}$  de Pi/ml ), a cada tubo se agregó  $\text{HClO}_4$  a una concentración final de 5.2 % , agua para completar a un volumen de 1.5 ml y 1.5 ml del reactivo de heptamolibdato de amonio en  $\text{H}_2\text{SO}_4$  , que formó un complejo colorido con el Pi ( volumen total: 3.0 ml ).

La absorbencia fue medida 20 minutos después a 700 nm. de longitud de onda. Cada punto representa el promedio de 3 determinaciones. Se muestra una curva representativa de las obtenidas habitualmente.

Figura 1



**Fig 2.- Efecto del tiempo de incubación sobre la actividad de pirofosfatasa inorgánica en un homogeneizado de testículo de rata adulta**

Concentraciones finales en la mezcla de incubación : sacarosa 200 mM, tris 25 mM, EDTA 0.1 mM,  $Mg_2SO_4$  1.0mM,  $Na_2P_2O_7$  1.0 mM, 0.05 ml de preparación enzimática ( 0.25 mg proteína / 0.5 ml de alícuota ), a un pH aparente de 7.5, en un volumen final de 0.05 ml.

La mezcla sin el sustrato fue preincubada durante 5 min. a 37 °C.

La reacción se inició al añadir el sustrato ( pirofosfato de sodio ). Se tomaron alícuotas de 0.5 ml 10 segundos antes de cada tiempo señalado en la gráfica y se detuvo la reacción al agregar la alícuota a 2.5 ml de HClO<sub>4</sub> al 6 % a 0°C.

Cada punto representa el promedio de 3 determinaciones

Figura 2

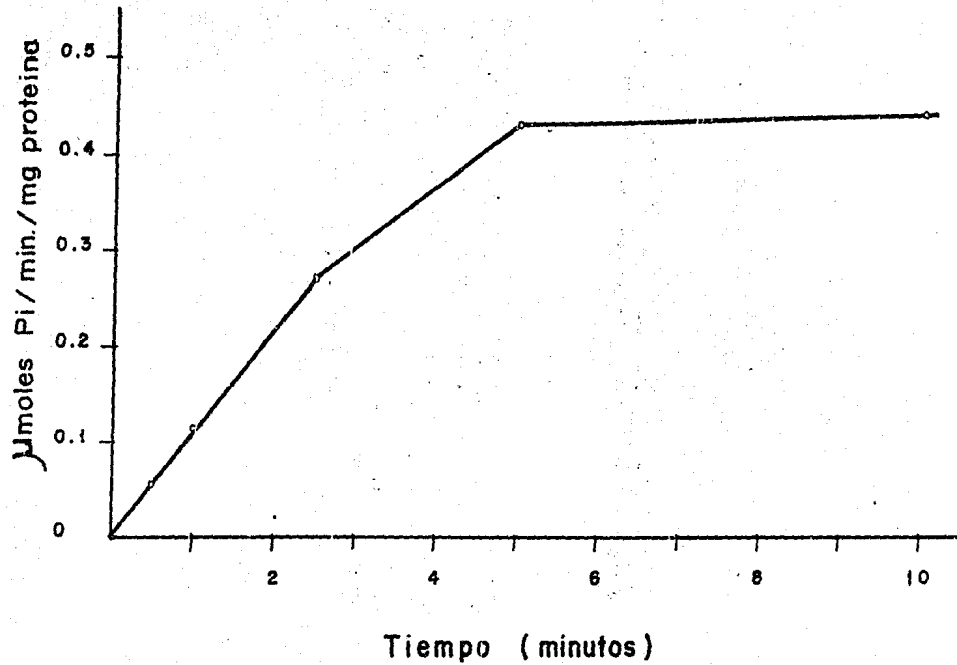
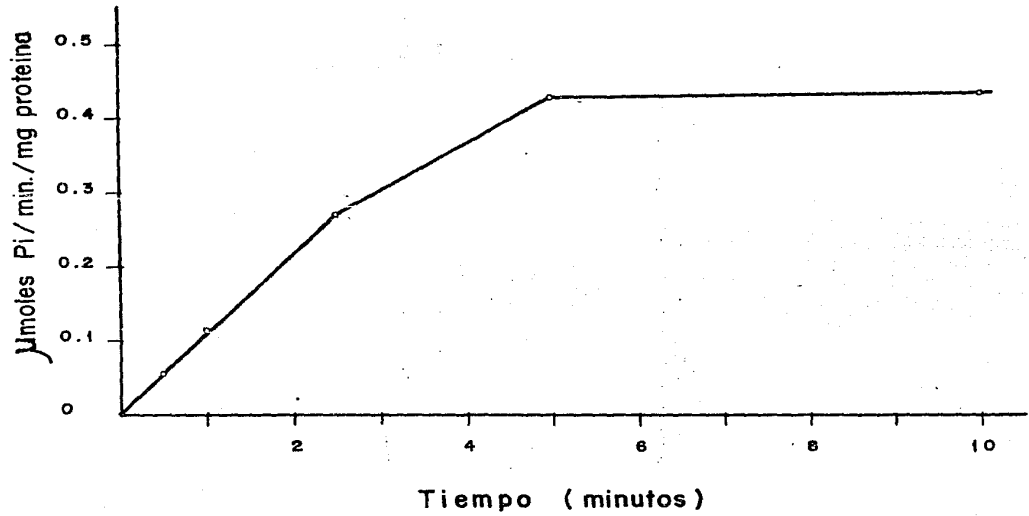


Figura 2





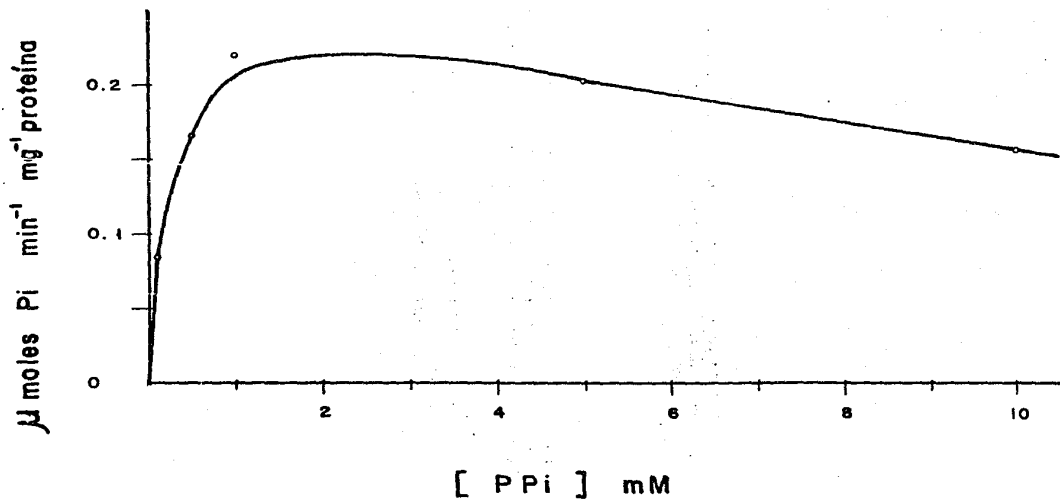
**Fig 3.- Efecto de la concentración de sustrato (PPI) sobre la actividad de pirofosfatasa inorgánica, en un homogeneizado total de testículo de rata adulta.**

Las condiciones empleadas fueron semejantes a las descritas en la figura 2, a excepción de la concentración de  $Mg_2SO_4$ , que se mantuvo a 5.0 mM.

Se varió la cantidad de PPI como se indica. El tiempo de incubación fue de 30 y 60 segundos.

Cada punto representa el promedio de 6 determinaciones.

Figura 3



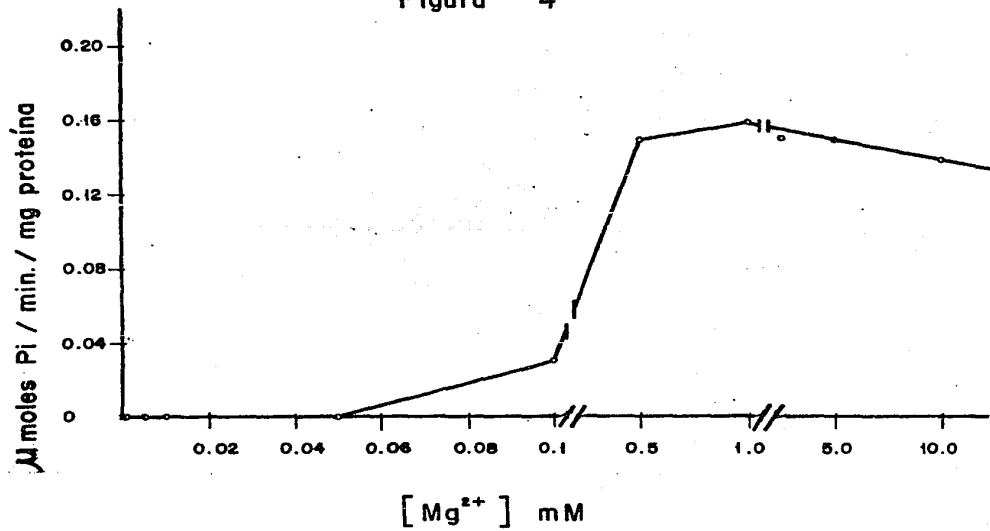
**Fig 4.- Efecto de la concentración de Magnesio sobre la actividad de pirofosfatasa inorgánica en un homogeneizado total de testículo de rata adulta.**

Las condiciones empleadas fueron semejantes a las descritas en la figura 2. La concentración de pirofosfato inorgánico fue 1.0 mM en todos los casos.

El tiempo de incubación fue 30 y 60 segundos.

Cada punto representa el promedio de 6 determinaciones.

Figura 4



**Tabla 2.- Efecto de la variación simultánea en la concentración de pirofosfato ( PPI ) y magnesio ( Mg<sup>2+</sup> ) sobre la actividad de pirofosfatasa inorgánica en un homogeneizado total de testículo de rata adulta.**

Las condiciones empleadas fueron semejantes a las descritas en la figura 2.

Los tiempos de incubación fueron 30 y 60 segundos.

T A B L A 2

Concentración m M		$\mu$ moles Pi/min/mg proteína
P Pi	M g <sup>2+</sup>	
0	0	0
1	1	0.20
1	3	0.17
3	1	0.14
3	3	0.19
5	1	0.06
1	5	0.16
5	5	0.19
10	1	0.03
1	10	0.15
10	10	0.18

**Fig 5.- Efecto de la concentración de enzima sobre la actividad de pirofosfatasa inorgánica en un homogeneizado total de testículo de rata adulta.**

Las condiciones del ensayo fueron semejantes a las descritas en la figura 2.

Los tiempos de incubación fueron 30 y 60 segundos.

Cada punto representa el promedio de 6 determinaciones.

Figura 5

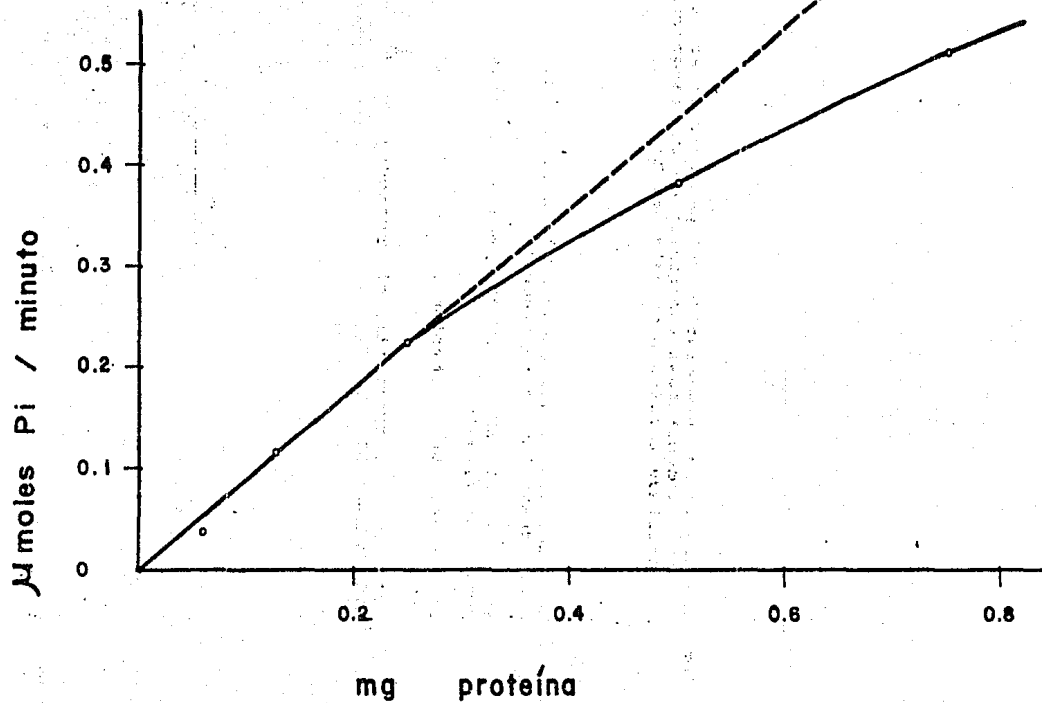
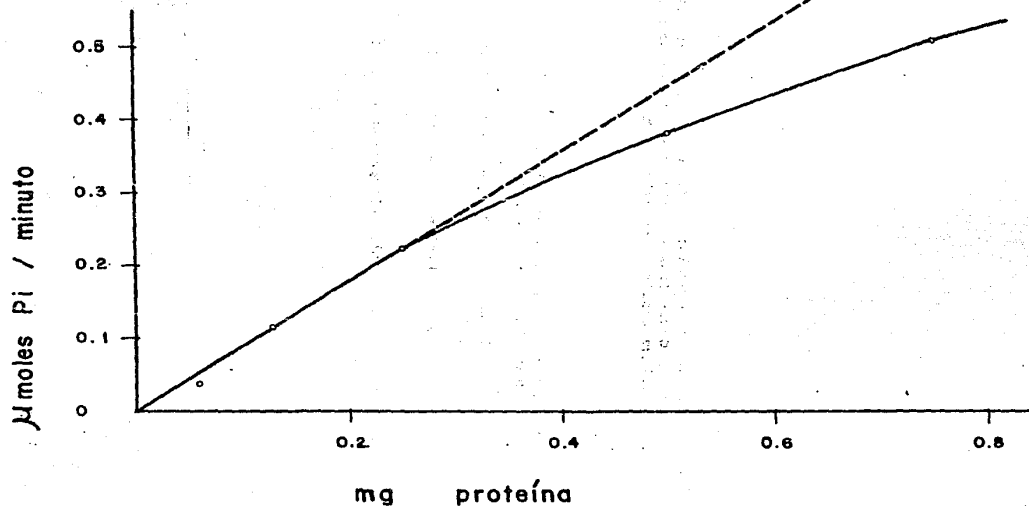




Figura 5



**Fig 6.- Efecto de la variación del pH sobre la actividad de pirofosfatasa inorgánica en un homogeneizado total de testículo de rata adulta.**

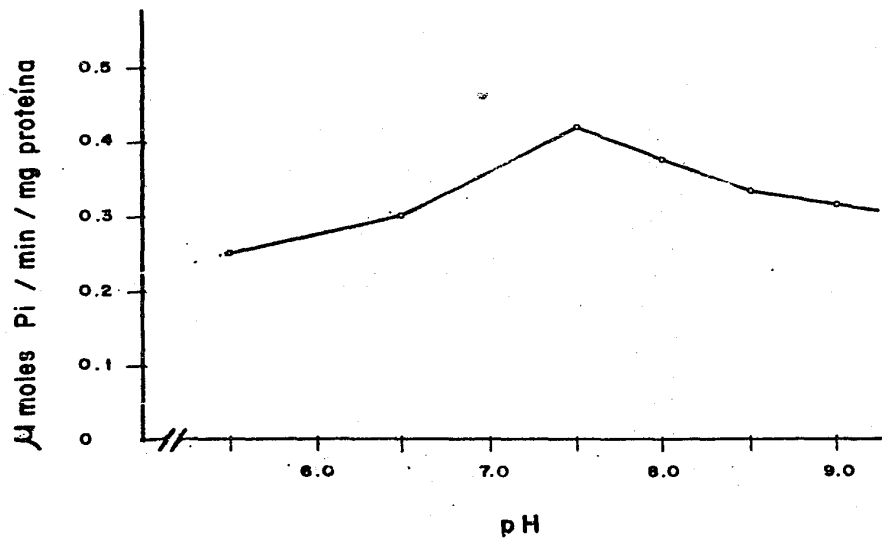
Las condiciones del ensayo fueron semejantes a las descritas en la figura 2.

Se ajustó el pH a 25 °C , empleando Tris como amortiguador.

Los tiempos de incubación fueron 30 y 60 segundos.

Cada punto representa el promedio de 6 determinaciones.

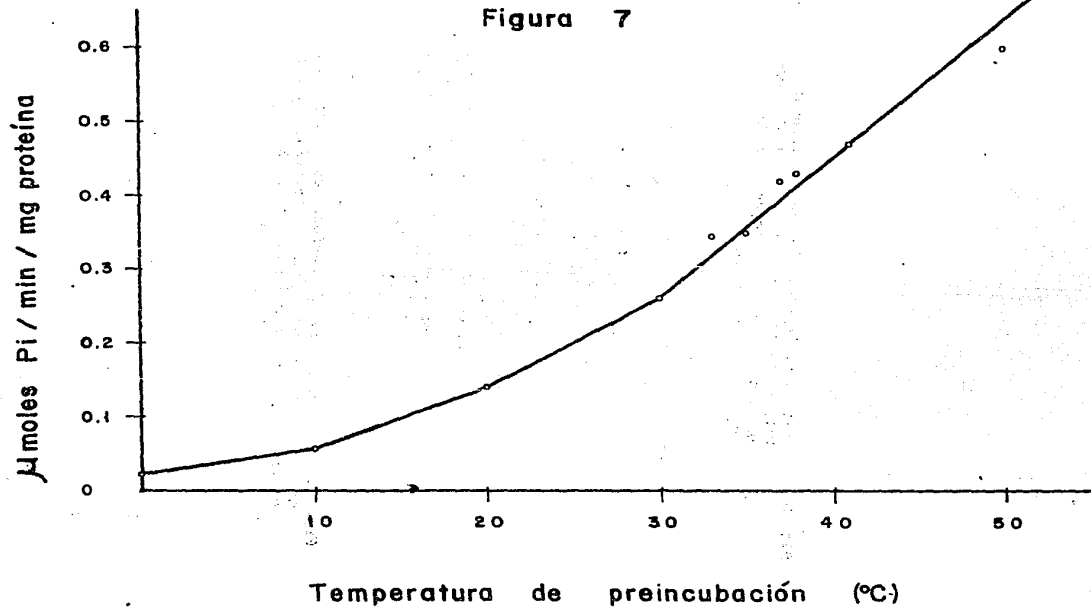
Figura 6.



**Fig 7.- Efecto de la variación de la temperatura de preincubación sobre la actividad de pirofosfatasa inorgánica en un homogeneizado total de testículo de rata adulta.**

Las condiciones del ensayo fueron semejantes a las descritas en la figura 2, excepto que después de agregar la enzima a la mezcla de reacción, ésta se mantuvo a cada temperatura indicada durante 30 minutos, se llevó 5 minutos a 37°C y se inició la reacción enzimática con la adición del sustrato. La incubación prosiguió a 37 °C y se tomaron alícuotas a los 30 y 60 segundos. Cada punto representa el promedio de 6 determinaciones.

Figura 7



**Fig. 8a.- Efecto de la variación en la temperatura de incubación sobre la actividad de pirofosfatasa inorgánica en un homogeneizado total de testículo de rata adulta.**

Las condiciones del ensayo fueron semejantes a las descritas en la figura 2.

La mezcla se preincubó durante 5 minutos a 37 °C y después de agregar la enzima, 5 min. más a la temperatura indicada.

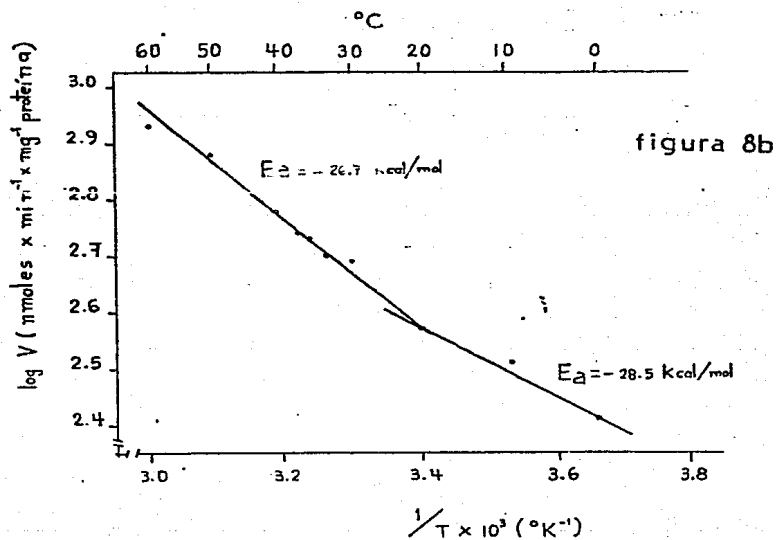
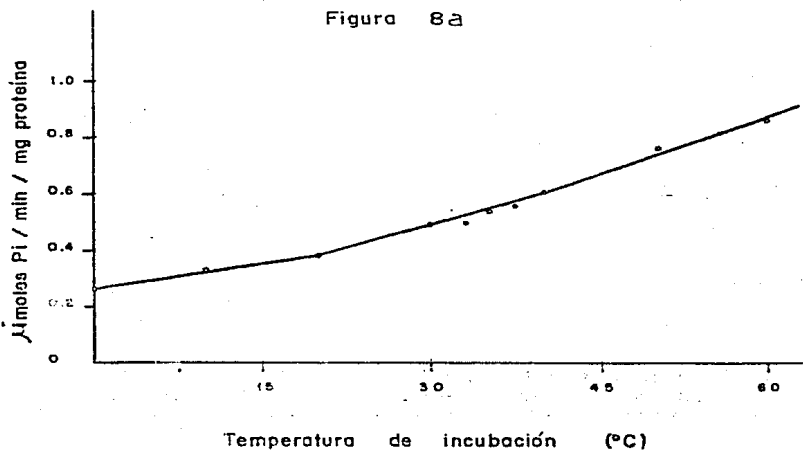
La reacción se inició con la adición del sustrato y se continuó la incubación a la misma temperatura.

Se tomaron alícuotas a los 30 y 60 segundos.

Cada punto representa el promedio de 6 determinaciones.

**Fig. 8b.- Gráfica de Arrhenius, de la actividad de pirofosfatasa inorgánica, construida a partir de los datos mostrados en la figura 8a.**

Figura 8a



**Fig 9.- Efecto de metales divalentes sobre la actividad de pirofosfatasa inorgánica en un homogeneizado total de testículo de rata adulta.**

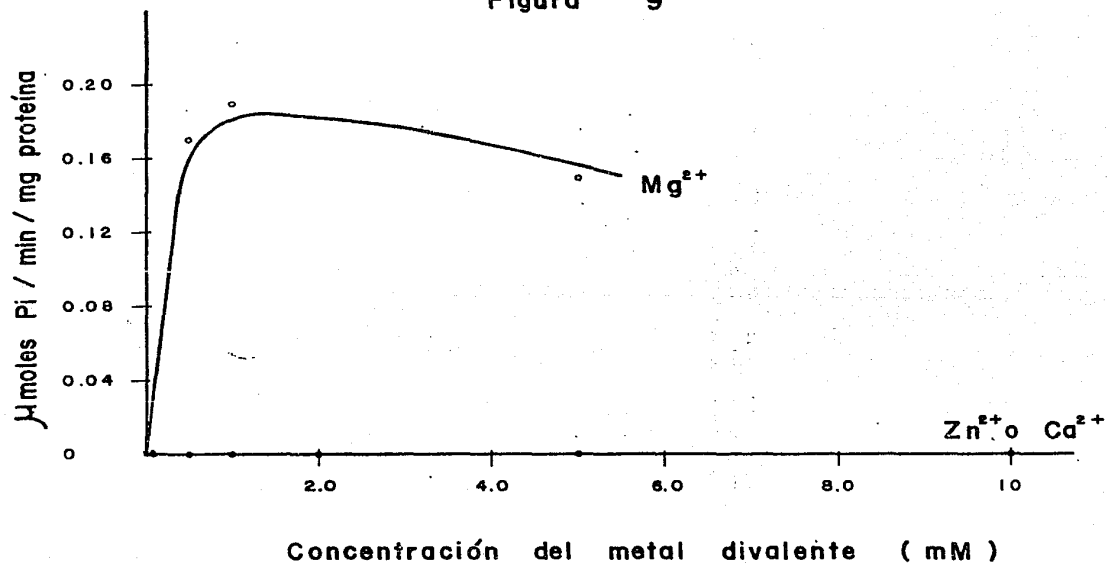
**Las condiciones del ensayo fueron semejantes a las descritas en la figura 2.**

**Los tiempos de incubación fueron 30 y 60 segundos.**

**Cada punto representa el promedio de 6 determinaciones.**



Figura 9



**Tabla 3.- Condiciones óptimas para determinar la actividad de pirofosfatasa inorgánica en un homogeneizado total de testículo de rata adulta.**

Tabla 3

Mezcla de incubación	Concentración m M
Na <sub>2</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	1.0
Mg <sub>2</sub> S O <sub>4</sub>	1.0
Sacarosa	200
Tris	25
EDTA	0.1
Preparación enzimática	0.25 <sup>mg</sup> proteína
Volumen final	0.5 ml

pH aparente

7.5

Temperatura

37 °C

Tiempo

0, 30y60 seg.

**Tabla 4.- Efecto de la albúmina de suero de bovino (BSA) sobre la actividad de pirofosfatasa inorgánica de testículo de rata adulta.**

Las condiciones del ensayo fueron semejantes a las resumidas en la tabla 3.

Para que fueran comparables entre sí, los resultados se expresan en  $\mu\text{moles de Pi} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$  de tejido húmedo, ya que el contenido de proteína se vió afectado por la adición de albúmina de suero de bovino (BSA).

T A B L A 4

ADICION AL MEDIO DE INCUBACION		ADICION AL MEDIO DE HO- MOGENEIZACION
BSA (1%)	SIN BSA	BSA (1%)
μMOLES P/MIN/G TEJIDO HUMEDO		
28.66	29.69	27.62

**Tabla 5. - Distribución subcelular de la actividad de pirofosfatasa inorgánica de testículo de rata adulta.**

Las condiciones del ensayo fueron semejantes a las señaladas en la tabla 3.

Los resultados expresados corresponden al promedio de 6 experimentos realizados por triplicado  $\pm$  desviación estándar.

Las fracciones subcelulares se obtuvieron conforme al esquema de centrifugación diferencial señalado en el texto.

T A B L A 5

DISTRIBUCION SUBCELULAR DE LA  
ACTIVIDAD DE PIROFOSFATASA INORGANICA  
DE TESTICULO DE RATA ADULTA

FRACCION SUBCELULAR	µmoles PI/MIN/G TEJIDO HUMEDO	%	µmoles PI/MIN/MG PROTEINA
HOMOGENEIZADO TOTAL	32.40 ± 4.40	100	0.30 ± 0.04
NÚCLEO Y RESTOS CELULARES	2.71 ± 0.53	8.33 ± 1.63	0.11 ± 0.01
MITOCONDRIAS PESADAS	0.28 ± 0.02	0.86 ± 0.06	0.03 ± 0.01
MITOCONDRIAS LIGERAS	0.30 ± 0.08	0.92 ± 0.24	0.09 ± 0.03
FRACCIÓN MICROSOMAL	0.20 ± 0.03	0.61 ± 0.09	0.06 ± 0.01
CITOSOL	29.49 ± 4.37	91.04 ± 13.48	0.80 ± 0.1
RECUPERACIÓN		101.86 ± 15.5	

**Figura 10.- Distribución subcelular de la actividad de pirofosfatasa inorgánica en testículo de rata adulta.**

Las condiciones del ensayo fueron semejantes a las resumidas en la tabla 3.

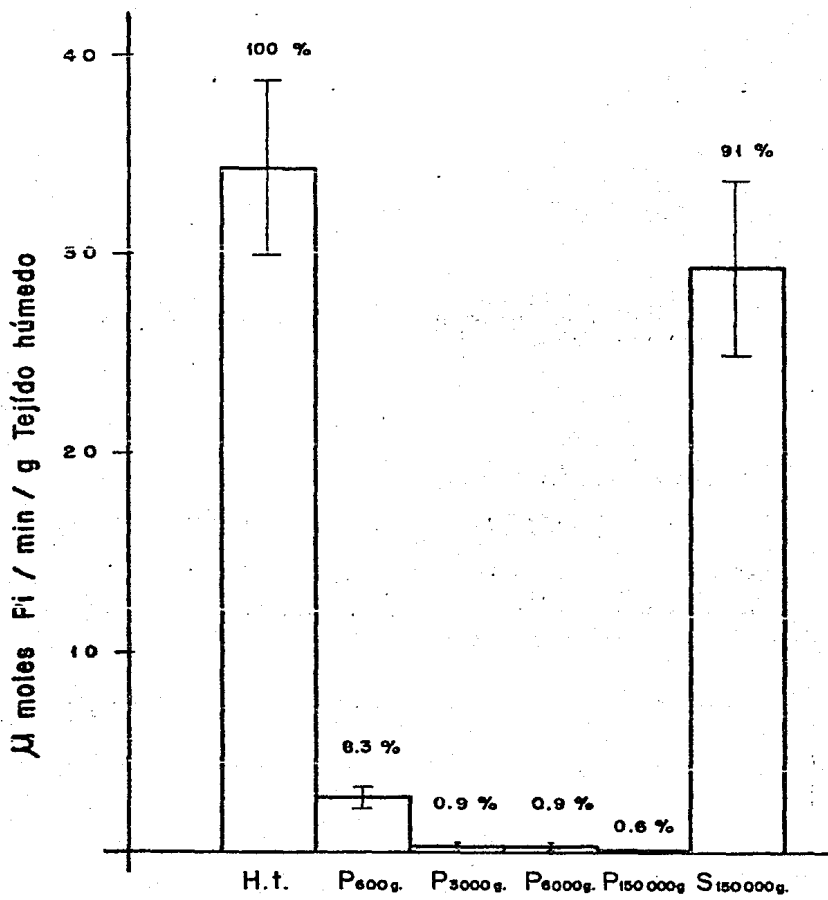
Para obtener una distribución porcentual, los resultados se expresan en  $\mu$  moles  $P_i \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$  de tejido húmedo, tal como se señala en la tabla 5.

Los resultados graficados corresponden al promedio de 6 experimentos realizados por sextuplicado, con sus respectivas desviaciones estándar.

Las fracciones subcelulares se obtuvieron conforme al esquema de centrifugación diferencial señalado en el texto.



Figura 10



**Tabla 6.- Efecto del lavado de la fracción mitocondrial sobre la actividad de pirofosfatasa inorgánica en testículo de rata adulta.**

Las condiciones del ensayo fueron semejantes a las resumidas en la tabla 3.

La obtención de las pastillas se detalla en el capítulo "Material y Métodos".

Se muestran los resultados individuales de 4 experimentos, así como los promedios y desviaciones estándar de los datos comparables.

T A B L A 6

EXPERIMENTO #	FRACCION SUBCELULAR	$\mu$ moles Pi/min/ g tejido húmedo	$\mu$ moles Pi/min/mg proteína
1	P6000g	0.125	0.050
	P6000g 1er. lavado	0.014	0.015
	P6000g 2o. lavado	0.012	0.008
2	P6000 g	0.122	0.048
	P6000g 1er. lavado	0.013	0.012
	P6000g 2o. lavado	0.009	0.007
3	P6000g	0.122	0.040
	P6000g 1er. lavado	0.012	0.010
	P6000g 2o. lavado	0.008	0.007
4	P6000g	0.095	0.035
	P6000g 1er. lavado	0.012	0.010
	P6000g 2o. lavado	0.008	0.007
Promedio ± Desviación estándar	P 6 0 0 0 g P6000g 1er. lavado P6000g 2o. lavado	0.116±0.014 0.013±0.001 0.009±0.001	0.043±0.006 0.011±0.002 0.007±0.005

**Tabla 7.- Medida de la contaminación de las fracciones mitocondriales por citosol y viceversa.**

La medición de las actividades de deshidrogenasa isocítrica y de deshidrogenasa de glucosa-6-fosfato se determinaron, bajo condiciones de velocidad inicial, a 340 nm, midiendo la formación del nucleótido reducido correspondiente.

En cada caso las celdillas contenían:

**IMH:**  $\text{NAD}^+$  0.33 mM, isocitrato de sodio 5.33 mM, ADP 0.67 mM,  $\text{MnCl}_2$  1.33 mM, 25  $\mu\text{l}$  de preparación enzimática (250  $\mu\text{g}$  de proteína - 0.4% tritón X-100), Tris acetato 33.3 mM, pH aparente de 7.2, volumen final 1.0 ml. Temperatura ambiente.

**B&P-DH:**  $\text{NADP}^+$   $\text{NaH}_2$  0.5 mM, glucosa-6-fosfato 0.67 mM 50  $\mu\text{l}$  de preparación enzimática (500  $\mu\text{g}$  de proteína-0.4 % tritón X-100 ), TEA 40 mM, pH aparente de 7.4 Volumen final: 1.0 ml. Temperatura ambiente.

La actividad de pirofosfatasa inorgánica se determinó según las condiciones detalladas en la tabla 3.

En la última columna se expresan los valores encontrados en cada fracción, corregidos de acuerdo con el porcentaje de contaminación dada por la enzima marcadora de la fracción contaminante.

T A B L A 7

FRACCION SUBCELULAR	Deshidrogenasa isocitrica-NAD <sup>+</sup>	Deshidrogenasa de glucosa-6-fosfato	Pirfosfatasa inorgánica	
			Experimental	Corregido
	nmoles nucléotido min <sup>-1</sup> g <sup>-1</sup> tejido	reducido húmedo	n moles Pi/min/g.tejido húmedo	
P 3000 g	180	0.0	30	30
P 6000 g	53.5	7.0 (1.58%)	70	69
CITOSOL	0.0	434.0 (98.42%)	730.0	730.0

**Tabla 8.- Efecto de la sonicación sobre la actividad de pirofosfatasa inorgánica de la fracción mitocondrial de testículo de rata adulta.**

La fracción mitocondrial se diluyó a 10 ml en medio "A" y se sonicaron alícuotas de 2.0 ml durante los tiempos señalados, en un sonicador MSE.

Las condiciones empleadas para determinar la actividad enzimática fueron semejantes a las resumidas en la tabla 3.

T A B L A 8

TIEMPO DE SONICACION (segundos)	$\mu$ moles Pi/min/g tejido húmedo	$\mu$ moles Pi/min/mg proteína
0	0.026	0.020
30	0.077	0.065
60	0.077	0.069
120	0.124	0.089
240	0.085	0.072

**Figura 11.- Actividad de pirofosfatasa inorgánica en testículo de rata, a través de la maduración.**

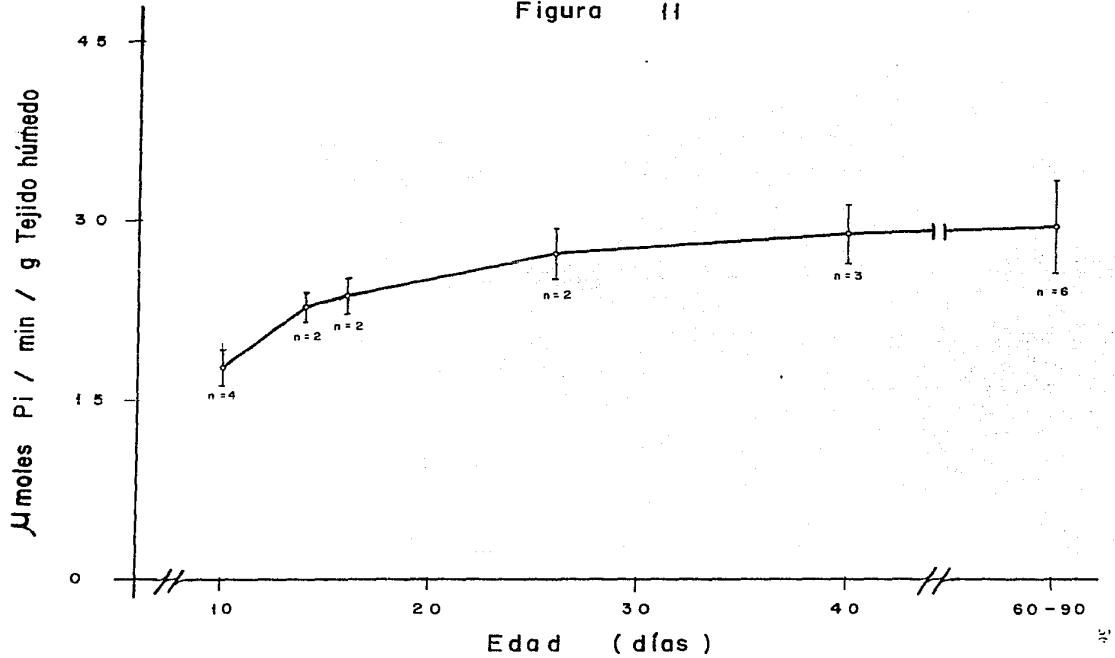
Las condiciones para cuantificar la actividad de pirofosfatasa inorgánica fueron semejantes a las resumidas en la tabla 3.

El número de animales utilizados en cada experimento, por edad, fue de acuerdo a lo señalado en la tabla 1.

Cada punto representa el promedio del número de experimentos (n) realizados cada uno de ellos por sexuplicado, desviación estándar.



Figura 11



## D I S C U S I O N

La actividad de pirofosfatasa inorgánica está presente en todas las células en que hasta ahora se ha estudiado (16,35,48,55). El testículo no es una excepción. En un trabajo previo del laboratorio (26), se informó una actividad clovada en un homogeneizado total de testículo adulto. Sin embargo esta actividad no había sido caracterizada ni se le había asignado una localización intracelular definida. Además, dado que tanto el contenido de PPI como la actividad de pirofosfatasa inorgánica han sido asociados con procesos anabólicos, resultaba importante determinarla en diversos estadios de diferenciación del epitelio germinal, en donde son conocidas las fluctuaciones en la síntesis de macromoléculas ( 24,60 ).

En la discusión de nuestros resultados es importante considerar, en cada etapa de la diferenciación del epitelio germinal, la heterogeneidad de la población celular en estudio.

Consideraremos en primer término la caracterización de la actividad de pirofosfatasa inorgánica en un homogeneizado total de testículo adulto, en el que un 60 % de las células presentes son espermátidas, alrededor del 20 % son espermatoцитos y el porcentaje restante corresponde a espermatogonias y a células no germinales ( 21 ).

Al igual que lo informado para pirofosfatasas inorgánicas de otros tejidos (89) nuestras evidencias apuntan al complejo

PPI -  $Mg^{2+}$  como el verdadero sustrato de la enzima ( figs. 3,4 y tabla 2 ). En estas condiciones resulta difícil la determinación de la  $K_m$  aparente, ya que depende de la concentración de  $Mg^{2+}$  libre.

De acuerdo con los datos de Randhal obtenidos con la pirofosfatasa inorgánica membranal de *Rhodospirillum rubrum* (79 ), los valores de  $K_m$  aparente para la concentración de sustrato entre 100  $\mu M$  y 1000  $\mu M$ , con una concentración de  $Mg^{2+}$  libre de 10, 50, 100 y 500  $\mu M$  son 500, 350, 150 y 65  $\mu M$  respectivamente. Nosotros bajo las condiciones descritas en el texto calculamos una  $K_m$  aparente de 151  $\mu M$ , y calculamos la concentración teórica de  $Mg^{2+}$  libre en nuestro medio de incubación ( sin preparación enzimática ), utilizando un programa de computación que permite calcular la proporción que existe entre ligandos, iones metálicos libres y complejos ligando-ión metálico, a diferentes pHs (18). Considerando un pH de 7.5, una constante de afinidad EDTA- $Mg^{2+}$  de 2.28 y una constante de afinidad PPI- $Mg^{2+}$  de 6.0 a 20 °C ( 59 ), el programa indicó una concentración de  $Mg^{2+}$  libre de 30  $\mu M$ . Sin embargo, es necesario subrayar que en este valor no se involucró el contenido de  $Mg^{2+}$  de nuestra fuente enzimática, ni se hizo una corrección a las constantes de afinidad, a la temperatura y pH reales de nuestro ensayo.

Las curvas de temperatura sugieren que la enzima tiene uniones o puentes que permiten que sea estable a altas temperaturas, en cambio perderían su efecto a temperaturas bajas.

Cabe señalar que la actividad de pirofosfatasa de testículo a altas temperaturas fue subestimada, ya que es bien sabida la alteración que sufre el pH con los cambios de temperatura. De acuerdo con las figuras pertinentes (6,8), a 60 °C, teníamos un pH real de 6.5 ( una unidad menor al original ) ( 75 ).

La curva de Arrhenius mostró un punto de quiebre, lo cual se había pensado era característica de las enzimas membranales (87), aunque también se ha sugerido que, de presentar el fenómeno una enzima soluble, implicaría un cambio definido en la conformación de la proteína a partir de la temperatura correspondiente al punto de quiebre ( 20 °C en la enzima de nuestro estudio ).

Según la curva de pH, es probable que, de haber ajustado el amortiguador a 60 °C, la actividad de la enzima habría resultado ser mayor en un 25 %.

La resistencia a la inactivación por el calor encontrada en la enzima testicular es semejante a la informada para pirofosfatasas inorgánicas de otros orígenes ( 47 ). En un estudio realizado por Horn (43), éste encontró que la presencia de un efector alostérico confiere resistencia a la enzima contra la inactivación con calor. Siendo el  $\text{PPi}^{4-}$  el agente protector más fuerte, se ha sugerido (30) que esta enzima tiene altas propiedades regulatorias conferidas por el estado iónico del pirofosfato libre, es decir aquél que no forma complejo con el magnesio. Dado que el sustrato es precisamente el  $\text{PPi}$  acomplejado con  $\text{Mg}^{2+}$  (8,22) resalta la importancia de la relación  $\text{PPi libre} / \text{PPi-Mg}^{2+}$  en la regulación fisiológica de la actividad de la enzima.

De hecho la forma sigmoidal de la curva de efecto de  $Mg^{2+}$  sobre la actividad enzimática ( fig. 4 ) sugiere que la enzima puede ser regulable por  $Mg^{2+}$ . Además, es de hacer notar que el pirofosfato a altas concentraciones se comportó como inhibidor de esta enzima ( fig. 3 ).

Carecemos de las estimaciones de los niveles de PPI y  $Mg^{2+}$  en el tejido testicular, así como de la compartimentalización de los metabolitos, iones metálicos y demás factores que están relacionados con las reacciones que involucran al PPI. Sin embargo, consideramos importante estudiar el efecto de otros iones divalentes sobre la actividad enzimática, en vista de que, en algunos sistemas, el ión Zinc es considerado como el segundo activador más efectivo después del  $Mg^{2+}$  (64). A diferencia de éstos, la enzima testicular no manifestó actividad alguna en presencia de  $Zn^{2+}$  o de  $Ca^{2+}$  ( figura 9 ) a ninguna de las concentraciones usadas. Trabajando con pirofosfatasa citoplásmica en hígado de ratón, Horn ( 43 ) encontró que a concentraciones de 1.0 mM el  $Zn^{2+}$  es inhibitorio en un 48 % y el  $Ca^{2+}$  en un 97 %.

La inhibición completa obtenida por nosotros en presencia de  $Zn^{2+}$  o de  $Ca^{2+}$  pudiera tener relevancia fisiológica, dada la particular importancia que tienen ambos iones durante la espermatogénesis. En relación con el primero, su disminución en la dieta produce infertilidad (13), y en cuanto al  $Ca^{2+}$ , parece regir algunos pasos específicos de la espermiogénesis (84).

Es muy probable que las características descritas de la

pirofosfatasa inorgánica de testículo correspondan a la enzima citosólica, ya que en el estudio de la localización intracelular de la actividad ( figura 10 , tabla 5 ), el 90 % del total se encontró en la fracción soluble. Nuestro hallazgo es similar al de otros autores en hígado de rata y de ratón. En efecto, Nordlie y Lardy (69) encontraron un 94 % en la fracción soluble de hígado de rata ( $22.3 \mu \text{ moles Pi. min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$  de tejido húmedo). Horn informó que el 90 % de la actividad total de la enzima estaba localizada en el citosol de hígado de ratón (43) y Pynes refiere valores del 98 % en la fracción soluble de páncreas de paloma (77).

A pesar de que la mayor actividad se encontró en el citosol, nuestros resultados sugieren que el testículo contiene también actividad mitocondrial de pirofosfatasa inorgánica, ya que gracias al uso de enzimas marcadoras de cada fracción, fue posible detectar el grado de contaminación citosólica y efectuar el cálculo de la corrección correspondiente ( tabla 7 ). En el mismo sentido es también sugerente el incremento de actividad obtenido por sonicación progresiva de las mitocondrias (tabla 8).

Son pocos y recientes los estudios de pirofosfatasa inorgánica mitocondrial (57,96). Sin embargo, apuntan a la posibilidad de una participación de esta enzima en la producción de energía. Queda para estudios futuros definir la importancia de su papel entre los sistemas de transducción energética.

Es mayor el caudal de información que se ha acumulado en relación con la función de la pirofosfatasa inorgánica

citosólica, quizás por ser la más abundante. Se ha asociado con la síntesis de macromoléculas (37). Esto haría suponer que su actividad estaría aumentada o elevada en órganos activos en síntesis de proteínas y de ácidos nucleicos (77).

Por otro lado, descubrimientos recientes han sugerido que la pirofosfatasa inorgánica puede tener un papel importante no sólo en la regulación de la síntesis macromolecular y crecimiento, sino también en eventos evolutivos mediante la influencia sobre la exactitud de copiado de las moléculas de ADN durante la duplicación cromosómica (98).

Se han realizado algunas estimaciones de la concentración intracelular de PPI en hígado de rata (98). Se sugiere que el PPI total medido está libre y localizado en el citoplasma. Por lo tanto se esperaría que la mayor actividad de pirofosfatasa inorgánica se ubicara en el citosol donde hidrolizaría rápidamente el PPI formado por la activación de ácidos grasos, de aminoácidos o por las reacciones de polimerización de ARN y ADN.

Se sabe que simultáneamente al desarrollo del proceso anabólico, las concentraciones de PPI se elevan considerablemente (82).

Por otra parte, se sabe que durante el crecimiento existe una producción amplia de pirofosfato inorgánico (PPI). Además, en la ausencia de crecimiento hay un ciclo dinámico continuo que permite que el PPI se forme durante todo el tiempo en los tejidos (3).

La maduración del epitelio germinal del testículo provee un modelo para el estudio de los fenómenos que acompañan a tal diferenciación celular.

Durante la espermatogénesis hay una gran cantidad de caminos anabólicos, así como de expresiones genéticas definidas, en cada etapa del proceso.

La determinación de la actividad de pirofosfatasa inorgánica en testículo de ratas de edades diversas, desde la pubertad hasta el estado adulto, reveló una actividad 40 % inferior en los animales prepúberes ( $0.01 < p < 0.02$ ) al compararlos con los adultos. El incremento en la actividad se manifestó a los 16 días, acompañando el período proliferativo de los espermatocitos primarios. Fue sufriendo pequeños incrementos, carentes de significancia estadística, hasta llegar a la edad adulta. Existen informes en la literatura sobre el patrón de síntesis de ácidos nucleicos y proteínas durante la espermatogénesis en el ratón (34). La velocidad de síntesis de ARN es mayor durante el diploteno en comparación con el leptoteno o el zigoteno y se detiene al inicio de la espermiogénesis. La síntesis de proteínas en el citoplasma continúa hasta casi el final de la espermiogénesis, probablemente sobre moléculas de ARN preformadas. La supresión de la síntesis de proteínas nucleares se extiende hasta el último período de la espermiogénesis (espermátidas en estado II).



Si consideramos que una actividad enzimática expresada por gramo de tejido húmedo es probable que refleje fundamentalmente la actividad de la población celular más abundante en cada momento de la diferenciación, parecería que la pirofosfatasa inorgánica está presente en la mayoría de las células del testículo, pero con mayor actividad en el epitelio germinal a partir de la etapa de espermatocitos primarios.

Sugerimos que el incremento en la actividad de la enzima al inicio de la pubertad puede deberse a una asociación, en ese momento, con el patrón de síntesis, tanto de ácidos nucleicos como de proteínas. Su estabilidad durante la espermiogénesis hasta la edad adulta, podría correlacionarse más con la síntesis de proteínas que con la de ácidos nucleicos, ya que ésta se encuentra reprimida en las células haploides, con excepción de una síntesis de ADN mitocondrial recientemente demostrada (39). En cambio, el grueso de la síntesis de proteínas se detiene hasta el último paso de la diferenciación de las espermátidas, o sea la producción de espermatozoides.

Resta por dilucidar en estudios futuros si se trata de una síntesis de novo de la pirofosfatasa inorgánica durante la profase de la meiosis, o de un mecanismo de activación de la enzima relacionado con el aumento en la producción de PPI al desencadenarse el incremento en la síntesis de macromoléculas.

## R E S U M E N

1. Se estableció la metodología adecuada para la determinación de la actividad de pirofosfatasa inorgánica en el testículo de la rata:

1.1. Determinación de fosfato en presencia de pirofosfato.

1.2. Condiciones óptimas para medir la actividad de pirofosfatasa inorgánica ( tiempo, concentración de sustrato, concentración de enzima, pH, temperatura y metales divalentes ).

2. Se determinó la localización intracelular de la actividad enzimática, midiéndola en homogeneizados totales y en las diversas fracciones subcelulares obtenidas por centrifugación diferencial. El 90 % de la actividad de pirofosfatasa inorgánica se localizó en el citosol y sin que nuestros datos sean concluyentes sugieren fuertemente la existencia de una pequeña actividad de pirofosfatasa mitocondrial.

3. Se estudió la distribución intracelular de la actividad de pirofosfatasa inorgánica en relación con la maduración testicular, observándose que en ratas prepúberes ( 11 días de edad ) la citosólica tuvo sólo un 60 % de la actividad que habitualmente se encontró en el citosol del testículo adulto.

## CONCLUSIONES

1. La presencia de pirofosfato inorgánico no afectó la determinación del ortofosfato bajo las condiciones empleadas.
2. En homogeneizado total de testículo adulto la pirofosfatasa inorgánica presentó las siguientes características:
  - 2.1 Mostró dependencia de  $Mg^{2+}$  en una relación equimolar 1:1 con pirofosfato inorgánico. No tuvo actividad en presencia de  $Zn^{2+}$  o de  $Ca^{2+}$ .
  - 2.2.  $K_m$  aparente de PPI : 151  $\mu M$ .
  - 2.3. Tuvo un máximo de actividad a pH 7.5. A pH más alcalino disminuyó pero fue aún considerable a pH 9.0 .
  - 2.4. Fue estable a temperaturas altas ( hasta de 60 °C ).
3. Localización intracelular:
  - 3.1. La mayor parte de la actividad de pirofosfatasa inorgánica de testículo se localizó en el citosol ( 90 % ).
  - 3.2. Se observó una pequeña actividad ( 1 % respecto al total ) de pirofosfatasa mitocondrial, sin asociarse preferentemente a mitocondrias pesadas o ligeras.
4. La actividad de pirofosfatasa inorgánica citosólica manifestó poco cambio durante la maduración del epitelio germinal. Sólo en animales prepúberes ( 11 días de edad ) fue menor en un 40 % respecto a la actividad en el animal adulto.

## B I B L I O G R A F I A

- 1) Alemán, V., Trejo, R., Morales, E., Hernández-Jáuregui, P. y Delhumeau-Ongay, G. (1978) A simple and rapid technique to isolate enriched populations of spermatocytes and spermatids from the immature rat testis. *Reprod. Fert.* 51, 67.
- 2) Arion, W.J. y Nordlie, R.C. (1964) Liver microsomal glucose-6 phosphatase, inorganic pyrophosphatase, and pyrophosphate glucose phosphotransferase. II. Kinetic studies. *J. Biol. Chem.* 239, 2752.
- 3) Baltscheffsky, H., Von Stedingk, L.V., Heldt, H.W. y Klingenberg, M. (1966) Light induced energy conversion and inorganic pyrophosphatase reaction in chromatophores. *Science.* 153, 1120.
- 4) Baltscheffsky, M (1967) Inorganic pyrophosphate as an energy donor in photosynthetic and respiratory electron transport phosphorylation systems. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 28, 36.
- 5) Baltscheffsky, H. (1967) Inorganic pyrophosphate and the evolution of biological energy transformation. *Nature* 216, 241.
- 6) Barsky, E.L., Bonch-Osmolovskaya, E.H., Ostromov, S.A., Samuilov, V.D. y Skulachev, V.P. (1975) A study on the membrane potential and pH gradient in chromatophores and intact cells of photosynthetic bacteria. *Biochim. Biophys. Acta.* 387, 388.
- 7) Baykov, A.A. y Avaeva, S.M. (1973) Regulation of yeast inorganic pyrophosphatase activity by divalent cations. *Eur. J. Biochem* 32, 136.
- 8) Baykov, A.A. y Avaeva, S.M. (1974) Yeast inorganic pyrophosphatase: Studies on metal binding. *Eur. J. Biochem.* 47, 57.
- 9) Baykov, A.A. y Avaeva, S.M. (1982) A sensitive method for measuring pyrophosphate in the presence of a 10 000 fold excess of orthophosphate using inorganic pyrophosphatase. *Anal. Biochem.* 119, 211.
- 10) Benneth, V.L., Ristrophe, D., Hamming, J.J. y Butler, L.G. (1973) Maize leaf inorganic pyrophosphatase: isozyme specificity for substrates, inhibitors, divalent metal ions, and pH optima. *Biochim. Biophys. Acta.* 393, 232.

- 11) Bergmeyer, H.U. ( 1974 ) Glucose-6 phosphate dehydrogenase, en "Methods of enzymatic analysis eds. Lohr, G.W. y Waller, H.D. Verlag / Chemie. p. 636
- 12) Bertolini, A.M. y Quarto Di Palo F.M. ( 1962 ) Variation of inorganic pyrophosphatase during physiological aging of the erythrocyte and aging of the body. Acta Geront. (Milano). 12, 81.
- 13) Bieri, J.G. y Prival, E.L. ( 1966 ) Effect of deficiencies of -tocopherol, retinol and zinc on the lipid composition of rat testes. J. Nutr. 89, 55.
- 14) Bonting, S.L., Simon, K.A. y Hawkins, N.M. ( 1961 ) Studies on sodium-potassium-activated adenosine triphosphatase I : Quantitative distribution in several tissues of the cat. Arch. Biochim. Biophys. 25, 416.
- 15) Botts, J., Chashini, A. y Young, H.L. (1965) Alkali metal binding by ethylenediaminetetraacetate, adenosine 5' triphosphate, and pyrophosphate. Biochemistry. 4, 1788.
- 16) Butler, G.L. ( 1971 ). Yeast and other inorganic pyrophosphatases, en "The enzymes", vol. IV, p. 529. ed. P.D. Boyer. 3rd. ed. Academic Press, Inc., New York.
- 17) Butterworth, P.J. ( 1968 ) The inorganic pyrophosphatase activity of pig kidney alkaline phosphatase and its inhibition by  $Mg^{2+}$  and excess of inorganic pyrophosphate. Biochem J. 110, 671.
- 18) Celis, H, Romero, I. y Gómez-Puyou, A. ( 1985 ) The phosphate-pyrophosphate exchange and hydrolytic reactions of the membrane-bound pyrophosphatase of *Rhodospirillum rubrum* : Effects of  $Mg^{2+}$ , phosphate, and pyrophosphate. Arch. Biochem. Biophys. 236, 766.
- 19) Cheol Kim, I. ( 1980 ) Isolation and properties of somatic and testicular cytochromes c from rat tissues. Arch. Biochem. Biophys. 203, 519.
- 20) Cleland, V.M. y Barden, E.R. ( 1969 ) Isocitrate dehydrogenase  $NADP^{+}$  specific from pig heart, en "Methods in Enzymology". vol. XIII. ed. J.M. Lowenstein. Academic Press.
- 21) Clermont, Y. ( 1972 ) Kinetics of spermatogenesis in mammals : Seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. Physiol. Rev. 52, 198.

- 22) Cooperman, B.S., Panackal, A., Springs, B. y Hamm, D.J. ( 1981 ) Divalent metal ion, inorganic phosphate and inorganic pyrophosphate analogue binding to yeast inorganic pyrophosphatase. *Biochemistry*. 20, 6051.
- 23) Courrot, M., Hochereau-de Reviers, M.T, y Ortavant, R. ( 1970 ) Spermatogenesis, en "The Testis", vol. I, p. 339, eds. A. D. Johnson, W.R. Gomes y N.L. VanDemark. Academic Press, London.
- 24) Davis, J.R. y Langford, A. ( 1970 ) Testicular proteins, en "The Testis", vol. II, p. 259. eds. A.D. Johnson, W.R. Gomes y N.L. Vandemark. Academic Press. New York.
- 25) De Moor, P., Verhoeven, G., Lamberigts, G. y Heyns, W. ( 1973 ) Organizing effects of "early" testosterone secretion on steroid metabolism and binding, en "The endocrine function of the human testis", vol. I, p. 343. eds. V.H.T. James, M. Sirio y L. Martini. Academic Press, New York.
- 26) Delhumeau-Ongay, G., Trejo-Bayona, R. y Lara-Vivas, L. ( 1973 ) Changes of (  $Ca^{2+}$  -  $Mg^{2+}$  ) adenosine triphosphatase activity in rat testis throughout maturation. *J. Reprod. Fert.* 33, 513.
- 27) Delhumeau-Ongay, G., Vázquez-Memije, M.E., Izquierdo-Reyes, V. y Baute-Romero, Y. Diferenciación de las mitocondrias de testículo de rata durante la maduración del epitelio germinal. IV. Reunión de la Rama de Bioenergética y Biomembranas de la Sociedad Mexicana de Bioquímica, A.C. p. 52.
- 28) Fawcett, D.W., Neaves, W.B. y Flores, M.N. (1973) Comparative observations on intertubular lymphatics and the organization of the interstitial tissue of the mammalian testis. *Biol. Reprod.* 2, 500.
- 29) Fleisch, H. y Bisaz, Z. ( 1962 ). Mechanism of calcification : inhibitory role of inorganic pyrophosphate. *Nature*. 195, 911.
- 30) Flodgaard, H. y Fleron, P. (1974) Thermodynamic parameters for the hydrolysis of inorganic pyrophosphate at pH 7.4 as a function of  $< Mg^{2+} >$ ,  $< K^{+} >$ , and ionic strength determined from equilibrium studies of the reaction. *J. Biol. Chem.* 249, 3465.
- 31) Free, M.J. y VanDemark, N.L. ( 1968 ) Gas tensions in spermatic and peripheral blood of rams with normal and heat treated testes. *Am. J. Physiol.* 214, 863.
- 32) Free, M.J. ( 1970 ) Carbohydrate metabolism, en "The Testis", vol. II, p. 125. eds. Johnson, A.D., Gomes, W.R. y VanDemark, N.L. Academic Press, London.

- 33) Fritz, B.I. ( 1973 ) Selected topics on the biochemistry of spermatogenesis, en "Current topics in cellular regulation". vol. 7, p. 129. eds. Horecker, B.L., y Stadtman, E.R. Academic Press, New York.
- 34) Geremia, R., Bortani, C., Conti, M. y Monesi, V. (1977) RNA synthesis in spermatocytes and spermatids and preservation of meiotic RNA during spermiogenesis in the mouse. Cell differentiation. 5, 343.
- 35) Gold, E. W. y Veitch, F.P. ( 1973 ) Studies on a pyrophosphatase and a glucose-6-phosphatase from *Aspergillus oryzae*. Biochem. Biophys. Acta. 327, 166.
- 36) Grootegoed, J.A., Jansen, R. y Vander Molen, H.J. ( 1984 ) The role of glucose, pyruvate and lactate in ATP production by rat spermatocytes and spermatids. Biochem. Biophys. Acta. 767, 248.
- 37) Guynn, R.W., Veloso, D., Randolph Lawson, J.W. y Veech, R.L. ( 1974 ) The concentration and control of cytoplasmic free inorganic pyrophosphate in rat liver in vivo. Biochem. J. 140, 369.
- 38) Hartree, E.F. ( 1972 ) Determination of protein. A modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. Analytical Biochem. 48, 422.
- 39) Hech, B.N. y Liem, H. (1984) Mitochondrial DNA is synthesized during meiosis and spermiogenesis in the mouse. Exp. Cell. Res. 154, 293.
- 40) Heinonen, K.J. ( 1974 ) Intracellular concentration of inorganic pyrophosphate in the cells of *Escherichia coli*. A method for its determination. Anal Biochem. 55, 366.
- 41) Heinonen, K.J. y Lahti, J.R. ( 1981 ) A new and convenient colorimetric determination of orthophosphate and its application to the assay of inorganic pyrophosphatase. Anal. Biochem. 113, 313.
- 42) Horder, M. ( 1972 ) Colorimetric determination of inorganic phosphate in the assay of inorganic pyrophosphatase activity. Anal Biochem. 42, 37.
- 43) Horn, A., Bornig, H. y Thiele, G. (1967) Allosteric properties of the  $Mg^{2+}$  dependent inorganic pyrophosphatase in mouse liver cytoplasm. European J. Biochem. 2, 243.

- 44) Howard, A. y Lundgren, D.G. (1970) Inorganic pyrophosphatase from *Ferrobacillus ferrooxidans* (*Thiobacillus ferrooxidans*). *Can. J. Biochem.* **48**, 1302.
- 45) Hruska, K.J. (1968) Interference of inorganic pyrophosphate in the determination of inorganic pyrophosphate. *Clin. Chim. Acta.* **22**, 454.
- 46) Izquierdo, V., Vázquez-Memije, M.E. y Delhumeau-Ongay, G. (1985) Oxidative phosphorylation in rat testis mitochondria throughout maturation. 13th. International Congress of Biochemistry, Amsterdam, Holanda. p. 759 (FR-46B).
- 47) Johnson, E.J. (1961) Properties of a partially purified heat resistant inorganic pyrophosphatase. *Arch. Biochem. Biophys.* **96**, 588.
- 48) Josse, J. (1966) Constitutive inorganic pyrophosphatase of *Escherichia coli*. I. Purification and catalytic properties. *J. Biol. Chem.* **241**, 1938.
- 49) Keister, D.L. y Minton, N.J. (1971) Energy - linked reactions in photosynthetic bacteria. VI. Inorganic pyrophosphate driven ATP synthesis in *Rhodospirillum rubrum*. *Arch. Biochem. Biophys.* **147**, 330.
- 50) Kelly, S.J., Feldman, F., Sperow, J.W. y Butler, L.G. (1973) Kinetic effects of inorganic pyrophosphate analogs on several inorganic pyrophosphate hydrolyzing enzymes. *Biochemistry.* **12**, 3338.
- 51) Klemme, J.H., Klemme, B. y Gest, H. (1971) Catalytic properties and regulatory diversity of inorganic pyrophosphatases from photosynthetic bacteria. *J. Bacteriol.* **108**, 1122.
- 52) Klemme, J.H. y Gest, H. (1971) Regulation of the cytoplasmic inorganic pyrophosphatase of *Rhodospirillum rubrum*. *Eur. J. Biochem.* **22**, 529.
- 53) Kondrashin, A.A., Remennikov, V.G., Samuilov, V.D. y Skulachev, V.P. (1980) Reconstitution of biological molecular generators of electric current. Inorganic pyrophosphatase. *Eur. J. Biochem.* **113**, 219.
- 54) Kowalczyk, S. y Maslowski, P. (1981) Effect of inorganic pyrophosphate on respiration and oxidative phosphorylation in higher plants. *Phytochemistry.* **20**, 2611.



- 55) Lahti, R. ( 1983 ) Microbial inorganic pyrophosphatases. *Microbiol Reviews*. 47, 169.
- 56) Leblond, C.P. y Clermont, Y. (1952) Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 55, 548.
- 57) Mansurova, S.E., Shakhov, Y.A., Belyakova, T.N. y Kulaev, I.S. ( 1975 ). Synthesis of inorganic pyrophosphate by animal tissue mitochondria. *FEBS lett.* 55, 94.
- 58) Mansurova, S.E., Shakhov, Y.A. y Kulaev, I.S. ( 1977 ). Mitochondrial inorganic pyrophosphatase is a coupling factor of respiration and inorganic pyrophosphate synthesis. *FEBS lett.* 74, 31.
- 59) Martell, A. y Sillén, L.G. ( 1971 ) Stability constants of metal - ion complexes: Supplement No. 1, Special Publication No 25, The Chemical Society, London.
- 60) Means, A.R. y Hall, P.F. ( 1967 ) Effect of FSH on protein biosynthesis in testes of the immature rats. *Endocrinology*. 81, 1151.
- 61) Means, A.R. y Hall, P.F. ( 1968 ) Protein biosynthesis in the testis. II. Role of ATP. *Endocrinology*. 83, 86.
- 62) Means, A.R. y Hall, P.F. ( 1969 ) Protein biosynthesis in testis. V. Concerning the mechanism of stimulation by Follicle - stimulating hormone. *Biochemistry*. 8, 4293.
- 63) Moe, G.A. y Butler, L.G. (1972) Yeast inorganic pyrophosphatase. II. Kinetics of  $Mg^{2+}$  activation. *J. Biol. Chem.* 247, 7308.
- 64) Moe, G.A. Jr., Pham, S., Dang, T. y Styer, L. (1979) Kinetic analysis of the effect of Zinc ion on the inorganic pyrophosphatase reaction. *Arch. Biochem. Biophys.* 196, 73.
- 65) Monesi, V. ( 1976 ) Nucleoprotein synthesis in spermatogenesis, en "Male Fertility and Sterility". eds. Mancini, R.E. y Martini, L. Academic Press. N.Y.
- 66) Motta, M., Collu, R. y Martini, L. ( 1973 ) Mechanisms which control puberty in males, en "The endocrine function of the human testis ". vol. 1, p. 371. eds. V.H.T. James, M. Sirio y L. Martini. Academic Press. N.Y.

- 67) Moyle, J., Mitchell, R. y Mitchell, P. ( 1972 ) Proton-translocating pyrophosphatase of *Rhodospirillum rubrum*. FEBS lett. 23, 233.
- 68) Nakamura, M., Hino, A. y Kato, J. ( 1981 ) Stimulation of protein synthesis in round spermatids from rat testes by lactate. II. Role of adenosine triphosphate (ATP). J. Biochem. 90, 933.
- 69) Nordlie, R.C., y Lardy, H.A. (1961) Subcellular distribution of rat liver inorganic pyrophosphatase activity. Biochim. Biophys. Acta. 50, 189.
- 70) Nordlie, R.C., y Lardy, H.A. (1961) Adenine nucleotide inhibition of mitochondrial inorganic pyrophosphatase activity. Biochim. Biophys. Acta. 53, 309.
- 71) Nordlie, R.C., y Arion, W.J. (1963) Inorganic pyrophosphate hydrolysis by rat liver microsomes. Biochim. Biophys. Acta. 77, 100.
- 72) 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.
- 73) Nyrén, P. y Baltscheffsky, M. (1983) Inorganic pyrophosphate driven ATP synthesis in liposomes containing membrane bound inorganic pyrophosphatase and  $F_0F_1$  complex from *Rhodospirillum rubrum*. FEBS lett. 155, 125.
- 74) Otto, D.A. y Cook, G.A. (1982) Role of  $Ca^{2+}$  in regulating the level of mitochondrial inorganic pyrophosphate. Effect on butyrate oxidation. FEBS lett. 150, 172.
- 75) Perrin, D.D. y Dempsey, B. 1974. "Buffers for pH and metal ion control". Chapman and Hall. p. 161.
- 76) Plaut, G.W.E. ( 1969 ) Isocitrate dehydrogenase ( DPN<sup>+</sup> specific ) from bovine heart, en "Methods in Enzymology". vol. XIII, p.34. ed. J.M. Lowenstein. Academic Press. New York.
- 77) Pynes, G.D. y Younathan, E.S. (1964) The subcellular distribution of inorganic pyrophosphatase in pigeon pancreas. Biochim. Biophys. Acta. 92, 150.
- 78) Pynes, G.D. y Younathan, E.S. ( 1967 ) Purification and some properties of inorganic pyrophosphatase from human erythrocytes. J. Biol. Chem. 242, 2119.

- 79) Randhal, H. (1979). Characterization of the membrane-bound inorganic pyrophosphatase in *Rhodospirillum rubrum*. Eur. J. Biochem. **102**, 231.
- 80) Rao, P.V. y Keister, D.L. (1978). Energy-linked reactions in photosynthetic bacteria. X Solubilization of the membrane-bound energy-linked inorganic pyrophosphatase of *Rhodospirillum rubrum*. Biochem. Biophys. Res. Commun. **84**, 465.
- 81) Rapoport, T.A., Hohne, W.E., Heitmann, P. y Rapoport, S.M. (1972). A kinetic model for the action of the inorganic pyrophosphatase from baker's yeast. The activating influence of  $Mg^{2+}$  ions. Eur. J. Biochem. **26**, 237.
- 82) Reeves, R.E. (1976). How useful is the energy in inorganic pyrophosphate? Trends. Biochem. Sci. **1**, 53.
- 83) Risbridger, P.G., Hodgson, Y.M. y DeKrester, D.M. (1981) Mechanism of action of gonadotrophins on the testis, en "The Testis". 195. eds. H. Burger y D. de Krester. Academic. Press.
- 84) Rufo, A.G., Jr., Schoff, K.P. y Lardy, A.H. (1984) Regulation of calcium content in bovine spermatozoa. J. Biol. Chem. **259**, 2547.
- 85) Schonch, D. y Rapoport, S. (1961) On the behavior of inorganic pyrophosphatase during maturation of erythrocytes. Folia Haemat (Leipzig). **78**, 416.
- 86) Seddon, B. y Fynn, H.G. (1973) Orthophosphate analysis by the Fiske-Subbarow method and interference by adenosine phosphates and pyrophosphate at variable acid pH. Anal. Biochem. **52**, 566.
- 87) Soisani, G., Saracca, A., Castelli, G.P. y Lenaz, G. (1984) Temperature dependence of mitochondrial oligomycin-sensitive proton transport ATPase. J. Bioenergetics and Biomembranes **16**, 391.
- 88) Springs, B., Walsh, K.M. y Cooperman, B.S. (1981). Thermodynamics, kinetics, and mechanism in yeast inorganic pyrophosphatase catalysis of inorganic pyrophosphate to inorganic phosphate equilibration. Biochemistry. **20**, 6384.
- 89) Thuillier, L. (1978). Purification and properties of human erythrocyte  $Mg^{2+}$  dependent inorganic pyrophosphatase. Biochim. Biophys. Acta. **524**, 198.
- 90) Valadez Salazar, A. 1978. Posible regulación de la glicólisis en el testículo de la rata a través del control de sus ATPasas. Tesis Profesional. U.N.A.M.

91) Van der Molen, H.J., Bruijn, H.W.A., Cooke, B.A., de Jong, F.H. y Rommerts, F.F.G. ( 1973 ) Regulation of the production of testicular steroids, en "The endocrine function of the human testis", vol. 1, p. 459. eds. V.H.T. James, M. Sirio y L. Martini. Academic Press. N.Y.

92) Van der Molen, H.J., Brinkmann, A.O., Cooke, B.A., de Jong, F.H., Mulder, E., Rommerts, F.F.G. y Van der Juste, G.J. ( 1973 ) Biochemical functions of isolated interstitial tissue and seminiferous tubules from rat testis, en "The endocrine function of the human testis", vol. 1, p. 533. eds. V.H.T. James, M. Sirio y L. Martini. Academic Press. N.Y.

93) c.f. Vázquez-Memije, M.E. 1974. Actividad de adenosin trifosfatasa (ATPasa) dependiente de  $Ca^{2+}$  -  $Mg^{2+}$  de testículo de rata en diversas condiciones de maduración y de regresión del epitelio germinal. Tesis profesional. U.N.A.M. André, J. (1962) Contribution à la connaissance du chondriome. Etude de ses modifications ultrastructurales pendant la spermatogénèse. J. Ultrastruct. Res. Suppl. 3. p. 1.

94) Vázquez-Memije, M.E., Cárabez-Trejo, A., Gallardo-Trillanes, G. y Delhumeau-Ongay, G. ( 1984 ) Loose binding of testicular mitochondrial ATPase to the inner membrane. Arch. Biochem. Biophys. 232, 441.

95) Verces, A. y Lehninger, A. ( 1984 ) Rapid efflux of  $Ca^{2+}$  from heart mitochondria in the presence of inorganic pyrophosphate. Biochem. Biophys. Res. Commun. 118, 147.

96) Volk, S.E., Baykov, A.A., Duzhenko, V.S. y Avaeva, S.M. ( 1982 ) Kinetic studies on the interactions of two forms of inorganic pyrophosphatase of heart mitochondria with physiological ligands. Eur. J. Biochem. 125, 215.

97) Holtzanz, J.II. y Ashmann, W. (1970) Determination of orthophosphate in the presence of inorganic pyrophosphate in the assay of inorganic pyrophosphatase activity. Anal. Biochem. 35, 526.

98) Wood, H.G. ( 1977 ) Some reactions in which inorganic pyrophosphate replaces ATP and serves as a source of energy. Fed. Proc. 36, 2197.

99) Wood, H.G. y Goss, N.H. ( 1985 ) Phosphorylation enzymes of propionic acid bacteria and the roles of ATP, inorganic pyrophosphate and polyphosphates. Proc. Natl. Acad. Sci. ( U.S. ) 82, 312.