



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO

UNIDAD ACADEMICA DE LOS CICLOS PROFESIONALES Y DE
POSGRADO DEL COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES

**PURIFICACION PARCIAL Y CARACTERIZACION
CINETICA DE LA NUCLEOTIDASA DE
MITOCONDRIAS DE PLACENTA HUMANA
A TERMINO**

T E S I S

QUE SUSTENTA EL

BIOLOGO OSCAR FLORES HERRERA

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN INVESTIGACION

BIOMEDICA BASICA

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

CIUDA D UNIVERSITARIA, D. F.

ABRIL 1996

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El escribir un trabajo de tesis tiene varias satisfacciones, divertirse al escribir lo que uno piensa, terminar con un ciclo académico y poder dedicar el trabajo a los seres queridos. Lo primero ya lo hice, lo segundo espero concluirlo durante la réplica del trabajo de tesis, y el tercer punto, lo desarrollo en estas hojas...

Quiero dedicar esta tesis a mis apa's, que siempre me han procurado muchos apapachos. Los quiero mucho y estoy terriblemente orgulloso de ustedes. Aunque no tengo las raíces tan profundas como ustedes, siempre trato de hacer bien las cosas...

A mis hermanos: Elvira, Francisco, Raúl, José Roberto, Lucy, Enrique y Héctor (¿debería de incluir a Karla aquí?, creo que sí...) y Karla, por que como ya se ha dicho, aprendo lo mejor (y probablemente también lo peor, aunque no se note) de cada uno de ellos. Todos han sido, son y seguirán siendo, mis más queridos maestros, ojalá y sea un buen alumnito...

A mis sobrinas (Amanda, Claudia y Gabriela) y sobrinos (Emmanuel, Paco, Leonardo -el de Raúl-, Adrián, Pavel, Emilio, Daniel, Leonardo -el de Enrique- y Beto) porque son la neta. Sobre todo porque ahora ya los conozco más y sé que sí, son la neta.

A mis amigos (Luis, Lalo, Marco, León, Diego, Danyvid) y amigas (Cynthia, Darién, Aída, Cecilia, Sandra, Mónica -la del tacos-, Isabel, Ember) que son como mi tercer familia, la más joven, la de muchos sueños...

A mi familia política: a las ama's de Vi y a sus hermanas y a mi nueva sobrina que nació con la primavera del '96, por dejarme robar uno de sus momentitos de luz...

En este pedacito de papel quiero dedicar este trabajo
al amor de mi vida: Elvia, mejor conocida por "Vi", porque
"con palabras de amor y sueños de poeta es ya mi brujulita y mi rumbo...
no dejes que amanezca, no dejes que la noche caiga,
no dejes que el sol salga, solo déjame estar (y seguir) junto a ti..."
Te amo Vi...

En esta dedicatoria se dan las gracias a J.M.Serrat, J.L.Guerra y al Café Tacuba, por las palabras prestadas.

...cuando algo concluye, debemos pensar que algo comienza...
Rudolf Steiner

(lo difícil está en que sabemos lo que perdemos, no lo que ganaremos
O. Flores)

Este mundo, evidentemente, no puede ser obra de un Dios todopoderoso,
pero depende de nosotros

J. L. Borges.

¿No le gustaría, acaso, vencer la tentación sucumbiendo de lleno en sus brazos?
J. M. Serral.

La rosa sin porqué florece porque florece

Angelus Silesius
Poeta alemán del siglo XVII

ÍNDICE

	página
Resumen	1
Introducción	2
Metodología	8
Resultados	12
Discusión	30
Apéndice	37
Bibliografía	45
Agradecimientos	47

RESUMEN

Las mitocondrias de placenta humana presentan una actividad de nucleotidasa asociada de manera estrecha a su membrana interna, la cual no es el resultado de una contaminación por otras fracciones celulares. Los objetivos de este trabajo fueron purificar esta enzima y caracterizar su actividad. Para el primer objetivo se emplearon varios detergentes para solubilizar a esta enzima, pero no se consiguió purificar a la nucleotidasa; sin embargo, por métodos físicos fue posible obtener una fracción enriquecida con la actividad, con la que se realizó la caracterización cinética de la actividad de nucleotidasa. Se observó que esta enzima es inespecífica, ya que hidroliza a los nucleósidos de purina y pirimidina tri- y difosfato, así como al pirofosfato (PPi), aunque no hidroliza los nucleósidos monofosfato. La actividad de hidrólisis de la nucleotidasa tiene un pH óptimo de 8.0, depende de cationes y es sensible a vanadato de sodio pero insensible a L-fenilalanina, oligomicina o azida de sodio. Su comportamiento cinético en presencia de ADP, ATP, GDP, GDP o PPI, se ajusta al modelo de Hill con cooperatividad negativa con un número de Hill (n) entre 0.3 y 0.5, una $[S]_{0.5}$ de 1-10 mM en presencia de magnesio, calcio o manganeso y una V_{max} de 200-280, de 350-380 y de 170-200 nmolas de Pi /mg /min en presencia de magnesio, calcio o manganeso respectivamente. El calcio, en el intervalo micromolar, estimula 5 veces la hidrólisis de La-PPi, mientras que en el intervalo milimolar, el calcio o el magnesio producen un efecto mixto: por una parte disminuyen en un 50 % la actividad de hidrólisis de la nucleotidasa y por otra, permiten una mejor fijación del sustrato. Cuando se comparan las características cinéticas de la nucleotidasa de mitocondrias de placenta humana con las reportadas para otras nucleotidasas, se observa que existen múltiples diferencias, lo que abre la posibilidad de estudiar tanto sus características estructurales como su probable papel en el metabolismo esteroideogénico de la placenta humana.

INTRODUCCIÓN.

El desarrollo gestacional en los mamíferos depende de la estrecha relación que existe entre la madre y el feto. La placenta es un órgano transitorio encargado de llevar a cabo y mantener esta relación a través de la síntesis de diversos compuestos, entre los que destacan las hormonas proteicas (gonadotropina coriónica y tirotropina coriónica, entre otras) y las esteroideas (pregnenolona, progesterona, androstenediona, estrona y estriol, entre otras). Por estas características la placenta es un órgano esteroidogénico y productor de hormonas proteicas (1).

De las distintas hormonas esteroideas, la progesterona es la más importante en el mantenimiento del embarazo, ya que el aborto espontáneo del producto se ha relacionado con la disminución de su concentración en el torrente sanguíneo (2). No obstante, los diversos estudios realizados para conocer su sitio y mecanismo de acción, éstos aún se desconocen.

La pregnenolona se sintetiza en la fracción mitocondrial de los diferentes tejidos esteroidogénicos. Su síntesis comprende una serie de pasos encaminados a la transformación de colesterol hasta progesterona. Sin embargo, cabe mencionar que dichos pasos no son exactamente iguales en todos los tejidos esteroidogénicos; las diferencias involucran la compartimentalización, el tipo y comportamiento cinético de las enzimas que participan en este proceso, así como la cantidad de progesterona producida. Un ejemplo de estas diferencias se encontró al estudiar el transporte de colesterol de la membrana externa mitocondrial a la interna en las glándulas suprarrenales, testículo y ovario, en donde se describió una proteína específica denominada STAR (del inglés: Steroidogenic Acute Regulatory protein) la cual no se ha identificado en la placenta humana (3, 4). Esto sugiere que las mitocondrias de placenta humana

podrían emplear un mecanismo diferente para transportar el colesterol hasta su membrana interna.

Actualmente, diversos grupos de investigación han intensificado el estudio del mecanismo de transporte de colesterol, así como su transformación a pregnenolona, en las mitocondrias de placenta humana. Swierczynsky, et al (5) demostraron que la adición de ADP o ATP a la fracción mitocondrial aislada de placenta, estimula la síntesis de progesterona. Más aún, los autores demostraron que el efecto de estos nucleótidos se lleva a cabo en el espacio intermembranal y no en el interior mitocondrial; sin embargo, los autores no determinaron el mecanismo por el cual los nucleósidos de adenina tri y difosfato llevan a cabo dicha estimulación.

En nuestro laboratorio hemos demostrado que en la fracción mitocondrial aislada de placenta humana existen una actividad de ADPasa y ATPasa distintas de la actividad propia de la ATPsintetasa (8, 9). Dichas actividades están asociadas de manera estrecha a la membrana interna mitocondrial y la hidrólisis de los nucleótidos se realiza en el espacio intermembranal (9, 10). Un resultado interesante, es que la hidrólisis de ATP a ADP induce el consumo de oxígeno en la mitocondria, lo que provoca las transiciones de estado 4/estado 3/estado 4; esto permite calcular el control respiratorio (CR), cuyo valor es 2-3 veces superior al reportado por otros autores para el mismo sistema mitocondrial en condiciones similares (11). Lo anterior demuestra que la actividad de hidrólisis de ATP a ADP que ocurre en el espacio intermembranal, no desacopla a la mitocondria y que está estrechamente regulada y asociada al metabolismo mitocondrial. También se demostró que las actividades de hidrólisis de los nucleótidos no son el resultado de una contaminación por otras fracciones celulares (9, 10).

Aunado a esto, el uso de NaF, L-fenilalanina y P^1 , P^5 -di-(adenosina-5') pentafofato (Ap5), inhibidores de la fosfatasa inespecifica (6), la fosfatasa alcalina (6) y la miocinasas respectivamente (7) no modifica ni la hidrólisis de ATP o ADP ni la estimulación de consumo de oxígeno en las mitocondrias de placenta humana (8, 9).

Por otra parte, resultados preliminares de este laboratorio sugieren que la actividad de hidrólisis de ATP y ADP pertenecen a una misma enzima, probablemente una 5'-nucleotidasa.

Las nucleotidasas son enzimas que catalizan la liberación de fosfato de los nucleósidos 5'- tri, di y monofosfato, así como su contraparte desoxinucleótidos y compuestos tales como el UDP-glucosa y el FAD+ (30). Su distribución en la escala evolutiva es amplia, ya que se han reportado 5'-nucleotidasas en bacterias (12-15), protozoarios (16), peces (17, 18), plantas (19-21) y mamíferos (22-28).

Las nucleotidasas pueden encontrarse en forma soluble en el citoplasma o asociadas a la membrana plasmática a través de un puente de glucosfosinoitol (22). La clasificación de estas enzimas involucra su localización y sustrato preferente; así pues, se tiene que las formas solubles que utilizan IMP se denominan c-N-I (del inglés cytoplasmic nucleotidase I), mientras que aquellas que prefieren AMP se denominan c-N-II. Por otra parte, las nucleotidasas de membrana se conocen como e-N (del inglés ecto-nucleotidase) sin tomar en cuenta el tipo de sustrato ni la fracción subcelular a que estén asociadas (29).

La purificación de varias nucleotidasas, tanto solubles (15, 23) como de membrana (12-14), ha permitido conocer algunas de sus características estructurales: el peso molecular del estado nativo de las diferentes

nucleotidasas varía entre los 150 y 265 kDa, mientras que a partir de la electroforesis en condiciones desnaturalizantes se determinó un peso molecular de entre 40 y 80 kDa. A partir de estos resultados se ha sugerido que las formas solubles son dímeros funcionales mientras que las nucleotidasas de membrana pueden ser dímeros o tetrámeros, donde la unidad básica funcional es el dímero. Las diferentes subunidades se encuentran asociadas por medio de puentes disulfuro intercatenarios, los cuales son esenciales para la actividad (30-31).

Actualmente, se conoce la estructura primaria de cuatro nucleotidasas solubles (de placenta humana [28], de hígado de rata [27], de cerebro del pez elasmobranquio, *Discopyge ommata* [18] y de *E. coli* [15]) y dos de membrana (de *Vibrio costicola* [14] y *Vibrio parahemolítico* [12, 13]). Las dos enzimas de mamífero muestran cerca del 90 % de identidad entre ellas, mientras que la 5'-nucleotidasa de *Discopyge ommata* tiene un 61 % de identidad con respecto a cualquiera de las nucleotidasas de mamífero (tabla 1) (29).

Tabla 1. Relación de identidad de varias 5'-nucleotidasas.

Fuente	Localización celular	Número de aminoácidos	% de identidad por grupo*	% de identidad con respecto a mamíferos	Cita
Placenta Humana	Citoplasma	548	90		28
Hígado de Rata	Citoplasma	548	90		27
<i>Discopyge ommata</i>	Citoplasma	577		60	18
<i>E. coli</i>	Citoplasma	525	60	22	15
<i>V. costicola</i>	Memb. plas. cara externa	539	60	22	14
<i>V. parahemolitic.</i>	Memb. plas. cara externa	539	60	22	12, 13

*=Los grupos son: mamíferos, peces y bacterias, respectivamente.

Las 5'-nucleotidasas de *V. costicola* (14), *V. parahemolítico* (12, 13) y *E. coli* (15), tienen una identidad del 60 % sin importar su localización celular. En

relación a las enzimas de mamífero, éstas presentan solo un 22 % de identidad. Sin embargo, esta comparación de la estructura primaria muestra la existencia de regiones altamente conservadas, lo que sugiere la existencia de un ancestro común y abre la posibilidad de estudiar el significado funcional de estas regiones (29).

La función metabólica de este tipo de enzimas aún no es del todo conocida, sin embargo, se ha sugerido que la actividad de las formas solubles participa en el control de los niveles de los nucleósidos 5'-monofosfato, mientras que las nucleotidasas de membrana intervienen en la cascada de hidrólisis del ATP hasta la adenosina. Estas últimas han adquirido, recientemente, un gran interés farmacológico (29).

Un avance en el conocimiento de la participación de la actividad de esta 5'-nucleotidasa en el metabolismo mitocondrial de la placenta, resultó del estudio del efecto de la osmolaridad sobre la hidrólisis de los nucleósidos de adenina tri- y difosfato y su posible repercusión en el metabolismo mitocondrial. De estos estudios concluimos que tanto la hidrólisis de ATP como la de ADP, están reguladas por el estado energético mitocondrial (32), lo que, nuevamente, sugiere que estas actividades están asociadas con el metabolismo mitocondrial de la placenta. Estos resultados son interesantes, ya que se ha propuesto que el potencial electroquímico desempeña un papel importante en la transferencia de colesterol de la membrana externa mitocondrial a la interna.

Tres puntos importantes, el que la actividad de la nucleotidasa probablemente esté regulada por las condiciones metabólicas de la mitocondria (32), que la hidrólisis de ATP produzca un estímulo del consumo de oxígeno (9) y de la síntesis de progesterona (5), hacen de esta proteína un modelo interesante como para llevar cabo su purificación y el estudio cinético y estructural de la enzima.

Así pues, el objetivo de este trabajo es purificar y caracterizar el comportamiento cinético de la nucleotidasa de las mitocondrias de placenta humana a término.

METODOLOGÍA.

Aislamiento de las mitocondrias de placenta humana a término y de partículas submitocondriales. Las mitocondrias de placenta humana (MPH) se aislaron como se reportó en (33). Las partículas submitocondriales (PSM) se obtuvieron por el método descrito en (8). La concentración de proteína se determinó utilizando una modificación del método de Lowry reportado en (34). En esta técnica se trató a la muestra con 0.017 % del detergente desoxicolato (DOC) durante 10 minutos, seguido de la adición de ácido tricloroacético (TCA) frío a una concentración final de 10 %. La proteína se recuperó por centrifugación a 1,800 x g durante 30 min y se cuantificó empleando albúmina sérica de bovino (BSA) como referencia.

Solubilización de la nucleotidasa. Se utilizaron los siguientes detergentes para solubilizar a la nucleotidasa: desoxicolato de sodio (DOC), Zwittergent 3-14, lubrol y lauril maltósido. Debido a que dichos detergentes no permitieron solubilizar a la enzima, los resultados se describen en el Apéndice.

Fraccionamiento de las PSM. La PSM (20 mg/ml) se incubaron durante 10 min en presencia de 4 mM de ATP, 3 mM de EDTA, pH de 9.2 ajustado con NH_2OH (35). La muestra se sonicó a 22 micrones en 2 periodos de 10 min cada uno en un sonicador Soniprep 150 marca MSE. La temperatura durante la sonicación se controló por medio de un baño de hielo y no sobrepasó los 39°C. La muestra presentó un aspecto translúcido y se centrifugó a 100,000 x g durante 90 min a 4°C. El 90 % de la actividad de nucleotidasa se localizó en el sobrenadante, el cual se colectó para continuar con la purificación.

Aproximadamente 80 mg totales de proteína de este sobrenadante se aplicaron a una columna de Sephacryl S400 HR (40 cm de altura X 2.5 cm de diámetro) equilibrada con una solución de glicerol al 5 % y Tris-HCl 30 mM, pH 8.0. La muestra se eluyó con el

mismo amortiguador a un flujo de 16 ml/hr a temperatura ambiente y se colectaron 50 fracciones de entre 5-6 ml cada una.

La hidrólisis de nucleótidos de adenina, así como de pirofosfato (PPi), se determinó para cada fracción colectada en un medio que contenía 30 mM de Tris-HCl pH 8.0, 5 mM de $MgCl_2$ y 5 mM de sustrato (ADP, ATP o PPi). El volumen final de la mezcla de reacción fue de 500 μ l, la concentración de proteína de 50 μ g y la temperatura de 30°C. La reacción enzimática se dio por terminada a los 15 min con la adición de 6 % de TCA frío. La mezcla se centrifugó durante 15 min a 1,800 x g a 4°C. Se tomó una muestra del sobrenadante para determinar la concentración de fosfato libre empleando el método descrito por Sumner (36).

Las fracciones que contenían la actividad de nucleotidasa se reunieron en un solo lote para ser concentradas en una cámara de ultrafiltración Amicon, empleando una membrana Diaflo YM30. El gas utilizado para elevar la presión en el interior de la cámara fue nitrógeno y la temperatura de 4°C. La concentración final de la preparación fue de 3 mg/ml. Durante este procedimiento, no se observó pérdida de actividad de nucleotidasa o de proteína.

Determinación del grado de pureza de la nucleotidasa. Para determinar el grado de pureza de la nucleotidasa, se realizaron electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes según el método reportado por Laemmli (37).

Efecto del pH sobre la actividad de nucleotidasa. Se realizaron cursos temporales en presencia de los siguientes amortiguadores: MES (pKa = 6.1 a 22°C) para el intervalo de 5.5 a 7.0, Tris (pKa = 8.1 a 22°C) para el intervalo de 7.0 a 8.5 y AMPSO (pKa = 9.0 a 22°C) para el intervalo de 8.5 a 10.0. La mezcla de reacción contenía 30 mM del amortiguador, 1 mM de $MgCl_2$ y 6 mM de una solución equimolar de Mg-ATP, Mg-ADP o

Mg-AMP. La concentración final de proteína fue de 50 μg y la temperatura de 30°C. La reacción se terminó a diferentes tiempos (1, 2, 3, 4 y 5 min) adicionando 6 % de TCA frío. Se obtuvo un sobrenadante claro por medio de centrifugación (1,800 x g durante 15 min a 4° C); el fosfato libre se determinó por medio del método reportado por Lanzetta (38), empleando el colorante verde de malaquita. Es importante comentar que fue necesario utilizar esta metodología ya que los niveles de fosfato liberado a tiempos cortos no son detectados por el método de Sumner (36). Sin embargo, cabe mencionar que la determinación de fosfato por el método reportado por Lanzetta es sensible a la reducción del colorante por el TCA, por tal motivo, fue necesario que las curvas de calibración tuvieran la misma concentración final del ácido que las muestras.

El protocolo experimental descrito en esta sección para determinar la actividad de nucleotidasa, así como el fosfato libre, se emplea en todos los experimentos posteriores que involucran la hidrólisis de nucleótidos o pirofosfato.

Efecto de diversos inhibidores sobre la actividad de nucleotidasa. Se determinó el efecto de oligomicina (2 μg totales), vanadato (2 mM), azida de sodio (5 mM) o L-fenilalanina (30 mM) en un medio que contenía 1 mM de MgCl_2 , 30 mM de Tris-HCl pH 8.0 y 15 mM de sustrato (Mg-AMP, Mg-ADP o Mg-ATP). Por otra parte, para determinar el efecto de la L-fenilalanina en presencia de Mg-AMP, el amortiguador fue AMPSO 30 mM, pH 10.0

Determinación de los parámetros cinéticos. Las constantes cinéticas de la actividad de nucleotidasa se determinaron realizando cursos temporales en un medio que contenía 30 mM de Tris-HCl, pH 8.0, 1, 10 o 20 mM de MgCl_2 libre y diferentes concentraciones de una mezcla estequiométrica de Mg-ADP o Mg-ATP. Experimentos similares se realizaron en presencia de calcio y se determinaron los parámetros cinéticos en presencia de Ca-ADP o Ca-ATP. Para el caso del Mn-ATP y Mn-ADP la concentración de manganeso libre fue de 1 mM. De igual forma, para Mg-GDP, Mg-GTP y Mg-PPi, la concentración de MgCl_2 libre

fue de 1 mM. El ajuste de los datos a los diferentes modelos cinéticos presentados en este trabajo, se realizaron con el programa Enzfitter (39).

Efecto del nucleótido o de catión libre (magnesio o calcio) sobre la actividad de nucleotidasa. Se estudió el efecto de ADP libre o ATP libre sobre la actividad de nucleotidasa, realizando cursos temporales en un medio que contenía 2 mM del complejo catión-ATP o catión-ADP, 30 mM de Tris-HCl, pH 8.0 y diversas concentraciones del nucleótido libre. De manera similar, el efecto de magnesio, calcio o manganeso libre, se estudió a través de cursos temporales en un medio que contenía 15 mM de sustrato (catión-ADP o catión-ATP), 30 mM de Tris-HCl, pH 8.0 y distintas concentraciones del catión libre. Los cálculos para determinar la concentración del complejo catión-nucleótido, del catión y nucleótido libres, se llevaron a cabo con el programa Chelator (40).

Efecto del calcio o magnesio en la hidrólisis de lantano-PPi. Se realizaron cursos temporales utilizando 0.5 mM de una mezcla estequiométrica de La-PPi, en un medio que contenía 30 mM de Tris-HCl pH 8.0, en presencia de diversas concentraciones de calcio o magnesio en el intervalo micromolar.

RESULTADOS.

La fracción obtenida de la sonicación de las PSM en presencia de ATP, EDTA a pH 9.2 con NHOH se cargó en una columna de Sephacryl S400 HR. El perfil de purificación obtenido de la filtración en gel se muestra en la figura 1. Como se puede observar, la proteína se distribuye principalmente en dos picos, el primero de los cuales contiene el 30 % de la proteína total y presenta su máximo en la fracción cinco y el segundo con menos concentración de proteína, en la doce. La actividad de nucleotidasa se asocia solamente con el primer pico. Esto sugiere que la actividad de nucleotidasa se asocia a estructuras de alto peso molecular, mientras que las estructuras que tienen un mayor tiempo de retención en la columna, no muestran actividad.

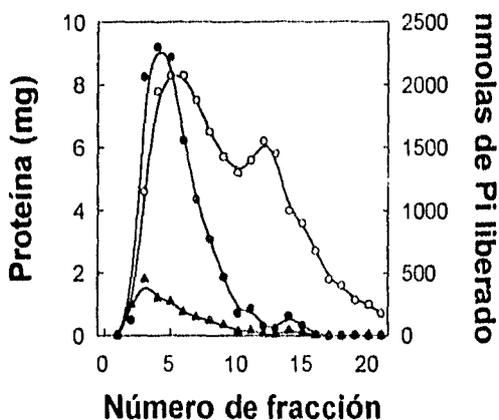


Figura 1. Perfil de purificación obtenido de la filtración en columna, empleando la resina Sephacryl S400 HR. (○) proteína, (▲) actividad específica, (●) actividad total.

En la tabla 1 se observa que las fracciones 3 a 7 contienen, cada una de ellas, entre el 10 y 20 % de la actividad de nucleotidasa y solamente del 4.7 al 8.5 % de la proteína inicial. Cuando estas fracciones se mezclaron y se concentraron en la cámara de ultrafiltración, se obtuvo una preparación que presentaba el 80 % de la actividad inicial de nucleotidasa y un 30 % de la proteína inicial,

con un factor de purificación de 2.16 y un rendimiento del 80 %. Cabe mencionar que un factor de purificación de 2 o más para una proteína de membrana es considerable,

ya que la estrecha relación que existe entre los lípidos y las zonas hidrofóbicas de las proteínas de membrana, dificulta la obtención de una proteína pura, estable, con actividad y en alta concentración. Sin embargo, aunque no es posible tener a la proteína en condiciones de homogeneidad, este procedimiento muestra que se puede obtener una fracción substancialmente enriquecida con la actividad de nucleotidasa. Aunado a esto, dicha fracción contiene algunos de los citocromos de la cadena de transporte de electrones, lo que sugiere una estrecha relación entre la nucleotidasa y la membrana interna mitocondrial (datos no mostrados).

Tabla 2. Rendimiento de la filtración en columna utilizando la resina Sephacryl S400 HR.

Fracción	Proteína (mg)	Volumen (ml)	Actividad específica ^a	Actividad total ^b	Rendimiento (%)	Factor de purificación
Inicial	97.0	5	117	11 383	100	1.0
Fracc. 3	4.6	7	448	2 063	18	3.8
Fracc. 4	7.8	7	295	2 304	20	2.5
Fracc. 5	8.3	6	268	2 222	20	2.3
Fracc. 8	6.3	6	188	1 558	14	1.6
Fracc. 7	7.5	6	145	1 089	10	1.2
Concentrado	38.5	10	253	9 234	81	2.2

a = nmolas de PI /mg /min

b = nmolas de PI /mg totales /min

Para determinar el grado de pureza de esta preparación, se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida, en condiciones desnaturizantes. Como se puede observar en la figura 2, la fracción enriquecida (carril D), mostró un incremento en la proporción de un polipéptido de aproximadamente 56 kDa de peso molecular aparente. Esta banda contribuye en 80 % al contenido total de proteína de esta preparación, aunque aparece de manera importante tanto en la preparación mitocondrial (carril B) como en las PSM (carril C). El incremento en el tamaño de esta banda es cercano a 2, que

coincide con el factor de pureza de la tabla 2. Aunado a esto, experimentos de isoelectroenfoque de una preparación de PSM solubilizadas con el detergente Zwittergent 3-14 (Apéndice), sugieren que hay una posible relación entre la actividad de nucleotidasa y la presencia de esta banda de 56 kDa. Sin embargo, es necesario incrementar la pureza de la preparación y realizar nuevos experimentos para confirmar la posible relación entre esta banda proteica y la actividad de nucleotidasa.

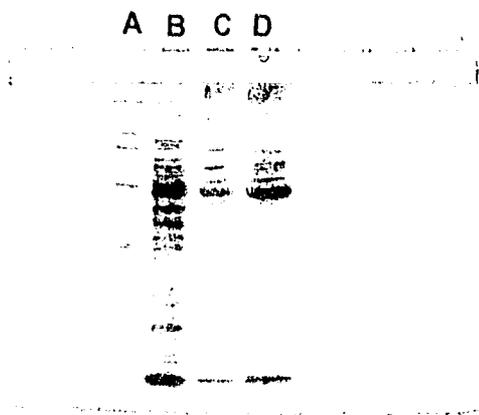


Figura 2. Electroforesis en condiciones desnaturalizantes de las MPH (B), las PSM (C) y la fracción enriquecida en la actividad de nucleotidasa (D). Patrón de peso molecular (A): miosina (205 kDa), β -galactosidasa (116 kDa), fosforilasa b (97 kDa), albúmina de bovino (66 kDa), albúmina de huevo (45 kDa) y anhidrasa carbónica (29 kDa).

A continuación se determinó el efecto del pH sobre la actividad de nucleotidasa en presencia de diferentes sustratos (figura 3). Como se puede apreciar, la actividad de hidrólisis de Mg-ATP (figura 3A) mostró un máximo a pH de 8.0, para después descender en un 40 % a pH de 10.0. Asimismo, la actividad en presencia de Mg-ADP (figura 3B) mostró un máximo a pH de 8.0 y una disminución del 20 % a pH 10.0. Esta diferencia en el comportamiento de ambas actividades puede atribuirse a la titulación de algún grupo funcional importante en la fijación del tercer fosfato del ATP; fenómeno que no repercute para la fijación del ADP.

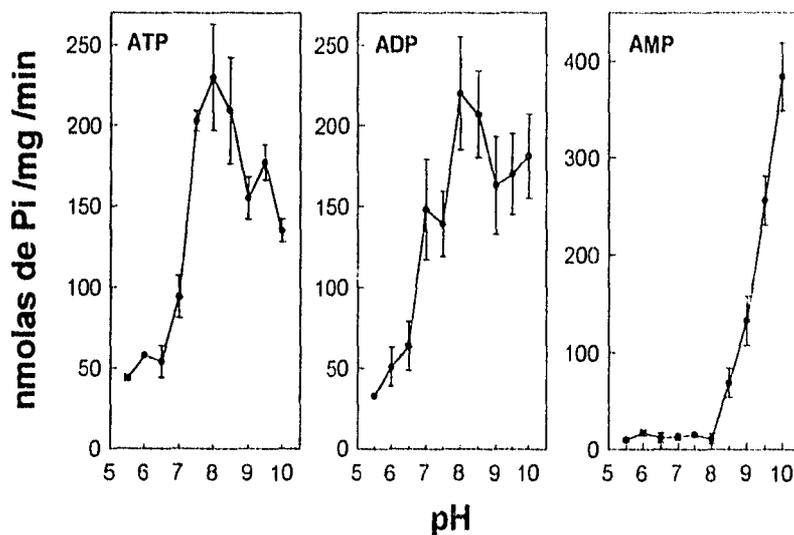


Figura 3. Efecto del pH sobre la actividad de nucleotidasa en presencia de Mg-ATP, Mg-ADP o Mg-AMP.

Sin embargo, cabe notar que el valor de la actividad específica para estos dos sustratos, a lo largo del incremento del pH, difiere en menos del 15 %. Por último, la

actividad en presencia de Mg-AMP (figura 3C) presenta un comportamiento totalmente distinto al mostrado para el ATP o ADP. Como puede observarse, la hidrólisis es baja en el intervalo de pH de 5.5 a 8.0, mostrando un incremento de alrededor de veinte veces a pH de 10.0. Un aumento en la actividad en presencia de Mg-AMP en condiciones alcalinas, sugiere la existencia de una fosfatasa alcalina como contaminante. Para comprobar la presencia de esta enzima se utilizó la L-fenilalanina, un inhibidor específico de la fosfatasa alcalina (6).

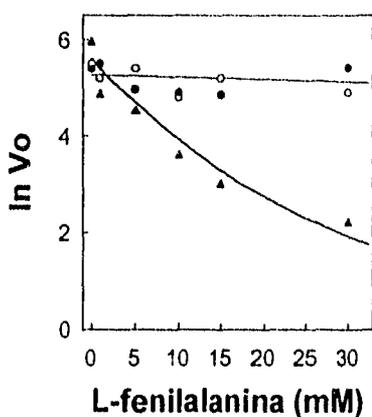


Figura 4. Efecto de la L-fenilalanina sobre la hidrólisis de (●) Mg-ATP, (○) Mg-ADP y (▲) Mg-AMP. Para la actividad en presencia de ATP y ADP, el pH = 8.0, para AMP, el pH = 10.0.

Como se puede ver en la figura 4, la actividad de hidrólisis de Mg-ATP o Mg-ADP no se modifica en presencia de L-fenilalanina, por otra parte, la hidrólisis del Mg-AMP muestra una inhibición del 90 % en presencia de la concentración máxima del inhibidor (30 mM). Este resultado demuestra que la preparación de nucleotidasa tiene una fosfatasa alcalina como contaminante. Sin embargo, la actividad de la fosfatasa alcalina no interviene en la liberación de fosfato, en las condiciones experimentales empleadas para determinar la actividad de la nucleotidasa sobre el PPI y los distintos nucleósidos tri- o difosfato. Por tanto esta

enzima contaminante no modifica los parámetros cinéticos obtenidos.

No obstante, para comprobar que tanto la hidrólisis de PPI como de los diferentes nucleósidos tri- o difosfato corresponde a la actividad de una sola enzima, se realizaron cursos temporales en presencia de vanadato de sodio (figura 5). Se puede

observar que la hidrólisis de Mg-ATP y Mg-ADP disminuye en forma paralela al incrementarse la concentración del inhibidor, alcanzando una inhibición del 90 % en presencia de 2 mM de vanadato.

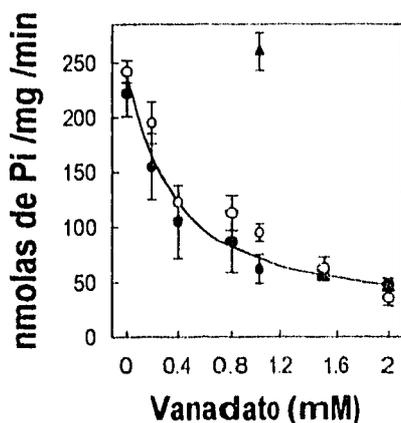


Figura 5. Efecto del vanadato de sodio sobre la hidrólisis del (●) Mg-ATP, (○) Mg-ADP y (▲) Mg-AMP. La hidrólisis de ATP y ADP fue a pH = 8.0, la de Mg-AMP, a pH = 10.0.

Además, ambas actividades presentan el mismo comportamiento: hay una importante disminución de la actividad a concentraciones bajas de vanadato (0.4 mM), para después mostrar una menor sensibilidad al compuesto. La inhibición de la hidrólisis de Mg-PPi por vanadato presenta un comportamiento similar a los mostrados para Mg-ADP y Mg-ATP (datos no mostrados), lo que sugiere que la hidrólisis de los nucleósidos tri-, difosfato y del pirofosfato se lleva a cabo por la misma enzima. Por el contrario, al

determinar la hidrólisis de Mg-AMP a pH 10.0 en presencia de 1 mM de vanadato de sodio no se observó inhibición.

Por otra parte, la adición de inhibidores como la oligomicina o la azida de sodio, no modificó la actividad de nucleotidasa. Esto sugiere que la posibilidad de tener a la ATP-sintetasa activa como contaminante, es nula.

Así pues, se puede sugerir que la actividad de hidrólisis del PPI y de los distintos nucleósidos tri- y difosfato reportada en este trabajo, corresponde exclusivamente a la nucleotidasa de la mitocondria de placenta humana.

Con base en los resultados descritos, se realizó la caracterización cinética de la nucleotidasa. La figura 6 muestra los cursos temporales de la actividad de hidrólisis de la nucleotidasa, en presencia de distintas concentraciones de Mg-ADP o Mg-ATP. Como se puede apreciar, la actividad es lineal con respecto al tiempo y depende de la concentración del sustrato. Aunado a esto, la hidrólisis del sustrato no excede al 5% de su concentración inicial, lo que permite calcular la velocidad inicial de hidrólisis en presencia de las diferentes concentraciones del sustrato.

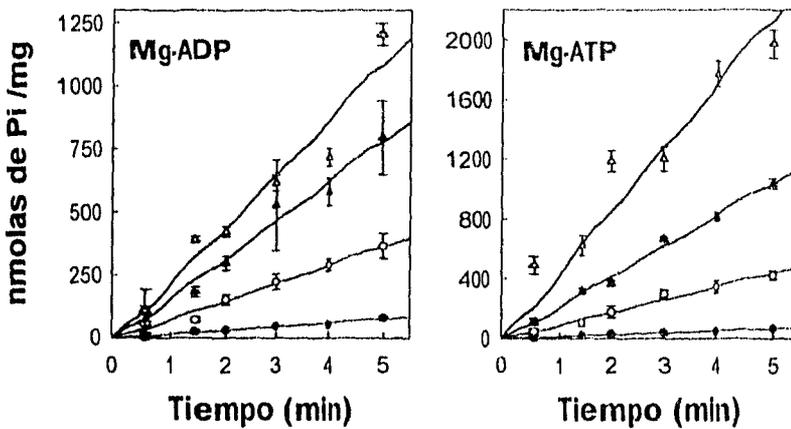


Figura 6. Cursos temporales de la actividad de hidrólisis de la nucleotidasa en presencia de Mg-ADP [(●) = 0.005, (◐) = 0.025, (▲) = 6.0, (◑) = 15.0 mM] o de Mg-ATP [(◓) = 0.01, (◔) = 0.25, (▲) = 6.0, (◑) = 15.0 mM]

De la pendiente de estos experimentos se determinó la actividad específica de la enzima y se elaboró la curva de saturación en presencia de Mg-ADP, Mg-ATP, Mg-GDP, Mg-GTP o Mg-PPi (figura 7). Como se puede observar, en la primera fase de la curva se alcanza una alta velocidad de hidrólisis en presencia de bajas

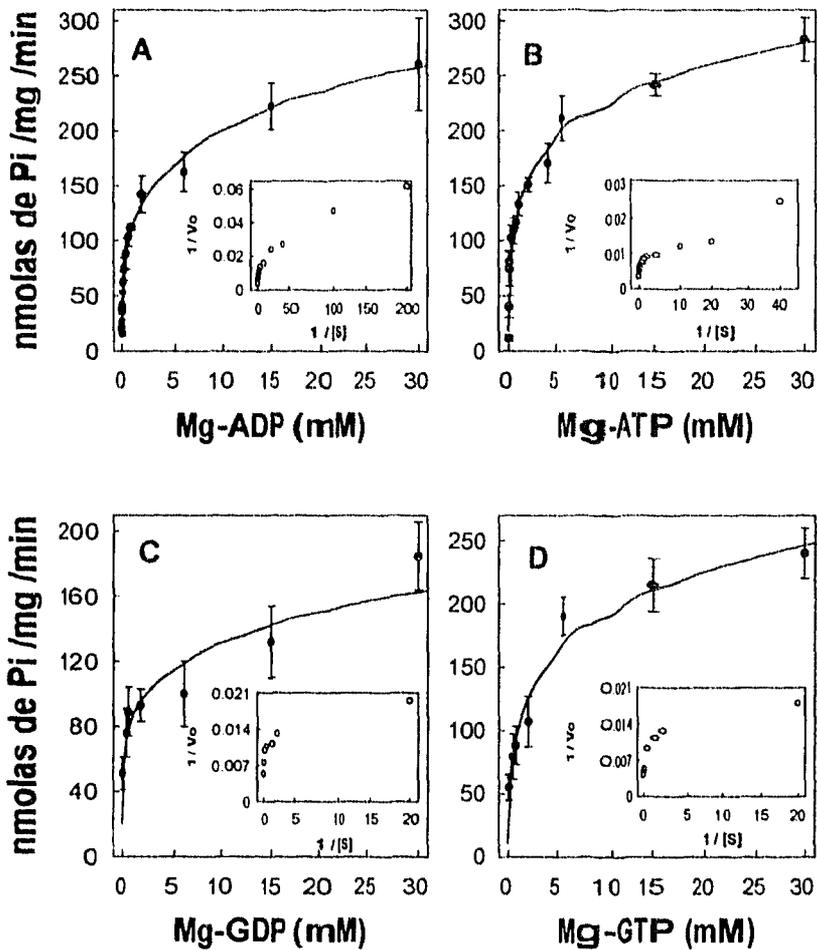


Figura 7. Cinética de la actividad de hidrólisis de la nucleotidasa en presencia de A) Mg-ADP B) Mg-ATP, C) Mg-GDP, D) Mg-GTP y E) Mg-PPi. El comportamiento cinético se ajusta al modelo de Hill, con cooperatividad negativa. El recuadro muestra el gráfico de Lineweaver-Burk.

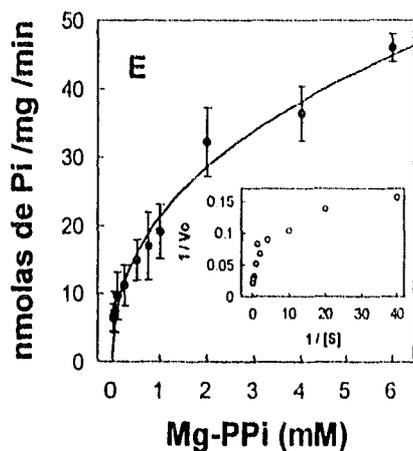


Figura 7. continuación.

Según éste, la unión de cada molécula de sustrato a la enzima, decrece la afinidad intrínseca de los sitios vacíos restantes. Los parámetros cinéticos obtenidos mediante este ajuste se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Parámetros cinéticos de la actividad de nucleotidasa de MPH, en presencia de distintos sustratos.

S	Mg ²⁺				Ca ²⁺				Mn ²⁺			
	K ^a	Vmax ^b	n	[S] _{0.5}	K ^a	Vmax ^b	n	[S] _{0.5}	K ^a	Vmax ^b	n	[S] _{0.5}
ADP	1.55	261	0.51	2.37	1.12	350	0.43	1.31	2.50	169	0.53	5.63
ATP	1.14	280	0.50	1.28	1.18	380	0.50	1.39	3.16	197	0.73	4.79
GDP	2.00	240	0.33	8.13								
GTP	1.89	250	0.56	3.12								
PPI	10.4	200	0.45	182								

S = sustrato.

a = mM

b = nmolas de Pi /mg /min

n = número de Hill

[S]_{0.5} = K^{1/n}

concentraciones del sustrato. Posteriormente, la variación de la velocidad de hidrólisis con respecto a la concentración del sustrato disminuye. El recuadro muestra la gráfica de los datos según la ecuación de Lineweaver-Burk. Se observa que los puntos no se ajustan a una recta, lo que sugiere que la nucleotidasa no sigue el modelo cinético de Michaelis-Menten. Por otra parte, al utilizar la ecuación de Hill, se observa que los datos se ajustan a un modelo de cooperatividad negativa.

Como se puede observar, para los distintos nucleótidos en presencia de Mg^{2+} , la K se encuentra en el intervalo de 1 a 2 mM. El número de Hill (n) oscila entre 0.3 y 0.5, lo que indica una fuerte cooperatividad negativa, y la velocidad máxima (V_{max}) varía entre 240 y 280 nmolas de Pi /mg /min.

De acuerdo con el modelo de Hill, la constante K comprende a los distintos factores de interacción (a, b, c, ...) entre los diferentes sitios catalíticos, así como a la constante de disociación intrínseca (K_s), por lo que no se puede considerar como el parámetro que define la concentración de sustrato que produce la mitad de la velocidad máxima (excepto cuando $n = 1$). Así pues, se debe hacer la siguiente consideración para obtener la concentración de sustrato que produce la mitad de V_{max} :

$$\text{Si } v = \frac{V_{max} [S]^n}{K' + [S]^n} \quad ; \text{ cuando } v = 0.5 V_{max}$$

$$0.5 V_{max} = \frac{V_{max} [S]_{0.5}^n}{K' + [S]_{0.5}^n}$$

$$0.5 V_{max} (K' + [S]_{0.5}^n) = V_{max} [S]_{0.5}^n$$

$$\underline{0.5 V_{max} (K' + [S]_{0.5}^n)} = [S]_{0.5}^n$$

$$0.5 (K' + [S]_{0.5}^n) = [S]_{0.5}^n$$

$$0.5 K' + 0.5 [S]_{0.5}^n = [S]_{0.5}^n$$

$$0.5 K' = [S]_{0.5}^n - 0.5 [S]_{0.5}^n$$

$$0.5 K' = 0.5 [S]_{0.5}^n$$

$$K' = [S]_{0.5}^n$$

$$[S]_{0.5} = K'^{1/n}$$

Como se puede observar en la tabla 3, la $[S]_{0.5}$ varía entre 1-10 mM para los diferentes nucleótidos. Esto indica que la enzima no tiene preferencia entre una adenina o una guanina o entre un nucleósido tri- o difosfato.

Cuando el sustrato es Mg-PPi, el comportamiento cinético fue similar al descrito arriba, aunque se observó una clara disminución tanto en la afinidad como en la capacidad catalítica de la nucleotidasa (figura 7E y tabla 3). Esto sugiere dos cosas: i) que la nucleotidasa es capaz de reconocer y fijar al Mg-PPi y que es este enlace (Pi-Pi) el susceptible a la actividad de la enzima, y ii) que la base nitrogenada es necesaria para mejorar la fijación del sustrato.

Cuando el magnesio se reemplazó por calcio o manganeso en presencia de ATP o ADP, la cinética de hidrólisis no se modificó (figura 8A y B). Las constantes cinéticas se muestran en la tabla 3. La K_m para Ca-ADP y Ca-ATP es aproximadamente 1 mM, la $[S]_{0.5} = 1.3$ mM y el $n = 0.5$; como se puede apreciar, estos valores están en el intervalo descrito para el Mg-ADP y Mg-ATP. Sin embargo, la V_{max} en presencia de Ca^{2+} muestra un incremento de cerca de 1.3 veces con respecto a la calculada para el Mg^{2+} . Esto sugiere que el calcio podría desempeñar un papel en la regulación de la actividad catalítica de la nucleotidasa, ya sea al estabilizar el estado de transición de la hidrólisis del sustrato, o al favorecer la liberación de los productos de la misma. El efecto del Ca^{2+} sobre la actividad de nucleotidasa será discutido más adelante.

Con el Mn^{2+} , el comportamiento cinético se ajustó nuevamente al modelo de cooperatividad negativa (figura 8C y D), donde la $[S]_{0.5}$ tuvo un valor entre 4 y 5 mM y la V_{max} entre 160 - 200 nmolas de Pi /mg /min. Como se puede observar, el Mn^{2+} permitió que el sustrato se fijara a la enzima en un intervalo de concentración similar al de los otros dos cationes; sin embargo, produce una velocidad máxima de solo el 50 - 60 % con respecto al Ca^{2+} o Mg^{2+} , respectivamente (tabla 2). Esto puede deberse a que este catión no es capaz de llevar a cabo una buena estabilización del estado de transición para la hidrólisis o no permite una adecuada liberación de los productos.

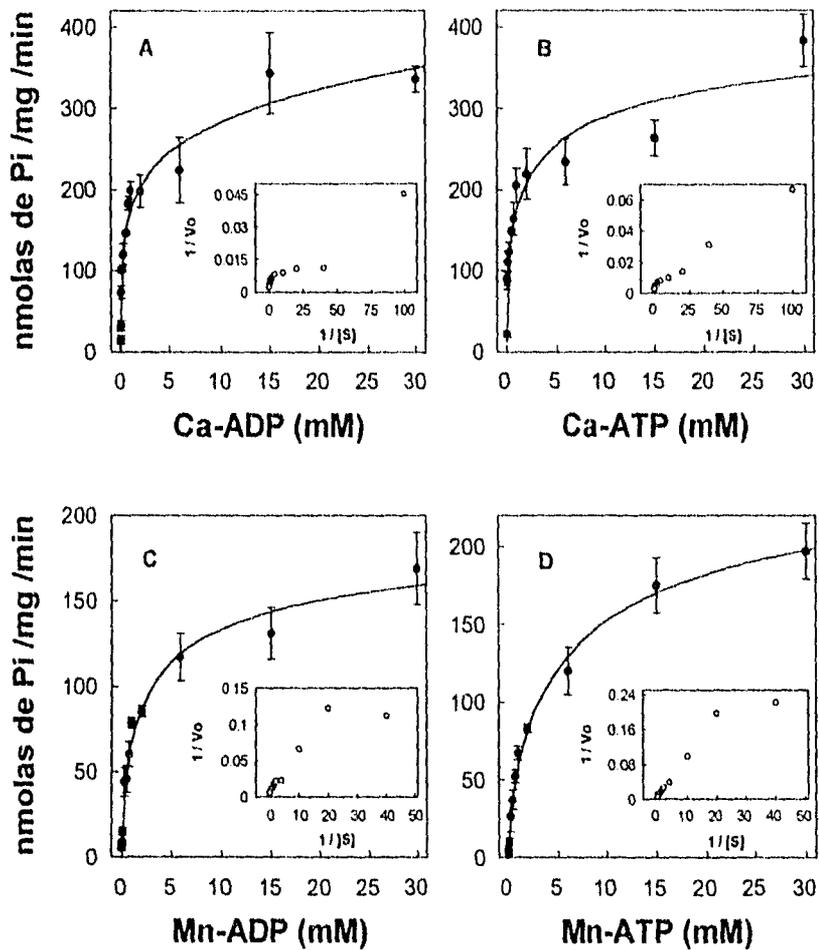


Figura 8. Cinética de actividad de hidrólisis de la nucleotidasa en presencia de A) Ca-ADP B) Ca-ATP, C) Mn-ADP y D) Mn-ATP. El comportamiento cinético se ajusta al modelo de Hill, con cooperatividad negativa. En el recuadro se muestra el gráfico de Lineweaver-Burk.

El efecto que tiene el exceso de ion divalente en la actividad de la nucleotidasa se muestra en la figura 9. Aquí se puede observar, que concentraciones altas (30 mM) de magnesio o calcio producen una inhibición de cerca del 50 % de la V_{max} de la nucleotidasa, tanto en presencia de ADP como de ATP.

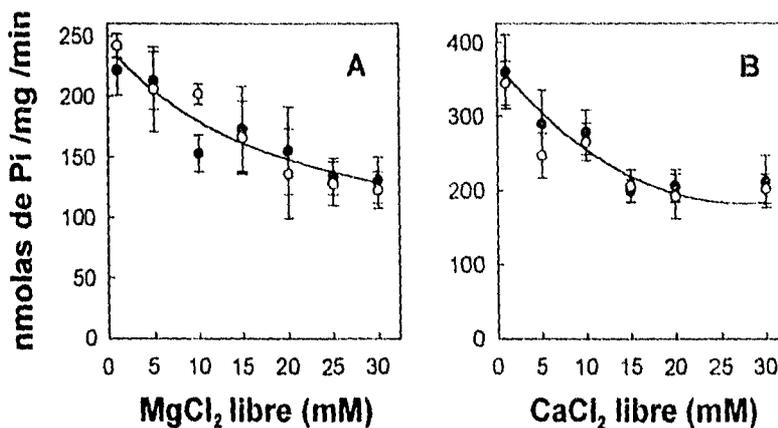


Figura 9. Efecto de concentraciones milimolares de magnesio o calcio sobre la actividad de nucleotidasa en presencia de (●) catión-ATP y (○) catión-ADP.

Del gráfico del logaritmo natural de la velocidad ($\ln V_0$) contra la concentración del catión libre, se obtiene, por extrapolación, la actividad en ausencia de ion libre. El valor de la velocidad obtenida por este método difiere en menos del 10 % con respecto al obtenido en presencia de 1 mM de magnesio o calcio libre. Esto indica que las condiciones empleadas en los experimentos para determinar los parámetros cinéticos son las adecuadas.

Para verificar si el efecto del calcio o magnesio es solamente sobre la capacidad catalítica de la enzima, se realizaron estudios cinéticos en presencia de diferentes

concentraciones de ambos cationes. La figura 10 muestra el efecto del magnesio o calcio libre sobre la hidrólisis del ADP o ATP.

Como se puede observar, en todas las condiciones, la cinética de hidrólisis se ajustó al modelo de Hill con cooperatividad negativa. Aunado a esto, se ve claramente que el parámetro más sensible al incrementar la concentración del catión libre es la V_{max} .

Los parámetros calculados a partir de estas curvas se muestran en la tabla 4. Se aprecia que la K se encuentra en el intervalo de 0.1 a 0.5 mM, mientras que la V_{max} disminuye en un 50 %. Asimismo, la n disminuye hasta 0.2, lo que sugiere que la enzima incrementa su cooperatividad negativa. Por último, la $[S]_{0.5}$ disminuye entre 18 a 22 veces para ADP y entre 9 a 16 veces para el ATP, lo que indica que se requieren menores concentraciones de sustrato para alcanzar la mitad de la velocidad máxima. Esto sugiere que los cationes como el Ca^{2+} o el Mg^{2+} podrían tener un efecto regulatorio sobre la actividad de esta enzima.

El efecto de los adenin nucleósidos tri y difosfato sobre la actividad de nucleotidasa, se muestra en la figura 11. Se puede observar que el ADP libre no inhibe la actividad de nucleotidasa (figura 11A). Por el contrario, el ADP produce una estimulación de 1.4 veces sobre la actividad de nucleotidasa. Sin embargo, este fenómeno puede deberse a un aumento del complejo Mg-ADP que ocurre al incrementarse la concentración de ADP libre, y que provoca un aumento de la actividad. Así pues, el ADP libre, más que estimular la actividad por interacción física con la enzima, incrementa la concentración del sustrato Mg-ADP. Por otro lado, no se observó un efecto inhibitorio provocado por el ADP libre.

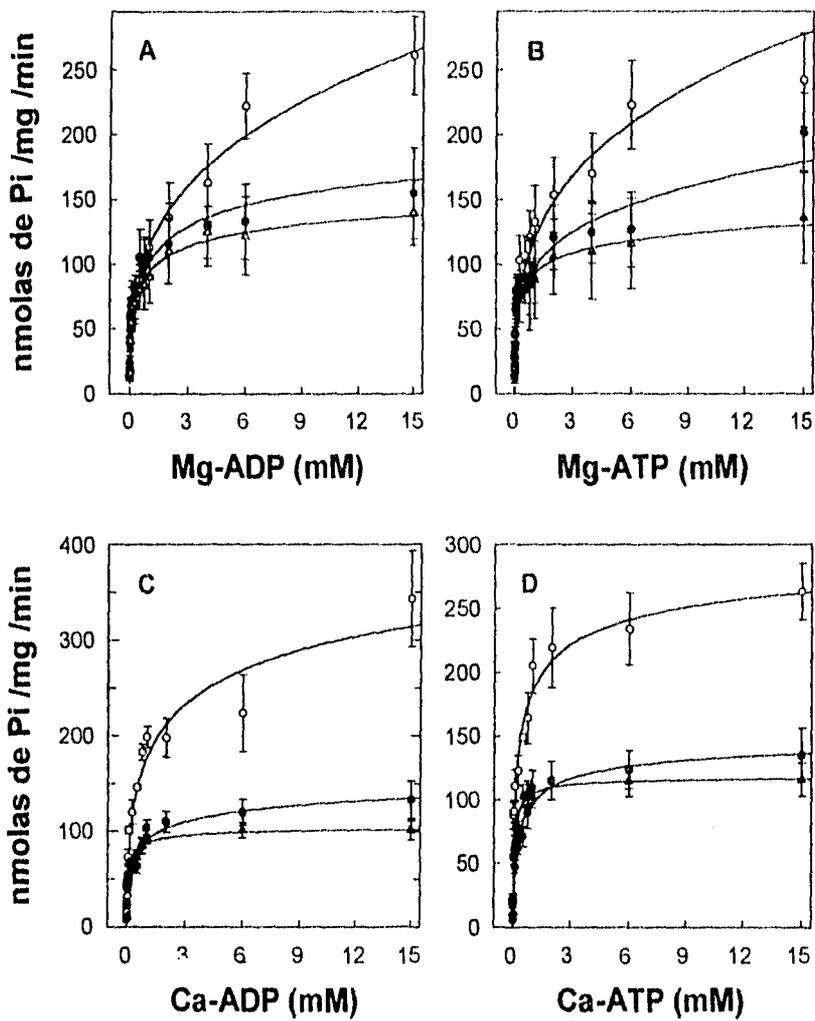


Figura 10. Cinética de la actividad de hidrólisis de la nucleotidasa en presencia de diversas concentraciones de catión libre y cuatro distintos sustratos. (○) = 1, (●) = 10 y (▲) = 20 mM del catión libre.

Tabla 4. Efecto de concentraciones milimolares de magnesio y calcio, sobre el comportamiento cinético de la nucleotidasa de MPH, en presencia de ADP o ATP.

Cation	mM	ADP				ATP			
		K ^a	V _{max} ^b	n	[S] _{0.5}	K ^a	V _{max} ^b	n	[S] _{0.5}
Mg ²⁺	1*	1.55*	261*	0.51*	2.37*	1.14*	260*	0.50*	1.28*
	10	0.28	130	0.61	0.13	0.44	130	0.40	0.13
	20	0.25	120	0.61	0.11	0.24	120	0.57	0.08
Ca ²⁺	1*	1.12*	350*	0.43*	1.31*	1.18*	360*	0.50*	1.39*
	10	0.47	130	0.50	0.22	0.38	135	0.64	0.22
	20	0.25	100	0.57	0.09	0.16	115	0.70	0.07

a = mM

b = nmolas de Pi /mg /min

n = número de Hill.

[S]_{0.5} = K^{1/n}

* = datos tomados de la tabla 2 para fines comparativos.

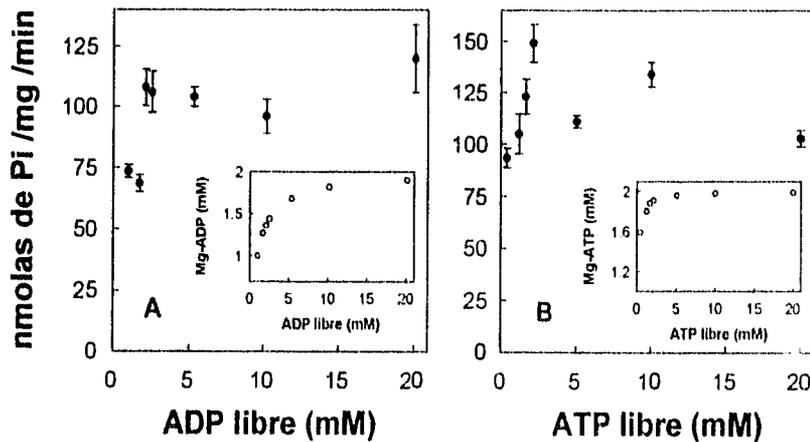


Figura 11. Efecto de la presencia de nucleótido libre sobre la actividad de hidrólisis de la nucleotidasa. El recuadro muestra la aparición del complejo Mg-nucleótido con respecto a la adición de nucleótido libre.

De manera similar, el incremento de ATP libre (figura 11 B) estimula la actividad de nucleotidasa, y esta se asocia con un aumento del sustrato Mg-ATP (recuadro de la figura 11B). Sin embargo, después de alcanzar la máxima concentración posible de Mg-ATP (2 mM de ATP libre), se observa que el ATP libre provoca una inhibición de aproximadamente el 30 % de la actividad. Esto sugiere que la nucleotidasa se inhibe por el ATP libre pero no por el ADP libre. Sin embargo, hasta el momento se desconoce si el ATP libre inhibe a través de su interacción directa con el sitio catalítico o con algún otro lugar de la proteína.

Por último, para estudiar el efecto que tienen los cationes divalentes (Mg^{2+} y Ca^{2+}) sobre la actividad de nucleotidasa, se determinó la hidrólisis del complejo La-PPi. Este diseño experimental se basa en dos fenómenos importantes: i) la nucleotidasa es capaz de hidrolizar al complejo La-PPi y ii) la afinidad del PPi por el La^{3+} es mayor que por los cationes divalentes empleados:

Complejo	$-\log K (25^{\circ}C)^*$
La-PPi	16.72
Mg-PPi	5.45
Ca-PPi	5.40

* = log de la cte. de disociación a 25°C

Esto último asegura que no se tendrán mezclas de sustratos (La-PPi, Mg-PPi o Ca-PPi, por ejemplo) y que el efecto observado será exclusivamente debido al Ca^{2+} o Mg^{2+} que se halle presente en forma libre. Es importante mencionar que este protocolo experimental no se puede aplicar para los nucleótidos, ya que las constantes de disociación para los diferentes cationes divalentes son muy similares, por lo que se producen mezclas de los diferentes sustratos, Mg-ATP y Ca-ATP, en el mismo medio.

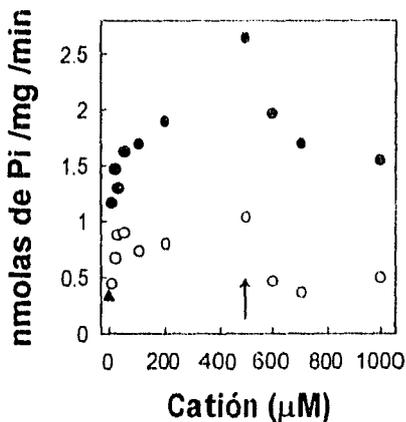


Figura 12. Efecto de los cationes libres sobre la actividad de nucleotidasa en presencia de La-PPi como sustrato. (▲) control, (●) calcio, (○) magnesio.

Así pues, en la figura 12 se muestra el efecto del calcio o magnesio libres sobre la hidrólisis del La-PPi. Como se puede notar, aunque la actividad específica para el La-PPi es baja, ésta aumenta conforme se añade calcio al medio. Esto provoca un incremento de cerca de 5 veces con respecto a la actividad control. En contraste, el magnesio provoca un aumento de la actividad de solo 2 veces con respecto al control. Cuando la concentración del catión libre en el medio sobrepasa los 500 μM , se observa una disminución en la actividad de la

enzima. Esto se debe a que la solubilidad del complejo La-PPi disminuye bruscamente, provocando que salga de solución, de tal forma que la enzima no tiene sustrato disponible. De cualquier forma, estos resultados sugieren que la nucleotidasa es sensible a la estimulación por concentraciones micromolares de cationes divalentes y, en especial, por calcio. Esto permite sugerir que la enzima posee, por lo menos, un sitio de fijación para calcio o magnesio y que la unión de estos cationes pudieran promover, por una parte, un incremento en la actividad catalítica, y por otra, una mejor fijación del sustrato. Aunado a esto, el calcio, en comparación con el magnesio, puede estabilizar mejor al estado de transición de la hidrólisis del sustrato o aumentar la liberación de los productos de la enzima. Aunque estas sean hipótesis por comprobar, se tiene la evidencia de que los cationes divalentes, en especial el calcio, desempeñan un papel regulador de la actividad de la enzima.

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en este trabajo, han mostrado que la 5'-nucleotidasa asociada a la membrana interna mitocondrial de la placenta humana a término cataliza la hidrólisis de los nucleósidos tri- y difosfato y del PPi, es catalizada por una.

La actividad de esta nucleotidasa depende del pH y presenta un máximo para Mg-ATP y Mg-ADP a pH 8.0, valor que coincide con lo reportado para la nucleotidasa membranar de *Vibrio parahemolyticus* (12, 13) y *Vibrio costicola* (14), pero dista del valor obtenido para otros tejidos de mamíferos (22-26). La actividad de la nucleotidasa de MPH muestra un descenso a pH 10.0. Esta disminución de la actividad no se debe a una disociación del complejo Mg-nucleótido, ya que a partir de pH 7.0 se alcanza la máxima concentración de sustrato posible, misma que se mantiene hasta pH 10.0 (40). De tal forma, este descenso en la actividad se puede deber a un efecto directo sobre la proteína, por ejemplo, la desprotonación de un grupo importante para la fijación del sustrato. La disminución en la actividad de hidrólisis del Mg-ATP a pH 9-10, sugiere que se afecta un grupo importante para la fijación del fosfato gamma.

Aunado a esto, la hidrólisis de Mg-ATP, Mg-ADP y Mg-PPi, es sensible a vanadato de sodio en el intervalo milimolar. La inhibición de la hidrólisis de estos sustratos es similar, lo que sugiere que el efecto del vanadato es sobre la misma enzima. Esta inhibición puede explicarse por el hecho de que las nucleotidasas presentan un intermediario fosforilado durante la hidrólisis del sustrato (41-43). En este sentido, el vanadato, que es un análogo del estado de transición del fosfato, puede estar ocupando el sitio de fosforilación de la enzima, lo que provoca su inhibición. Sin embargo, es necesario realizar nuevos experimentos para comprobar la existencia de este intermediario fosforilado en la nucleotidasa de las mitocondrias de placenta humana.

Un argumento que se desprende de los estudios cinéticos y que apoya la existencia de una sola enzima que hidroliza tanto al ADP como al ATP es el valor de la relación que hay entre la V_{max} del complejo nucleósido trifosfato-cation y la V_{max} del complejo nucleósido difosfato-cation, la cual es de 1.0. Esto indica que el efecto de la base nitrogenada o el cation sobre la actividad enzimática, es en la misma proporción; lo que sugiere que se trata de una sola enzima la responsable de hidrolizar los distintos sustratos estudiados.

Por otra parte, la presencia de oligomicina y azida de sodio no modificaron la actividad de hidrólisis de Mg-ATP y Mg-ADP, lo que sugiere que la ATP-sintetasa no participa en la liberación de fosfato. Asimismo, la actividad de la fosfatasa alcalina es despreciable en las condiciones experimentales empleadas en este trabajo. Así pues, aunque la nucleotidasa no esta pura, los resultados sugieren que otras enzimas no participan en la liberación de fosfato.

En cuanto al comportamiento cinético de la enzima, se observa que en presencia de cualquiera de los sustratos utilizados se obtiene una cooperatividad negativa según el modelo de Hill. Dicho modelo se basa en la existencia de 2 o más sitios activos en la enzima y que la unión de cada molécula de sustrato a la enzima, decrece la afinidad intrínseca de los sitios vacíos restantes. Así pues, la K calculada no representa el valor de la concentración de sustrato a la cual se tiene la mitad de la V_{max} , ya que se desconocen el número de sitios activos en la enzima, la constante de disociación intrínseca así como el valor de los distintos factores de interacción. Por esta razones se calculó la $[S]_{0.5}$, cuyo valor para los nucleósidos tri- y difosfato varia entre 1 y 10 mM, mientras que para el Mg-PPi es de 180 mM. Esto sugiere dos hechos: i) que el enlace susceptible a la actividad de la nucleotidasa es el fosfato anhidro (Pi-Pi) y ii) que la base nitrogenada sirve para mejorar la fijación del sustrato y favorecer la ruptura del enlace Pi-Pi. Estas hipótesis son apoyadas por el hecho de que la

nucleotidasa no es capaz de hidrolizar al Mg-AMP, el cual no contiene un enlace Pi-Pi. Aunado a esto, la alta inespecificidad que muestra la nucleotidasa de MPH es compartida por otras nucleotidasas de otras fuentes (tabla 5).

Por otra parte, el hecho de que el Mg^{2+} , el Ca^{2+} o el Mn^{2+} favorezcan de igual forma el pegado del complejo nucleótido-catión al sitio activo, pero produzcan un efecto distinto sobre la V_{max} , sugiere que su participación en la actividad de la nucleotidasa es posterior a la fijación del sustrato, por ejemplo, en la estabilización del estado de transición o en la liberación de los productos. En este sentido, el Ca^{2+} es el catión que más favorece la catálisis enzimática.

Lo anterior puede ser el reflejo de la naturaleza del catión que se emplea para formar el complejo que sirve como sustrato. De los 3 cationes empleados, el Ca^{2+} es el que presenta el mayor radio iónico (0.95 Å) y un número de coordinación de 8, lo que indica que es capaz de formar un mayor número de interacciones con átomos vecinos, en comparación con el Mg^{2+} y Mn^{2+} (radio iónico de 0.65 Å y 0.80 Å respectivamente, y un número de coordinación de 6 para ambos) (44, 45). En este sentido, un número de coordinación de 8 permite una variación muy grande en el arreglo geométrico alrededor del catión; como una consecuencia inmediata, se incrementa la posibilidad de formar arreglos geométricos irregulares en presencia de Ca^{2+} , lo que lo hace un ligando más versátil que los otros dos cationes, permitiéndole adaptarse a ligandos irregulares como las moléculas orgánicas o las proteínas (46). Así pues, el Ca^{2+} parece un excelente candidato para interactuar más estrechamente con la proteína y los nucleótidos y permitir así, una mejor estabilización del estado de transición o liberación de los productos de la catálisis.

Por otra parte, el Mg^{2+} y Ca^{2+} , en el intervalo milimolar, tienen un efecto mixto sobre el comportamiento cinético de la enzima. Provocan que la V_{max} disminuya en un 50 %,

mientras que el valor de la $[S]_{0.5}$ disminuye alrededor de 80-95 %. Lo anterior sugiere que en estas condiciones experimentales, el equilibrio se desplaza hacia la conformación que favorece la fijación del sustrato; asimismo, se dificulta que la enzima lleve a cabo la catálisis, debido probablemente, a que no se permite que adquiera la conformación adecuada para esta actividad. Sin embargo, es necesario realizar nuevos experimentos para definir el efecto de la presencia de estos cationes en el intervalo milimolar sobre la actividad enzimática.

La actividad de hidrólisis del La-PPi por la nucleotidasa, se estimula por Ca^{2+} o Mg^{2+} en el intervalo micromolar. Esto sugiere la existencia de uno o varios sitios para la fijación de cationes distinto al presente en el sitio activo. Este(os) sitio(s) parecen ser más afines al Ca^{2+} , lo que puede ser, nuevamente, reflejo de su naturaleza atómica. Aunque se tienen que realizar nuevos experimentos para determinar el sitio específico de acción de los cationes, se puede considerar que el Mg^{2+} y el Ca^{2+} , además de formar parte del sustrato, tienen un papel regulador de la actividad de la enzima. Asociada a esta modificación de la actividad de nucleotidasa por medio de cationes, el modelo de Hill para una cooperatividad negativa, predice un segundo nivel de regulación cinética: con una combinación apropiada de los diferentes factores de interacción entre los sitios activos, la enzima podría incrementar su actividad de una manera muy importante con la variación de la concentración de sustrato cuando éste se encuentre en bajas concentraciones, pero exhibiría una marcada inhibición de su actividad a altas concentraciones del mismo (47). Esto podría favorecer la respuesta de la enzima en un intervalo de concentración de sustrato muy estrecho. Como consecuencia de esto, en condiciones fisiológicas (concentración de ATP \approx 10 mM), la nucleotidasa no alcanza su V_{max} , lo que reduciría el consumo de ATP por esta enzima. Sin embargo, se tienen que realizar nuevos estudios para determinar los mecanismos que tiene la placenta para regular la actividad de la nucleotidasa de MPH y el papel que desempeña esta enzima en el metabolismo esteroideogénico.

Por último, se sabe que el ATP libre, en el intervalo milimolar, inhibe la actividad de la nucleotidasa de MPH; no obstante, hay que hacer nuevos estudios con ATP marcado radiactivamente, que permitan calcular la K_i para el ATP y otros nucleósidos trifosfato.

Cuando se comparan las propiedades de la nucleotidasa de mitocondrias de placenta humana con las reportadas para enzimas similares de otras fuentes, se observa que muestran una diferencia significativa tanto en la afinidad y actividad como en el tipo de sustrato que utilizan (tabla 5). En este sentido, el espectro de compuestos que son hidrolizados por las 5'-nucleotidasas comprende a los 5'-nucleótidos de púrina y pirimidina, ya sean mono-, di- o trifosfato, así como a los respectivos desoxinucleótidos, y en algunos casos, hasta complejos tales como la UDP-glucosa o el FAD⁺ (30). Este hecho sugiere que las nucleotidasas pueden participar en una gran variedad de fenómenos metabólicos (29). Aunado a esto, el comportamiento cinético de la nucleotidasa de MPH contrasta con lo reportado para otras enzimas similares. Sin embargo, cabe hacer notar que en presencia de moduladores alostéricos tales como el difosfoglicerato (DPG) el comportamiento cinético de otras nucleotidasas se ajusta al modelo de Michaelis-Menten (41, 42, 23). Lo anterior indica que las nucleotidasas descritas presentan interacciones entre las distintas subunidades que las constituyen. No obstante, es necesario determinar si la nucleotidasa de MPH está formada por varias subunidades y si las interacciones entre ellas es lo que produce la cooperatividad negativa y estudiar si también es modulada por moléculas como el DPG.

Asimismo, la mayoría de las nucleotidasas dependen de algún catión para llevar a cabo su actividad. De los diferentes cationes que se han estudiado, el Mg^{2+} es el más importante para la actividad de las nucleotidasas, pero puede ser sustituido por Ca^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} o Cu^{2+} en diferente proporción (tabla 5).

El panorama se complica aún más cuando se involucra la localización celular de las nucleotidasas, la cual puede ser citoplásmica o unida a la membrana, ya sea plasmática o mitocondrial. Zimmerman (29) propone una clasificación para estas enzimas de acuerdo a su localización y al principal sustrato que hidrolizan; así pues, se tienen a las ecto-enzimas (e-N), que se asocian a la membrana plasmática a través de un puente de glucoinositol, y a dos formas solubles, las cuales pueden hidrolizar IMP (c-N-I) o AMP (c-N-II). Sin embargo, esta clasificación no involucra a las nucleotidasas que en los últimos años se han encontrado asociadas a la membrana interna mitocondrial de hígado de rata (24-26) y de placenta humana. Así pues, la relación que existe entre las distintas 5'-nucleotidasa se resolverá cuando se obtengan y se comparen las estructuras primarias de las enzimas de mamíferos (22-27), bacterias (12-15), plantas (19-21), peces (17, 18) y protozoarios (16).

Tabla 5. Propiedades de siete diferentes 5'-nucleotidasas de mamíferos y bacterias.

Fuente	PM aparente (kDa)		Km	Vmax	pH óptimo	Comport. cinético	Localización celular	Metal requiendo	Cita
	Nativa	Subunidad							
Placenta Humana	270	73	IMP = 7.0 mM	87.5 ^a	7.4	Michaelis Menten	Membrana plasmática	--	22
Placenta Humana	90	44-45	GMP, IMP, UMP = 8-17 mM dAMP, dGMP, dIMP = 2-7 mM 2'-dUMP, 3'-dIMP = 0.3 mM	13-37 ^a 14-294 ^b 81-127 ^a	6-6.5	Michaelis Menten	Citoplasma	Mg ²⁺ , Mn ²⁺ , Co ²⁺ , Cu ²⁺ , Ca ²⁺	23
Placenta Humana	--	56	AT(D)P, GT(D)P = 1-10 mM ^c PPi = 180 mM ^c	170-380 ^b 200 ^b	8.0	Hill, coop. Neg. n=0.5	Memb. inter. mitocondrial	Mg ²⁺ , Ca ²⁺ , Mn ²⁺ , La ³⁺	
Hígado de rata	--	--	AMP = 0.085 mM IMP = 0.48 mM	36 ^c 45 ^b	7.5	Michaelis Menten	Memb. inter. mitocondrial	Mg ²⁺	24 25
Hígado de rata	--	--	AMP = 0.094 mM	31 ^b	7.0	Michaelis Menten	Memb. inter. mitocondrial	Mg ²⁺	28
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	--	72	ATP = nd ^d ADP = nd ^d IMP, GMP, CMP, UMP = nd ^d	3.39 ^a 3.46 ^a 1.3-3.3 ^a	8.0	--	Membrana plasm. cara externa	Mg ²⁺ , Mn ²⁺ , Co ²⁺ , Cl ⁻ , Br ⁻ , I ⁻ , NO ₃ ⁻	12 13
<i>Vibrio costicola</i>	--	70	ATP, UTP, GTP = nd ^d ADP, GDP, UDP = nd ^d AMP, GMP, UMP, TMP = nd ^d	1.2-2.4 ^a 0.7-2.7 ^a 0.5-2.2 ^a	8.0	--	Membrana plasm. cara externa	Mg ²⁺ , Mn ²⁺ , Co ²⁺ , Ca ²⁺	14

a = μ moles / mg / min
b = nmoles / mg / min
c = corresponde a la [S]_{0.5}
d = no determinado.

APÉNDICE

A continuación se describe el método experimental para solubilizar a la nucleotidasa de mitocondrias de placenta humana por medio de detergentes.

Pruebas de estabilidad. Para determinar la estabilidad de la nucleotidasa, se incubaron a las PSM obtenidas en presencia de 0.5 M de KCl, en un medio que contenía glicerol al 20 %, Tris-HCl 30 mM pH 8.0 y fosfolípidos al 0.5 %. A esta preparación se le agregaron concentraciones de 0.01 a 0.09 % del detergente desoxicolato (DOC) o 0.01 a 0.5 % de Zwittergent 3-14. La concentración de proteína en el ensayo fue de 5 mg/ml y la temperatura de 4 o 30°C. Se realizaron cursos temporales y se determinó la actividad de nucleotidasa como se describe en la sección de Metodología.

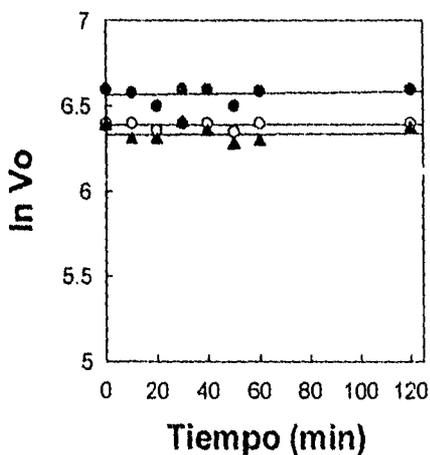


Figura 1. Curvas de estabilidad de la actividad de nucleotidasa en presencia de (●) zwittergent 3-14, (▲) DOC, (○) control.

En la figura 1 de este apéndice se muestra el efecto de la mayor concentración de los diversos detergentes sobre la actividad de nucleotidasa de mitocondrias de placenta humana. Se observa que la actividad es estable con respecto al tiempo en presencia de cualquiera de los detergentes utilizados. Esto indica que dichos detergentes no inactivan a la nucleotidasa.

Además, se empleó el lubrol (concentración máxima del 0.1 %), la digitonina (concentración máxima de 0.15 %) y el Tween 20 (concentración máxima de

1.0 %), los cuales disminuyeron de manera importante la actividad de nucleotidasa sin solubilizarla (datos no mostrados). Debido a esto, dichos detergentes no se siguieron utilizando en la purificación de esta enzima.

Pruebas de solubilidad. Las PSM se incubaron en las condiciones descritas en el apartado anterior y en presencia del DOC o Zwittergent 3-14; posteriormente se centrifugaron a 170,000 x g durante 1 hora a 4°C, y se obtuvo una fase soluble y un precipitado. En la tabla 6 se muestra el porcentaje de proteína y de actividad de nucleotidasa presente en el sobrenadante. Como se observa, el Zwittergent 3-14 (0.5 % = 14 mM) fue el que solubilizó, con alto rendimiento y estabilidad, a la actividad de nucleotidasa.

Tabla 6. Efecto de dos diferentes detergentes sobre la estabilidad y solubilidad de la nucleotidasa de PSM de placenta humana.

Detergente	Estabilidad a 4°C durante 1-1.5 hr.	Proteína en el sobrenadante	Actividad de nucleot. en sobrenad.
Desoxicolato (DOC)	100 %	30-35 %	45-50 %
Zwittergent 3-14	100 %	80-90 %	90-98 %

Con esta preparación se utilizaron técnicas específicas para la purificación de proteínas solubles, que se describen a continuación.

Cromatografía de intercambio iónico (DEAE-Sephacell). La columna se equilibró con 30 mM de imidazol, pH 7.0, glicerol al 20 % y 2 mM de Zwittergent 3-14. Se aplicaron 3 mg/ml de la preparación solubilizada con Zwittergent 3-14 a la columna y se lavó con

30 ml del mismo amortiguador y posteriormente, se aplicó un gradiente continuo de KCl (50-400 mM) con un flujo de 14 ml/hr. La actividad de nucleotidasa se eluyó a alta fuerza iónica (figura 2). Sin embargo, la nucleotidasa no se separó del resto de las proteínas mitocondriales presentes en la columna. Esto puede deberse a que el detergente, aun siendo zwitteriónico, puede opacar las cargas de las diferentes proteínas, lo que ocasiona que todas eluyen en el mismo intervalo del gradiente de KCl.

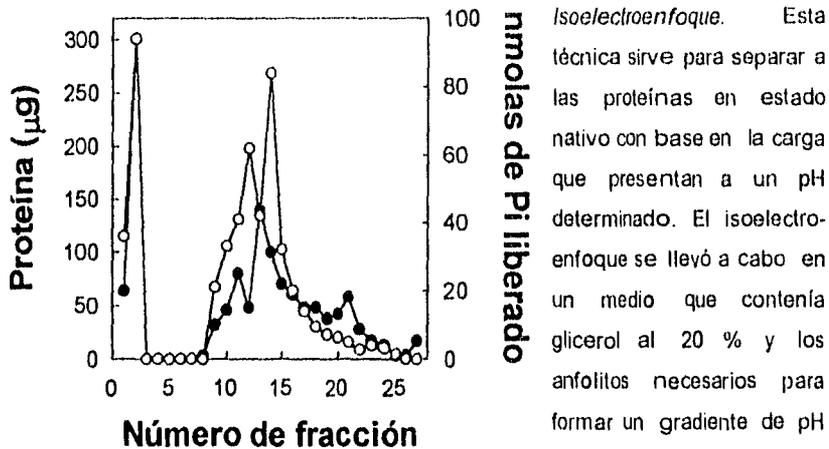


Figura 2. Perfil de purificación obtenido de la cromatografía de intercambio iónico empleando la resina DEAE-Sephacell. (●) = proteína, (○) = actividad total.

lo largo del gradiente de pH y se obtuvo en el intervalo ácido (pH6.4) una muestra con la máxima actividad total de nucleotidasa (figura 3A). La electroforésis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes, muestran el enriquecimiento en una de las bandas proteicas, que probablemente se trate de la nucleotidasa (figura 3B). Sin embargo, el patrón de fraccionamiento de la preparación no fue reproducible, debido probablemente a la composición heterogénea de las micelas formadas por las proteínas el detergente y los fosfolípidos.

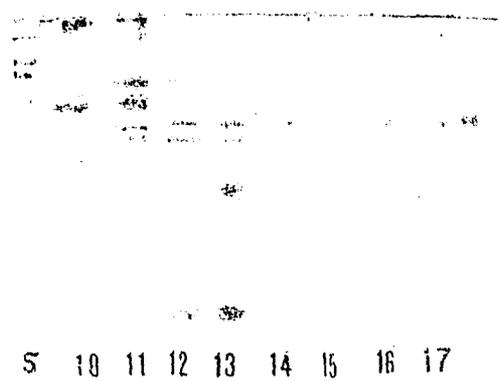
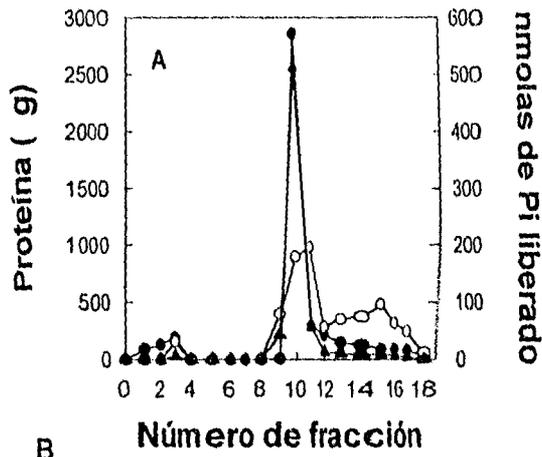


Figura 3. (A) Isoelectroenfoco de PSM solubilizadas con el detergente zwittergent 3-14. (●) = proteína, (○) = actividad específica, (▲) = actividad total. La mayor actividad de nucleotidasa se localiza en la fracción 10 a un pH = 6.4. (B) Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes.

Cromatografía hidrofóbica (fenil-sepharosa). La separación de la nucleotidasa en esta columna se basa en las interacciones de las zonas hidrofóbicas de la proteína y de la resina. En este caso, las interacciones se debilitan conforme disminuye la fuerza iónica del amortiguador de elución. Para este fin, se preparó un amortiguador que contenía concentraciones crecientes de EGTA. Los resultados mostraron que la proteína se asoció fuertemente a la resina y los tratamientos que se utilizaron para despegarla inactivaron a la enzima.

Gradientes de glicerol. Se realizaron diversos gradientes de glicerol en los cuales se varió el porcentaje de Zwittergent 3-14 presente.

- a) Gradiente de glicerol de 20 al 50 %, Tris-HCl 30 mM pH 8.0, con 2.5 mM (0.09 %) o 5.0 mM (0.18 %) de Zwittergent 3-14.
- b) Gradiente de glicerol de 15 al 40 %, Tris-HCl 30 mM pH 8.0, con 2.5 mM (0.09 %) o 5.0 mM (0.18%) de Zwittergent 3-14.
- c) Gradiente de glicerol de 15 al 35 %, Tris-HCl 30 mM pH 8.0, con 2.5 mM (0.09 %) o 5.0 mM (0.18%) de Zwittergent 3-14

La concentración de proteína solubilizada con Zwittergent 3-14 fue de 5 mg/ml y se centrifugó a 100,000 x g a 4°C durante 15 horas. Se colectaron fracciones de 1.5 ml y se midió la actividad y la concentración de proteína. En los distintos experimentos (figura 4) el patrón de hidrólisis de Mg-ATP o Mg-ADP se asoció al de proteína, lo que indica que no se separó la nucleotidasa del resto de las proteínas. Nuevamente, parece que la heterogeneidad de las miscelas fue un factor importante en el patrón de distribución de la actividad de nucleotidasa a lo largo de todo el gradiente de glicerol.

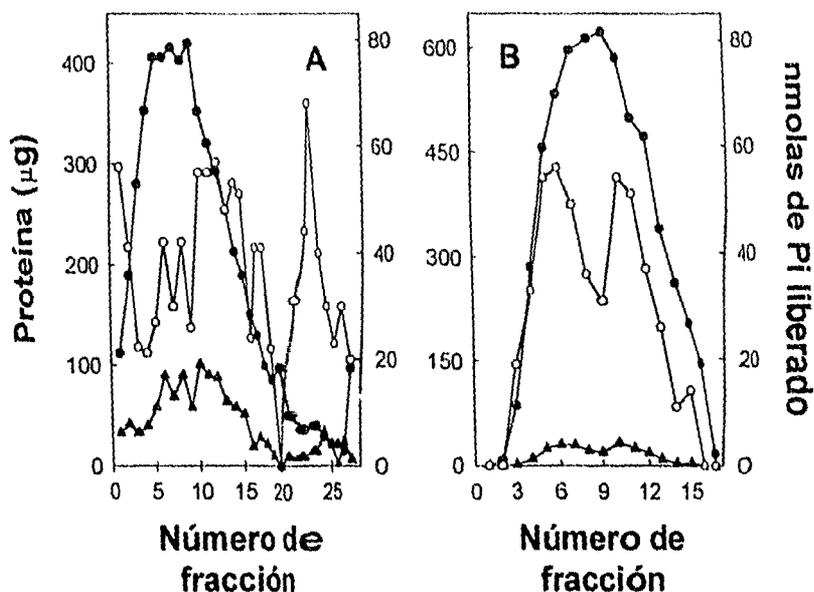


Figura 4. Patrón de purificación obtenido a partir de gradientes de glicerol. A, gradiente de glicerol del 20 al 50 %, la concentración de zwittergent 3-14 fue de 5.0 mM a lo largo de todo el gradiente. B, gradiente de glicerol del 15 al 40 %, la concentración del detergente fue de 2.5 mM a lo largo de todo el gradiente. (●) = proteína, (▲) = actividad total, (○) = actividad específica.

Uso del colesterol en las membranas mitocondriales. La incorporación de colesterol, así como el efecto que tiene en las membranas biológicas es ampliamente conocido. En alta concentración y a temperatura de alrededor de los 4°C, provoca que la membrana se vuelva rígida. Esta cualidad se trató de aprovechar en el fraccionamiento de la membrana mitocondrial. De tal forma, se incubó la fracción proteica enriquecida con la actividad de nucleotidasa, descrita en la sección de Metodología, en presencia de colesterol y fosfolípidos como se ha descrito en (48). Esta preparación se sonicó a 22 micrones en 2 periodos de 1 minuto cada uno, en un sonicador Soniprep 150 marca

MSE. La temperatura durante la sonicación se controló por medio de un baño de hielo y no sobrepasó los 30°C. Esta preparación se aplicó a una columna de Sephacryl S400 HR (equilibrada con glicerol al 5 % y 30 mM de Tris-HCl, pH 8.0). El patrón de actividad y proteína fue similar al obtenido en los experimentos descritos en la sección de Resultados. Esto indica que el colesterol no mejora el fraccionamiento de las membranas mitocondriales obtenido por la técnica descrita en la sección de Metodología.

Efecto del detergente Zwittergent 3-14 sobre la preparación proteica enriquecida con la actividad de nucleotidasa y de colesterol. Se usó el Zwittergent 3-14 durante la sonicación de la preparación enriquecida con la actividad de nucleotidasa y colesterol, con el fin de mejorar la disgregación de la membrana mitocondrial y favorecer la separación de la nucleotidasa. La muestra se aplicó a una columna de Sephacryl S400 HR en las condiciones descritas en la sección de Metodología. El patrón de distribución de la actividad de nucleotidasa fue semejante al de la proteína, lo que sugiere que el detergente es el que provoca que la distribución de las proteínas en las micelas sea heterogénea. De tal forma, este método no puede ser empleado para la purificación de la nucleotidasa.

Por otra parte, se realizaron experimentos con el detergente lauryl maltósido (concentración máxima del 1 %), en presencia de 100 mM de NaCl. Aunque este detergente no modifica la actividad de nucleotidasa, ésta no se separa del resto de las proteínas (datos no mostrados). Por tanto, no se puede emplear este tensoactivo durante la purificación de la nucleotidasa de mitocondrias de placenta humana.

Como se puede apreciar en esta sección, la dificultad de separar a la actividad de nucleotidasa del resto de las proteínas de la membrana de las mitocondrias de placenta humana, puede deberse a la heterogeneidad de las micelas formadas durante la interacción de los detergentes con la membrana mitocondrial.

Por tal motivo, se tienen que probar nuevos enfoques para la purificación de la nucleotidasa, tales como el uso de anticuerpos específicos anclados en una columna. Aunado a esto, se tienen reportes de que otras nucleotidasas están asociadas a diferentes membranas biológicas a través de un puente de glucoinositol, el cual se rompe con la fosfolipasa C (22). En este sentido, se someterá a la fracción enriquecida con la actividad de nucleotidasa a la acción de esta enzima y se determinará el efecto que tiene sobre la liberación de la actividad de nucleotidasa al sobrenadante.

BIBLIOGRAFÍA

1. Simpson, E.R. y McDonald, P.C. (1981), *Ann. Rev. Physiol.* **43**:163-168.
2. Wiener, M. y Friedlander, R.L. (1977), *Am. J. Obstet. Gynecol.* **111**:942-946.
3. Sugawara, T. (1995), *Biochemistry.* **92**:4778-4782.
4. Stauss, J.F.III, Martínez, F. y Kiriakidou, M. (1996), *Biol. Rep.* **54**:303-311.
5. Swierczynski, J., Klimek, J. y Zelewski, L. (1986), *J. steroid. Biochem.* **24**:591-595.
6. Fishman, W.H. y Ghosh, N.K. (1967), *Adv. Clin. Chem.* **10**:256-262.
7. Lienhard, G.E. (1973), *J. Biol. Chem.* **248**: 1121-1123.
8. Martínez, F., Moncada, R., Bárcenas, F.J. y Espinosa-García, T. (1992), *Placenta*, **13**:463-473.
9. Martínez, F., Espinosa-García, M.T., Flores-Herrera, O. y Pardo, J.P. (1993), *Placenta*. **14**:321-331.
10. Martínez, F., Meaney, A., Espinosa-García, M.T., Pardo, J.P. y Flores-Herrera, O. enviado a *Placenta*.
11. Olivera, A.A. y Meigs, R.A. (1975), *Biochim. Biophys. Acta.* **376**:426-435.
12. Sakai, Y., Toda, K., Mitani, Y., Tsuda, M., Shinoda, S. y Tsuchiya, T. (1987), *J. General Microbiol.* **133**:2751-2757.
13. Itami, H., Sakai, Y., Shimamoto, T., Hama, H., Tsuda, M. y Tsuchiya, T. (1989), *J. Biochem.* **105**:785-789.
14. Bengis-Garber, C. y Kushner, D.J. (1981), *J. Bacteriol.* **146**:24-32.
15. Burns, D.M. y Beacham, I.R. (1986), *Nucleic Acids Res.* **14**:4325-4342.
16. Cotner, J.B.Jr. y Wetzel, R.G. (1991), *Appl. Env. Microbiol.* **57**:1306-1312
17. Grondal, E.J.M. y Zimmerman, H. (1987), *Biochem. J.* **245**:805-810.
18. Volkmandt, W., Vogel, M., Pevsner, J., Misumi, Y., Ikehara, Y. y Zimmerman, H. (1991), *Eur. J. Biochem.* **202**:855-861.
19. Chen, CH-M. y Kristopeit, S.M. (1981), *Plant Physiol.* **67**:494-498.
20. Sharma, C.B., Mittal, R. y Tanner, W. (1986), *Biochim. Biophys. Acta.* **884**:567-577.
21. Mittal, R., Das, J. y Sharma, C.B. (1988), *Plant Sci.* **55**:93-101.
22. Thompson, L.F., Ruedi, J.M. y Low, M.G. (1987), *Bioch. Biophys. Res. Comm.* **145**:118-125.
23. Reichard, P. y Höglund, L. (1990), *J. Biol. Chem.* **265**:6589-6595.
24. Dubiel, W., Henke, W., Miura, Y., Holzhütter, H-G. y Gerber, G. (1987), *Bioch. Int.* **15**:45-54.
25. Henke, W., Lang, M., Dubiel, W., Holzhütter, H-G. y Gerber, G. (1989), *Bioch. Int.* **18**:833-844.
26. Raatikainen, M.J.P., Peuhkurinen, K.J., Kiviluoma, K.T., Hiltunen, J.K. y Hassinen, I.E. (1992), *Bioch. Biophys. Acta.* **1099**:238-246.

27. Misumi, Y., Ogata, S., Ohkubo, K., Hirose, S. e Ikehara, Y. (1990), *Eur. J. Biochem.* **191**:563-569.
28. Misumi, Y., Ogata, S., Hirose, S. e Ikehara, Y. (1990), *J. Biol. Chem.* **265**:21178-2183.
29. Zimmermann, H. (1992), *Bioch. J.* **285**:345-365.
30. Worku, Y., Luzio, J.P. y Newby, A.C. (1984), *FEBS Lett.* **167**:235-240.
31. Fini, C., Minelli, A., Camica, M. y Floridi, A. (1985), *Biochim. Biophys. Acta.* **827**:403-409.
32. Martínez, F., Pardo, J.P., Flores-Herrera, O. y Espinosa-García, M.T. (1995), *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **27**:795-803.
33. Flores-Herrera, O., Pardo, J.P., Espinosa-García, M.T. y Martínez, F. (1995), *Bioch. Mol. Biol. Int.* **35**:793-801.
34. Bensadoun, A. y Weinslein, D. (1976), *Anal. Biochem.* **70**:241-250.
35. Knowles, A.F. y Penefsky, H.S. (1972), *J. Biol. Chem.* **247**:6617-6623.
36. Sumner, J.B. (1954), *Science.* **100**:413-414.
37. Laemmli, U.K. (1970), *Nature.* **227**:680-685.
38. Lanzetta, A. (1979), *Anal. Biochem.* **100**:95-97.
39. Leatherbarrow, R.J. (1987) Enzfitter, version 1.05 (CGA), Elsevier-Biosoft.
40. Schoenmarker, T.J.M. (1992), Chelator, Elsevier-Biosoft.
41. Worku, Y. y Newby, A.C. (1982), *Biochem. J.* **205**:503-510.
42. Tozzi, M.G., Camici, M., Pesi, R., Allegrini, S., Sgarrella, F. e Ipata, L.P. (1991), *Arch. Bioch. Biophys.* **291**:212-217.
43. Baiocchi, C., Pesi, R., Turriani, M., Tozzi, M.G., Camici, M. e Ipata, L.P. (1993), *Int. J. Biochem.* **25**:1625-1629.
44. Lange, N.A. (1956), Lange's handbook of chemistry. McGraww-Hill, EUA, pp 122-123.
45. Huheey, J.E., Keiter, E.A. y Keiter, R.L. (1993), Inorganic chemistry, 4a edición, HarperCollins, EUA, pp. 472-536.
46. Carafoli, E. y Crompton, M. (1978), en: Current Topics in Membranes and Transport, **10**:151-201.
47. Segel, I.H. (1975), Enzyme kinetics. Behavior and analysis of rapid equilibrium and steady-state enzyme systems. Cap. 7, Wiley & Sons, EUA.
48. Echegoyen, S., Oliva, M.E., Sepúlveda, J., Díaz-Zagaya, J.C., Espinosa-García, M.T., Pardo, J.P. y Martínez, F. (1993). *Biochem. J.* **289**:703-708.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Federico Martínez Montes, por su apoyo, amistad, dirección y discusión durante todo el trabajo experimental y de redacción de esta tesis.

A los miembros del jurado: Dr. Juan Pablo Pardo Vázquez, Dra. Victoria Chagoya de Sánchez, Dr. Diego González Halphen, Dr. Fernando López Casillas y Dr. Federico Martínez Montes, por la revisión crítica del trabajo escrito de tesis, lo que me permitió elaborar la versión final del mismo.

Al Dr. Juan Pablo Pardo Vázquez, por sus comentarios y discusión en el desarrollo del trabajo experimental.

Al futuro Dr. Juan Luis Rendón Gómez, por su ayuda teórica en la purificación de la nucleotidasa y al Dr. Alejandro Sosa Peinado, por su asistencia técnica en la purificación de la nucleotidasa.

A los camaradas de negocio: Federico, J.Pablo, J.Luis, Aída, Isabel, Roberto, Memo, Juanita y Ma. Teresa, por todo lo que uno sigue aprendiendo de la gente.

Al Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la U.N.A.M., por las facilidades prestadas, y a la D.G.A.P.A por el apoyo que otorga a los estudiantes del posgrado de la U.N.A.M.

Este trabajo de tesis fue parcialmente apoyado por los donativos de la D.G.A.P.A. (IN 203092, IN 200192) y del P.L.A.C.I.R.H. (PLI-167/94).

A todo el cuerpo administrativo del Instituto de Fisiología Celular de la U.N.A.M., que de alguna forma u otra, me ayudaron a recorrer el sinuoso camino de los trámites de inscripción y obtención de la beca de Maestría. Espero seguir contando con ellos en el Doctorado...

Quiero extender este agradecimiento a la Familia Flores Herrera y a mi Recién formada Familia, que siempre han estado junto a mí. Gracias a todos ellos.