



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

ESCUELA NACIONAL DE
ESTUDIOS PROFESIONALES

"IZTACALA"

Caracterización de la actividad de
glucosa-6-fosfatasa durante la dife-
renciación del epitelio germinal en
testículo de rata.

T E S I S
Que para obtener el Título de
B I O L O G O
p r e s e n t a

MARIO ALBERTO DIAZ PONCE



LOS REYES IZTACALA EDO. DE MEX. 1993



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 saber no se obtiene por azar. Hay que buscarlo con afán y alimentarlo con diligencia. Cada tarea por insignificante que parezca, debe realizarse lo mejor posible. Nadie aprende más que quien empieza desde abajo.

Lo más importante en este mundo no es dónde estamos parados sino en qué dirección nos movemos.

Lo que suponemos metas son etapas.

A mis padres:

Francisco Díaz López

María del Carmen Ponce Rodríguez

Por la confianza que depositaron en
mí para la realización de esta meta

A mis hermanos:

Angel, Alfredo, Alejandro y Francisco

A mi cuñada:

Cristina

A mis sobrinos:

Francisco Javier, Miguel y Mary Carmen

A mis amigos:

RODOLFO, TELESFORO, MALENA, AGUSTIN, MARTHA,
CARLOS, CARMEN O., JOEL, JOSE, LEONOR,
HUMBERTO, TERESA, FRANCIS, ALEJANDRO,
SERGIO, ALFREDO, JAVIER, GUADALUPE,
FERNANDO, CHAYO, MERCEDES, ROSITA,
CARMEN F., PATY.

Con especial agradecimiento al Dr. **Luis Benitez Bibriesca** jefe de la UNIDAD DE INVESTIGACION CLINICA EN ENFERMEDADES ONCOLOGICAS del Centro Médico Nacional Siglo XXI, por haber permitido la realización del presente trabajo en dicha unidad.

El presente estudio se realizó bajo la dirección de la
M. en C. Raquel Trejo Albarrán.

I N D I C E

I.-INTRODUCCION.....	4
1) Diferenciación del epitelio germinal en la rata inmadura.....	5
2) Diferenciación de los Espermatoцитos Primario.....	6
a) Espermatoцитo en Leptoteno.....	7
b) Espermatoцитo en Zigoteno.....	7
c) Espermatoцитo en Paquiteno.....	7
d) Espermatoцитo en Diploteno.....	8
e) Espermatoцитo en Diacinesis.....	8
3) Diferenciación de las espermátides o Espermiogénesis	
a) Fase Golgi.....	10
b) Fase Capuchón.....	10
c) Fase Acrosomal.....	11
d) Fase Maduración.....	11
4) Modificación del Retículo Endoplásmico durante la Espermiogénesis.....	12
5) Relación entre células de Sertoli y células germinales.....	20

6) Metabolismo de carbohidratos del testículo.....	21
7) Glucosa-6-Fosfatasa.....	29
a) Reacciones de glucosa-6-fosfatasa.....	30
8) Regulación del ciclo Glucosa \longleftrightarrow Glucosa-6-fosfato.	36
II.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	38
III.-OBJETIVOS.....	40
IV.-METODOLOGIA.....	41
1) Soluciones Empleadas.....	42
2) Obtención de fracciones subcelulares.....	44
3) Obtención de poblaciones celulares enriquecidas en estadio de diferenciación específico.....	48
4) Obtención de espermatozoides.....	50
5) Determinación de Fosfatasa Acida (F.A.).....	51
6) Determinación de Glucosa-6-Fosfohidrolasa.....	51
V.- RESULTADOS.....	55
1) Distribución de la actividad de Glucosa-6-fosfatasa	56
2) Inhibición de Fosfatasa Acida y pH.....	58
3) Curva de sustrato.....	68
4) Efecto de temperatura.....	71
5) Efecto de Vanadato (Na_2VO_5).....	74

6) Efecto de Calcio y Magnesio.....	76
7) Actividad de Glucosa-6-Fosfatasa durante la diferenciación del epitelio germinal.....	78
VI.- DISCUSION.....	81
1) Distribución de la actividad de Glucosa-6-Fosfohidrolasa.....	82
2) Inhibición de Fosfatasa Acida.....	85
3) pH óptimo de glucosa-6-fosfatasa testicular.....	86
4) Km y Vmax de glucosa-6-fosfatasa.....	87
5) Termoestabilidad de glucosa-6-fosfohidrolasa....	90
6) Efecto de Vanadato.....	91
7) Efecto de calcio y magnesio.....	92
8) Actividad de Glucosa-6-fosfatasa y evolución de retículo endoplásmico.....	93
VII.-CONCLUSIONES.....	95
VIII.- BIBLIOGRAFIA.....	96

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

El testículo es un órgano del aparato reproductor masculino que se destaca por funcionar como una glándula mixta, con funciones exócrinas y endócrinas. Está constituido por numerosos túbulos seminíferos y por tejido intertubular, cubiertos por la túnica albúginea. En los mamíferos el testículo se encuentra situado en el saco escrotal, lo que hace que su temperatura sea de 3 a 5 °C inferior a la intrabdominal (Kormano, 1967).

Su función endócrina reside fundamentalmente en el tejido intertubular, ya que en este lugar se encuentran la células de Leydig que producen andrógenos (Hooker, 1970).

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

DIFERENCIACION DEL EPITELIO GERMINAL EN LA RATA INMADURA.

La aparición cronológica de los distintos tipos celulares en el testículo de rata es bien conocida (Clermont & Perey 1957). Al nacimiento, los túbulos seminíferos se presentan como cordones sexuales consti-

tuídos por dos tipos celulares: las células somáticas o de soporte que darán lugar a las células de Sertoli colocadas en la periferia del cordón y por los gonocitos, que darán origen a las espermatogonias localizadas en la región central. Las espermatogonias tipo A aparecen al cuarto día de edad, las intermedias y tipo B aparecen a partir del sexto día (Clermont y Perey, 1957).

Las espermatogonias tipo B duplican su contenido de DNA y quedan comprometidas para iniciar la meiosis, diferenciándose así en los espermatocitos primarios preleptoténico o espermatocitos en reposo.

DIFERENCIACION DE LOS ESPERMATOCITOS PRIMARIOS.

En la rata la primera división meiótica se caracteriza por la lentitud con que transcurren los eventos de la primera profase, a lo largo de 11 días se pueden distinguir los 5 diferentes estadios característicos de esta etapa y que se describen a continuación:

Espermatocitos en leptoteno .- Aparecen a los 12 días de edad y se caracterizan por poseer cromosomas bivalentes unidos en ambos extremos a la membrana nuclear, cada cromosoma se ha replicado, pero las dos cromátides hermanas no se separan completamente sino que permanecen unidas en la región del centrómero.

Espermatocitos en zigoteno.- Aparecen a los 15 días de edad y en este estadio los cromosomas homólogos se reconocen y conservando la unión a la primera membrana nuclear, colocados en paralelo, yuxtapuestos y quedan unidos en toda su longitud por las proteínas que constituyen el complejo sinaptonémico .

Espermatocitos en paquiteno.- Aparecen entre los 15-18 días de edad, se caracterizan por el entrecruzamiento de cromosomas homólogos. En el punto de entrecruzamiento se realiza el intercambio de fragmentos de DNA entre cromátides no hermanas.

La transición zigoteno/paquiteno, así como el estadio paquiteno mismo, son particularmente importantes porque en estas etapas se manifiestan la actividad de algunas isoenzimas específicas de testículo como la sorbitol deshidrogenasa (Mills & Means, 1972), carnitin-acetil-transferasa (Vernon et al,1971), deshidrogenasa láctica

X (LDH-X) (Meistrich et al 1971).

La maduración de los espermatoцитos primarios en la etapa de paquiteno se realiza a lo largo de 8 días, por lo que los espermatoцитos en esta fase de diferenciación representan la población celular de la profase meiótica más abundante.

Espermatoцитos en diploteno.- El complejo sinaptonémico se disuelve de modo que los cromosomas homólogos se separan excepto en las regiones donde se entrecruzaron o quiasmas.

Espermatoцитos en diacinesis.- Durante este estadio de la primera profase meiótica, los cromosomas se condensan y acortan, separándose de la membrana nuclear; debido a que los cromosomas están unidos por quiasmas pueden distinguirse cuatro cromátides separadas, las cromátides hermanas se les reconoce por estar unidas en el centrómero y las no hermanas por estar unidas por los quiasmas (Alberts et al,1983; Clermont & Perey,1957). Los estadios diploteno y diacinesis así como las siguientes fases de la primera división meiótica tienen una duración muy corta. Después de la profase I continúan cambios nucleares que corresponden a las diferentes etapas de la primera

división meiótica:

Metafase I, Anafase I, Telofase I. Al término de esta se producen los espermatocitos secundarios que poseen un número haplóide de cromosomas pero como cada uno es bivalente, son diploides en contenido de DNA. Estos espermatocitos entran a la segunda división meiótica, que es prácticamente igual a una división mitótica normal, excepto que no se replica el DNA antes de que ésta se inicie. Después de esta segunda división meiótica aparecen las espermátides, a los 23 días de edad con número haploide de cromosomas y contenido haploide de DNA.

Las espermátides a través de un proceso de diferenciación muy complejo conocido como espermiogénesis dan origen a los espermatozoides, que hacen su aparición en el túbulo seminífero a los 45 días de edad (Leblond & Clermont 1952)

DIFERENCIACION DE LAS ESPERMATIDES O ESPERMIOGENESIS.

Mediante técnicas de tinción usando ácido peryódico y leucofucsina (tinción de PAS), Leblond & Clermont 1952) estudiaron la diferenciación de las espermátides y la dividieron en 4 etapas tomando como base la formación y la localización del acrosoma.

Fase de Golgi.- Consiste en 3 estadios que culminan con la formación del gránulo proacrosomal. En el primer estadio se observa la presencia del idiosoma moderadamente teñido y 2-4 gránulos proacrosomales en el citoplasma. Posteriormente estos gránulos se fusionan y forman el gránulo acrosomal en el centro del idiosoma.

Fase de capuchón.- Consiste de 4 estadios (4-7). En el estadio 4 el gránulo acrosómico se adosa sobre el núcleo. En el estadio 5 la membrana que cubre el gránulo acrosomal se proyecta hacia los lados formando un capuchón. En el estadio 6 ésta se extiende sobre el núcleo en forma de sombrilla y el idiosoma se separa del gránulo acrosomal. En el estadio 7 el capuchón alcanza su máximo desarrollo y ocupa 1/3 de la superficie nuclear. El idiosoma se encuentra cada vez más lejos del gránulo.

Fase acrosomal. (Estadio 8-14) La característica principal es el cambio en la orientación del capuchón y del gránulo acrosomal hacia el núcleo de las células de Sertoli, por lo tanto hacia la membrana basal y el citoplasma se orienta hacia el polo opuesto, es decir hacia la luz del túbulo. En los estadios 9-14 de la espermiogénesis en la rata, se observan cambios en la curvatura y alargamiento del núcleo pasando de una forma ovoide a una de hoz.

Fase de maduración.- En esta fase (estadio 15-19) las espermátides pueden considerarse como espermatozoides inmaduros, ya que morfológicamente son indistinguibles de un espermatozoide. La designación de espermatozoide solamente se da a las células que han sido liberadas a la luz del túbulo seminífero.

La diferenciación de las espermátides en espermatozoides también implica numerosos cambios en otros organelos intracelulares como el aparato de Golgi (Clermont & Rambourg, 1978) la organización y posición de las mitocondrias (Andre, 1972) la aparición y desarrollo del flagelo y de las fibras densas (Vera et al, 1987) y elementos del citoesqueleto alrededor del núcleo (Longo et al, 1987) y de la mocheta (Clermont & Rambourg, 1978). Uno de los cambios espectaculares durante la espermiogénesis ocurre el retículo endoplásmico.

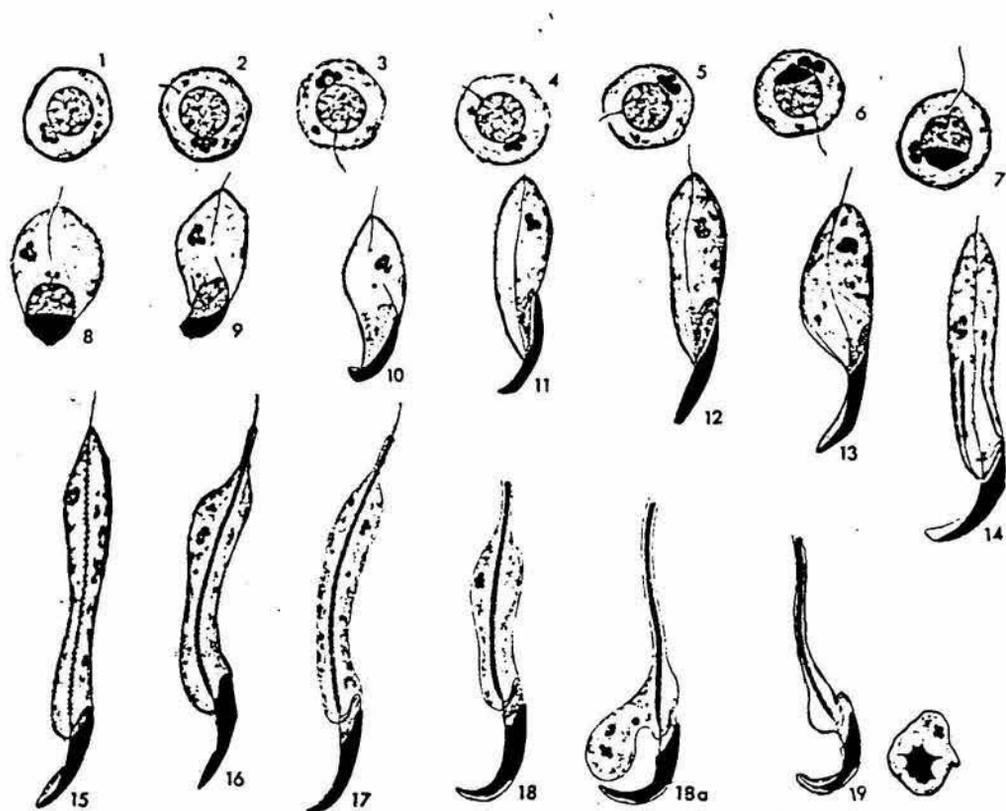
**MODIFICACION DEL RETICULO ENDOPLASMICO DURANTE
LA ESPERMIOGENESIS.**

Clermont y Rambourg, (1978), mediante técnicas de microscopía electrónica, observaron que las espermátides en los estadios 1-7 en la fase de Golgi y capuchón (figura 1), presentan al retículo endoplásmico (R.E.) distribuido por todo el citoplasma como una red tridimensional de cisternas tubulares, bordeando la superficie convexa del aparato de Golgi y de la membrana plasmática (figura 2 y 2a). Debido a que las espermátides están unidas entre sí por uniones comunicantes, el retículo endoplásmico se extiende a través del puente intercelular, de tal forma que el retículo de una espermátide se continúa con el de la siguiente.

Durante los estadios 8-10 (figura 1) de la fase acrosomal se presentan 2 modificaciones del retículo endoplásmico, la formación de lamelas anulares conectadas con la red general de cisternas y en el lóbulo citoplásmico caudal la aparición de una masa compacta de cisternas esféricas interconectadas.

En etapas de diferenciación más avanzada, estadios 11-14, también durante la fase acrosomal (figura 1),

ESPERMIOGENESIS



FASE DE GOLGI: ESTADIOS 1-3
FASE DE CAPUCHON: ESTADIOS 4-7
FASE ACROSOMAL : ESTADIOS 8-14
FASE DE MADURACION: ESTADIOS 15-19

FIGURA 1 Espermiogenesis de espermatozoide de rata

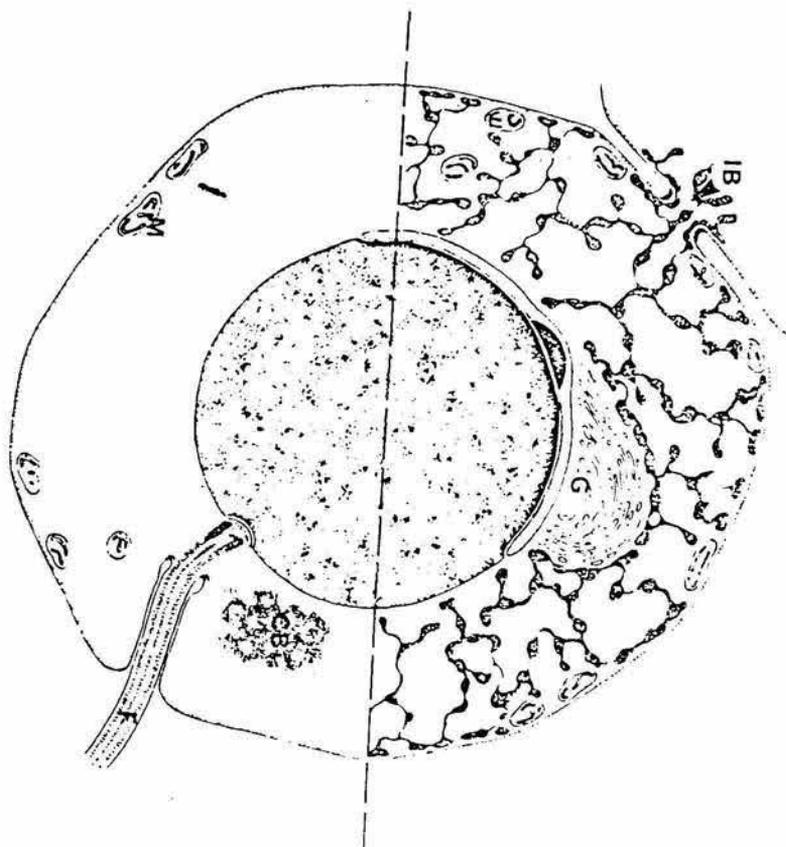


FIGURA 2 Representación esquemática de la distribución de retículo endoplásmico de una espermátide en los primeros estadios de diferenciación. (Tomado de Clermont & Rambourg, 1978)

- G- Complejo de Golgi
- M Mitochondria
- IB Enlace intracelular
- F Flagelo

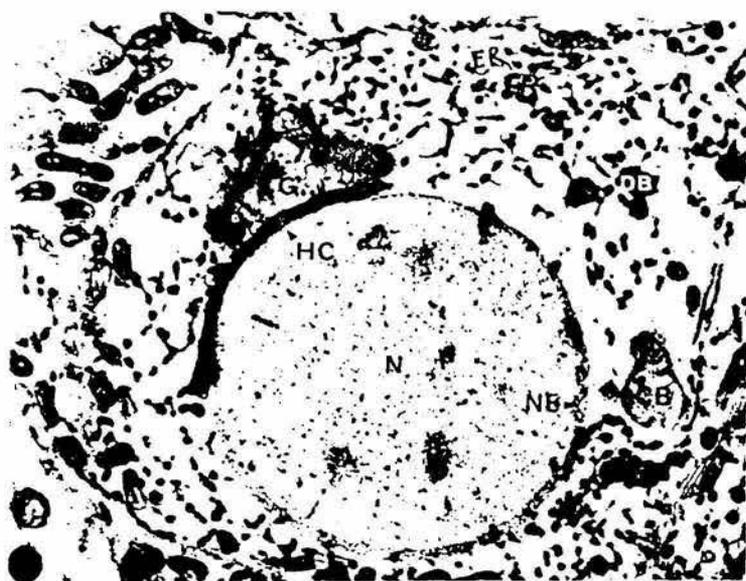


FIGURA 2a Micrografía del retículo endoplásmico de una espermatide en los primeros estadios de diferenciación, (Tomado de Clermont y Rambourg 1978)

N	Núcleo	G	Complejo de Golgi
NE	Membrana nuclear	GB	Cuerpo denso
ER	Retículo endoplásmico	CB	Cuerpo cromatoide
HC	Capuchón		

las espermátides presentan un retículo endoplásmico muy abundante, que alcanza su máximo desarrollo en el estadio 14. En este estadio el R.E. muestra especializaciones regionales a lo largo del flagelo formando cisternas en placa o tubulares que corren en paralelo a los microtúbulos. La apariencia general de este arreglo del R.E. es la de una doble cortina fenestrada rodeando al flagelo (figura 3 y 3a); interconectada por pequeños puentes laterales con el retículo endoplásmico del citoplasma.

En la fase de maduración, estadios 15 a 19 (figura 1) , se presenta una regresión masiva del retículo endoplásmico. El arreglo de doble cubierta fenestrada que rodeada al flagelo desaparece hacia el final del estadio 15 después del desplazamiento del annulus y de la disposición de las mitocondrias alrededor del flagelo. También desaparecen los microtúbulos que constituían el tubo caudal.

Durante los siguientes estadios 16-17 (figura 1) de la espermiogénesis hay una regresión masiva del retículo, presentándose una fragmentación previa en la red. Durante el estadio 17 se desintegra el aparato de Golgi y en los estadios 18-19 (figura 1) se observan solo remanentes del organelo y la aparición del cuerpo residual.

FIGURA 3 Representación esquemática del gran desarrollo que alcanza el R.E. durante la maduración del espermatozoide. (Tomado de Clermont & Rambourg 1978)

F Flagelo
G Complejo de Golgi
CT Tubulo caudal
R-AL Anullus del cuerpo radial

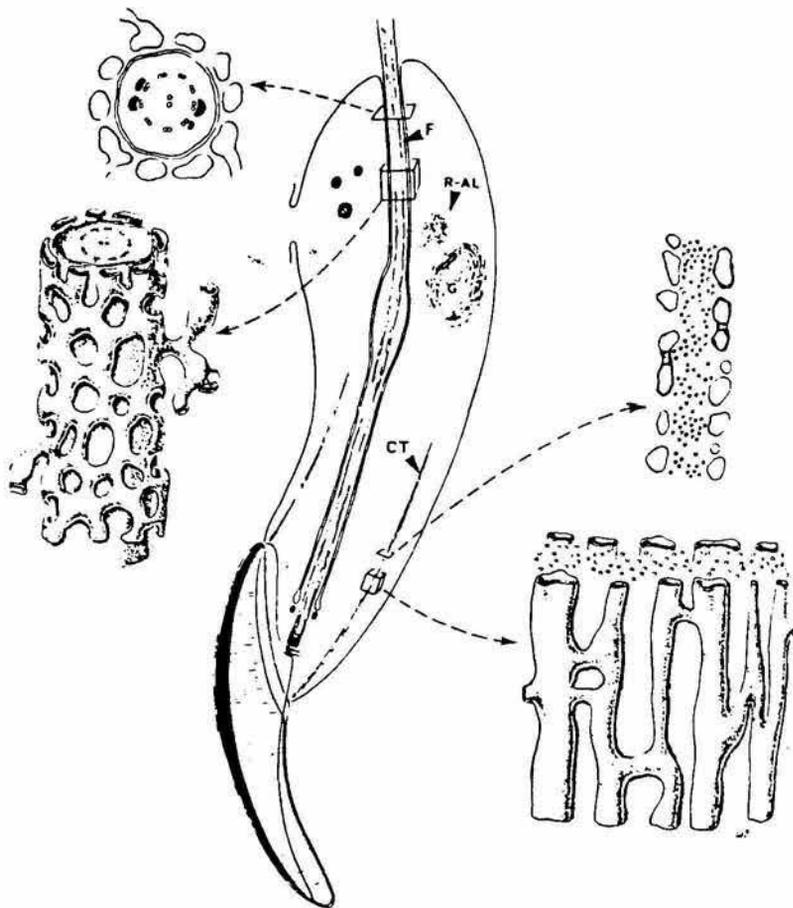
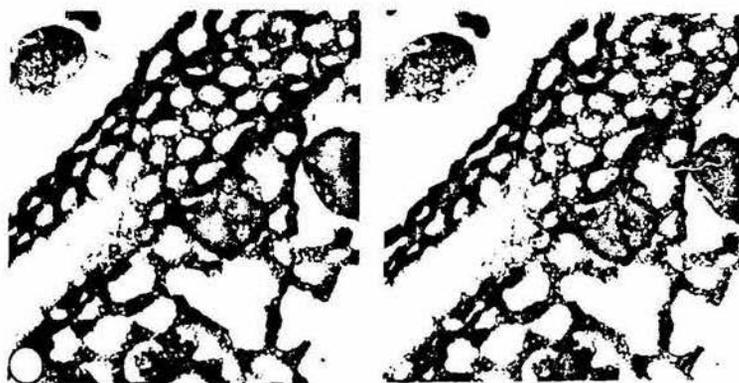


FIGURA 3a Micrografía del desarrollo del R.E. en espermatídes que están madurando a espermatozoide. (Tomado de Clermont y Rambourg 1978)



El significado funcional de las modificaciones del R.E. y de los otros organelos citoplasmáticos con los que éste se relaciona durante la espermiogénesis no se conoce. Se ha sugerido (Clermont & Rambourg, 1978) que el R.E. podría tener un papel muy importante en la regulación de la diferenciación de las espermatídes a espermatozoides.

RELACION DE LAS CELULAS DE SERTOLI Y CELULAS GERMINALES

Para que se lleven acabo los procesos de formación y maduración de las células germinales, es necesaria la participación de otros tipos celulares como, las células de Leydig quienes secretan andrógenos (Hooker,1970) y las células de Sertoli las que mantienen una estrecha relación con las células germinales durante el desarrollo testicular.

Los cambios de las células de Sertoli durante la maduración del testículo, incluyen modificación en la morfología nuclear y la cantidad de líquido citoplasmático. (Leblond & Clermont, 1952; Lacy,1960; Hilcher et al,1979); y Las variaciones fisiológicas como la máxima unión de la hormona FSH (Hormona foliculo estimulante) con sus receptores, la máxima estimulación de FSH para la producción de AMPc, la producción de proteínas constitutivas, la secreción de una cantidad de productos como el activador del plasminógeno el cual es específicamente secretado así como el número de enzimas presentadas (Bardin et al, 1988).

METABOLISMO DE CARBOHIDRATOS DEL TESTICULO.

Se ha demostrado que el testículo de rata adulta requiere de glucosa para la producción de gametos, ya que, cuando se induce una hipoglicemia aguda por administración de insulina, se produce una degeneración en las células germinales (Mancini et al, 1960). Asimismo, cuando no se permite la entrada de glucosa por la administración de 5-tio-D-glucosa, que bloquea el transporte de glucosa al interior de las células, se produce infertilidad temporal, por la desaparición de espermatídes y espermatozoides del epitelio germinal (Zysk et al, 1975).

La incubación de rebanadas de testículo de rata adulta en presencia de glucosa incrementa la síntesis de proteínas y de RNAm (Davis & Firlit 1965). A diferencia de otros tejidos la glucosa estimula 7.5 veces la síntesis de proteína testicular, mientras que en 16 diferentes tejidos solo indujo un aumento de 1.5 veces en la incorporación de aminoácidos marcados (Davis, 1969).

En contra parte se ha demostrado también que la glucosa no estimula la síntesis de proteínas ni los niveles de ATP, en testículo de rata inmaduras (Means & Hall, 1968 a,b) o en testículo con regresión del

epitelio germinal por hipofisectomía (Means & Hall, 1968 a,b) o por criptoquidea (Davis,1969; Gomes, 1971).

Basándose en estos resultados, se ha concluido que los espermatoцитos y las espermátides son las células responsables de los efectos que la glucosa produce en el testículo adulto. Sin embargo, en espermátides y espermatoцитos aislados, con acceso libre a los sustratos eliminando el posible papel regulador de las células de Sertoli, la adición de glucosa al medio produce un aumento de solo 1.5 veces en la incorporación de aminoácidos a proteínas (Nakamura & Hall 1976, 1977; Nakamura et al (1978).

Posteriormente se demostró que los espermatoцитos y espermátides aislados e incubados solo con glucosa como fuente energética disminuyen sus niveles de ATP (Mita & Hall, 1982), pero cuando se adiciona lactato simultáneamente con la glucosa, este decremento no se observa, por otro lado también se demostró que el lactato es más eficiente en estimular los niveles de ATP y la síntesis de proteínas que glucosa (Jutte et al 1981, Nakamura et al 1981,1984, 1986; Grootegoed et al 1984, 1986). Otro aspecto muy importante es que la adición de lactato no puede revertir totalmente la disminución de las niveles de ATP producido por la incubación con glucosa (Nakamura et al 1984; Grootegoed et al 1984).

La disminución del ATP en células germinales aisladas inducida por glucosa no puede ser explicada fácilmente, ya que teóricamente, por cada molécula de glucosa que se degrada hasta lactato se obtiene un rendimiento de 2 ATP y si se degrada hasta CO_2 y H_2O se obtendría 36 ATP (Lehninger, 1978) figura 4 y 5, se ha demostrado que en espermatozoides y espermatocitos la glucosa puede ser oxidada en 20 a 25 % hasta CO_2 y H_2O o hasta piruvato \leftrightarrow lactato en un 75 a 80 % (Grootegeod et al 1984; Nakamura et al 1984). El decremento en los niveles de ATP podría deberse a que la glucosa pusiera de manifiesto un desequilibrio entre las reacciones de hidrólisis de ATP por ejemplo durante la fosforilación de sustratos y las reacciones de síntesis de ATP, ya sea que la degradación de la glucosa se lleve a cabo hasta lactato o hasta CO_2 y H_2O . Este desequilibrio podría deberse a una demanda de ATP que supere la velocidad con la que se degrada la glucosa y con la que se sintetiza el ATP.

Se sabe que en el espermatozoide de epidídimo de toro, incubado en presencia de glucosa y con un flujo glucolítico lento no se obtiene un aumento de los niveles de ATP y puede adquirirse un decremento de 0.6 moles de ATP por cada mol de glucosa utilizada (Hammerstedt & Lardy 1983). Se demostró que este hecho

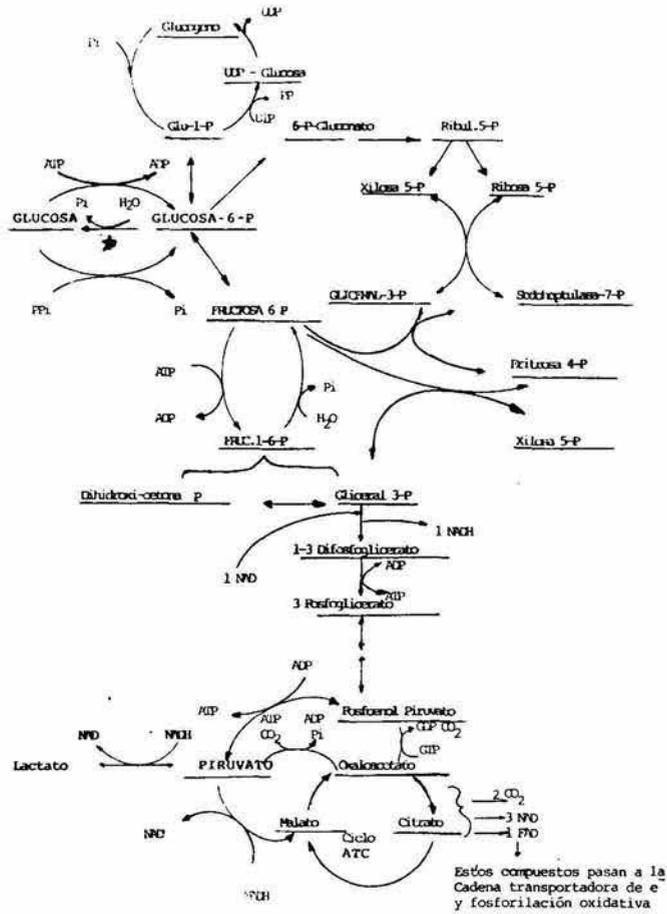


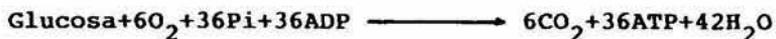
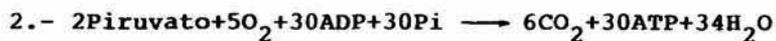
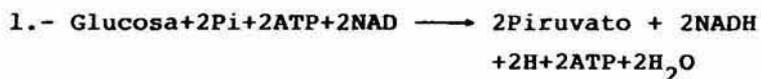
FIGURA 4 : Diagrama general del metabolismo de carbohidratos donde se muestra al final del camino de la glucogenólisis, gluconeogénesis, la actividad de glucosa-6-fosfatasa (*) (tomado de Stadman,1966).

FIGURA 5 : Balance general de la obtención de ATP en la glucolisis

a) Glucolisis.



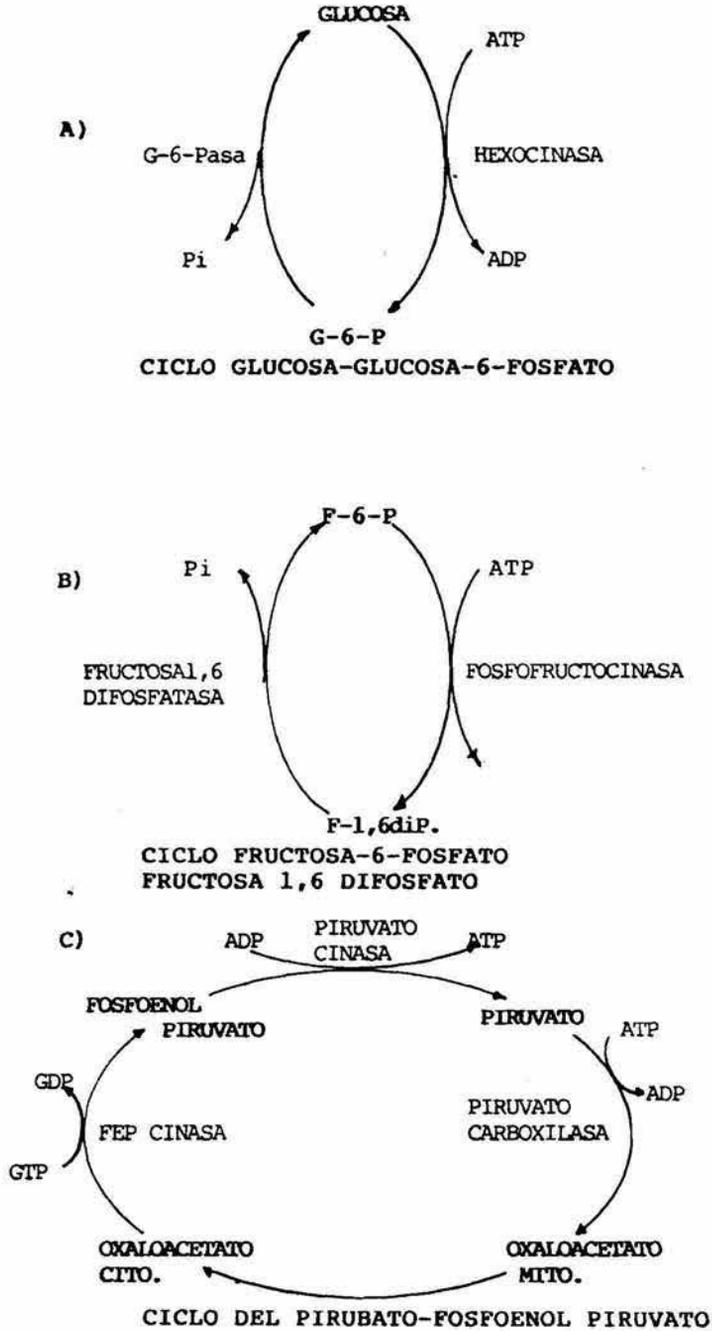
b) Glucolisis + Fosforilación Oxidativa.



se debe a la hidrólisis de los intermediarios fosforilados como glucosa-6-fosfato, fructosa 1,6 difosfato y fructosa-6-fosfato hace ineficiente la vía glucolítica. También se observó que la glucosa y fructosa ya defosforiladas se secretan al medio. Solamente en condiciones de flujo glucolítico muy acelerado, no se observa la secreción de glucosa o de fructosa al medio y se obtiene un rendimiento neto de 2 a 4 ATP por cada molécula de glucosa oxidada hasta CO_2 y H_2O (Hammersted y Lardy, 1983).

En hígado se han demostrado las dos reacciones de fosforilación de sustrato, dependientes de ATP, que ocurre durante la glucólisis pueden ser revertidas, por enzimas diferentes, que operan simultáneamente a las cinasas respectivas y que dan como resultado el reciclaje de los sustratos, un menor flujo por la vía metabólica y un desperdicio de ATP. El funcionamiento simultáneo de las enzimas que catalizan las reacciones en dirección opuesta produce 3 ciclos fútiles durante la degradación de glucosa hasta piruvato figura 6 (Hue, 1981; Katz & Rongstad, 1976; Katz & McGarry, 1984)

FIGURA 6: Representación esquemática de los 3 ciclos fútiles



Hippaka & Hammerstedt (1978) determinaron y caracterizaron parcialmente la hidrólisis de glucosa-6-fosfato en el espermatozoide eyaculado de toro.

Sin embargo no fue posible identificar la presencia de glucosa-6-fosfatasa (Hammerstedt & Lardy, 1983) con las características descritas por Nordlie (1979) para la enzima hepática y se piensa que tanto la glucosa-6-fosfato como la fructosa 1,6 difosfato podrían ser hidrolizadas por fosfatasas inespecíficas. Estos autores proponen, que el reciclaje de estos sustratos en el espermatozoide, depende de la actividad de la hexocinasa de la fosfofructocinasa y de fosfatasas ácidas inespecíficas.

Panse et al (1983) señalaron que la hidrólisis de glucosa-6-fosfato se incrementa a medida que el espermatozoide de mono madura. Recientemente en el testículo de rata, se demostró por métodos histoquímicos la presencia de una actividad hidrolítica de glucosa6-fosfatasa de espermatozoides y espermátides en maduración que no pudo ser detectada en espermatozoides (Thorne-Tjomsland etal, 1991).

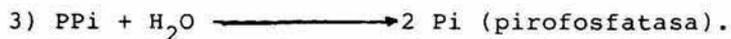
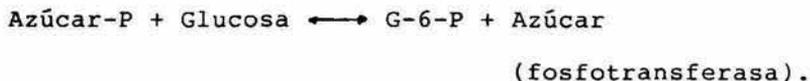
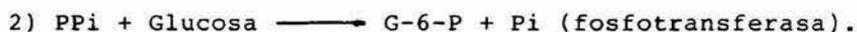
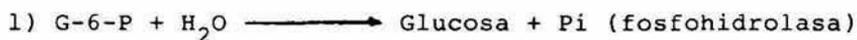
GLUCOSA-6-FOSFATASA

La glucosa-6-fosfatasa es una proteína integral del retículo endoplásmico, los estudios hechos en hígado y en otros tejidos, así lo demuestran. Amar-Costesec et al (1974), utilizando al hígado como modelo observaron que la glucosa-6-fosfatasa está principalmente localizada en vesículas originadas del retículo endoplásmico ya que recuperaron del 75 al 80 % de la actividad total de la enzima en vesículas membranales originadas del retículo endoplásmico (R.E.)

Estudios histoquímicos han demostrado que la glucosa-6-fosfatasa está presente en el retículo endoplásmico y la membrana nuclear de ciertos tipos celulares de la cauda del epididimo de ratón (Kanai, 1980) o bien en estructuras derivadas del R.E. como el sistema tubular denso de plaquetas (Daimon, 1982)

REACCIONES DE GLUCOSA-6-FOSFATASA.

Nordlie (1970), Stetten (1974, a, b, c) y Has & Byrne (1960), a través de numerosos estudios, demostraron que la G-6-Pasa es una enzima multifuncional, la cual no solo es capaz de degradar glucosa-6-fosfato (G-6-P) sino también de sintetizar a este importante intermediario metabólico. Las reacciones catalizadas por la enzima son:



Para explicar cómo estas diferentes reacciones son catalizadas por la misma enzima se propuso el siguiente mecanismo de reacción (figura 7).

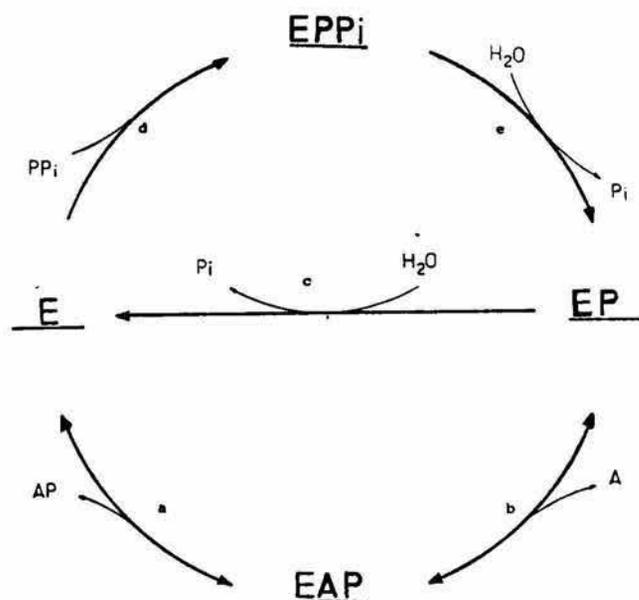


FIGURA 7 : Mecanismo de reacción de glucosa-6-fosfatasa (Tomado de Stadman, 1966):

Reacción a representa la formación del complejo binario enzima-sustrato fosforilado.

Reacción b se esquematiza la disociación del complejo quedando como intermediario la enzima fosforilada (Demostrado por Lueck et al 1972).

La enzima fosforilada puede seguir dos caminos: La vía reversible que implica la transferencia del Pi a un receptor que puede ser glucosa, reacciones b y a y/o seguir la vía irreversible que implica la hidrólisis del intermediario fosforilado con la liberación del Pi quedando la enzima libre como se muestra en la reacción c.

La actividad de pirofosfatasa puede explicarse con las reacciones d, e, c,

El PPi puede utilizarse para formar el intermediario fosforilado reacciones d y e. Este intermediario puede transferir su grupo fosfato o ser hidrolizado reacción c.

Arion y colaboradores (1975) observaron que, microsomas con membrana intacta incubados en presencia de compuestos que actúan sobre los grupos tiol (SH) como 5,5'-ditiobis-nitrobenzoato (DTNB), N-etil-maleimida (NEM), Hg , inhibían la actividad de la enzima, pero cuando la integridad de la membrana de la vesícula se perdía, la inhibición también desaparecía. Estos resultados sugieren la presencia de otras proteínas involucradas en la actividad de la enzima y que estos inhibidores no afectaban directamente a la glucosa 6 fosfatasa. El trabajo de Vakili *et al* (1981) utilizando maleimidias con diferente número de carbonos en su cadena, de 2 a 8, confirmó que estos compuestos inhiben la actividad de la enzima en microsomas intactos, por la modificación de los grupos SH expuestos de la membrana, pero en microsomas permeabilizados con detergentes, estos reactivos no inhiben a la glucosa-6-fosfatasa, apoyando las observaciones previas de Arion y colaboradores (1975).

Posteriormente se propuso que la glucosa-6-fosfatasa requiere de la actividad de tres transportadores para la expresión de sus funciones y que estos son específicos para transportar Pi, PPi, G-6-P, y Glucosa del citoplasma al lumen del microsoma donde se encuentra el sitio catalítico de la enzima. En la

figura 8 se muestra de una forma sencilla la relación entre glucosa-6-fosfatasa y los transportadores propuesta por Arion et al (1980).

Al realizar estudios de especificidad por sustrato, se demostró que la translocasa 1 (T1) solo es capaz de transportar G-6-P, azúcares como la manosa-6-fosfato no penetran la membrana del retículo endoplásmico.

El Pi es acarreado por el trasportados 2 (T2) que además transporta P_i y Carbamil-P (C-P). Por último la glucosa requiere de un transportador 3 (T3) para poder pasar la membrana (Arion et al 1976).

También se ha propuesto que la G-6-Pasa requiere de una proteína estabilizadora (P.E.) que posiblemente regule la actividad de la enzima (Waddel et al 1990) figura 8.

A pesar de la importancia de esta enzima, su purificación y caracterización se ha logrado en muy pocos tejidos ya que como se ha señalado esta enzima forma parte de un sistema complejo y se requeriría la purificación de los otros elementos para reproducir su funcionamiento en modelos in vitro.

En 1975, Anchors & Kornovsk describieron por primera vez la purificación de la glucosa-6-fosfatasa de cerebro, hígado y riñón de rata. El peso molecular de la enzima purificada fue determinado por electroforesis

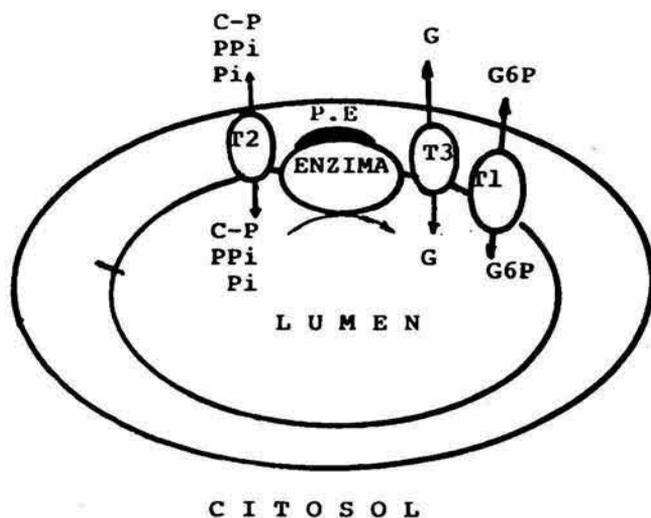


FIGURA 8: Relación entre la glucosa-6-fosfatasa y las proteínas transportadoras. (Arion et al 1980)

en geles de poliacrilamida y dodecil-sulfato-de-sodio (SDS), encontrando un peso molecular de 28,000 daltones. La glucosa-6-fosfatasa extraida mediante el uso de detergentes de microsomas obtenidos de hígado y placenta humanos, mostró un peso molecular de 58,000-64,000 daltones (Reczeck & Ville 1982) en franca discrepancia con el valor anterior. Debido a los problemas en su purificación y reconstitución muchos autores han decidido utilizar microsomas completos, porque se puede tener a la enzima y a los transportadores ensamblados en la membrana microsomal; aunque la actividad de G-6-Pasa medida en vesículas membranales intactas sea menor a la observada en vesículas membranales tratadas con detergentes. A la diferencia de actividad que existe entre estas dos condiciones se le denomina latencia, y representa la modificación de la actividad de la enzima dada por la actividad de los transportadores (Arion et al 1980).

REGULACION DEL CICLO GLUCOSA GLUCOSA-6-FOSFATO

Tradicionalmente se ha considerado que el equilibrio entre la síntesis de glucosa-6-fosfato, catalizada por la hexocinasa y su degradación, catalizada por la glucosa-6-fosfatasa depende de la relación entre la velocidad de cada reacción, determinada a su vez por la concentración del sustrato correspondiente (Hue,1981). Además existen observaciones que apoyan la participación hormonal en el control de la síntesis y degradación de la glucosa-6-fosfato.

Se ha observado que la actividad de glucosa-6-fosfatasa de hígado de ratas diabéticas es más alta que en individuos normales y que la administración de insulina provoca que la actividad de la enzima se disminuya, (Freedland *et al.*,1966; Jakobsson *et al.*,1968; Jacquot & Felix,1977; Garfield & Cardell,1979; Seni & Gandhi,1981; Speth & Schulze,1981; Zoccoli *et al.*,1982; Garland,1988).

Por otra parte, se ha observado que el glucagon es una hormona que activa a la glucosa-6-fosfatasa hepática (Band & Jones, 1980, Boxer *et al.*, 1974);

Estas observaciones fueron confirmadas en hepatocitos aislados y cultivados (Chirst *et al.*, 1986) donde la administración de insulina inhibe en 50 % el flujo

neto de la degradación del glucógeno hacia G-6-P y el glucagon estimula 7 veces la degradación de glucógeno hacia la formación de G-6-P con un incremento de G-6-Pasa independientemente de la concentración de Glucosa, La actividad de hexocinasa es incrementada en un 35 % por la insulina.

Los glucocorticoides también activan a la enzima, posiblemente interactuando con las translocasas del sistema de glucosa-6-fosfatasa (Speth & Schulze, 1981; Zoccoli *et al.*, 1982; García *et al.*, 1985).

Aunque también se ha reportado que la hidrocortisona (Glucocorticoide), inhibe 16 % la actividad de glucosa 6 fosfatasa de hígado de rata (García *et al.*, 1985).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Las causas que originan el decremento en los niveles de ATP de espermátides y espermatoцитos aislados incubados con glucosa no se ha aclarado.

En el espermatozoide de toro se ha demostrado el funcionamiento de los ciclos fútiles, particularmente cuando se presenta un flujo glucolítico lento que da como resultado la secreción al medio de glucosa y fructosa defosforiladas y un descenso en el contenido de ATP.

No se ha demostrado si en las espermátides y espermatoцитos se presentan estos ciclos fútiles, que explicarían el decremento de ATP cuando se incuban e estas células con glucosa.

El funcionamiento del ciclo glucosa \longleftrightarrow glucosa-6-fosfato puede ser posible, ya que se ha demostrado por técnicas histoquímicas la presencia de G-6-Pasa en el retículo endoplásmico de espermatoцитos y espermátides (Thorne-Tjomsland *et al* 1991) y la actividad de varias isoenzimas de la fosfatasa ácida que podrían defosforilar a la G-6-P y la fructosa-6-fosfato.

Es muy importante determinar si las células

germinales aisladas presentan una actividad de glucosa-6-fosfatasa, que específicamente hidroliza a este importante intermediario metabólico o si al igual que sucede en el espermatozoide, la actividad de fosfatasas inespecíficas catalizan la reacción hidrolítica del ciclo glucosa \longleftrightarrow glucosa-6-fosfato.

Aunque en homogeneizado total de testículo de rata adulta se encontró una actividad de glucosa-6-fosfatasa o hidrolasa hasta el momento no se ha caracterizado bioquímicamente la actividad de glucosa-6-fosfatasa testicular en sus tres formas de actuar. Existe un reporte que presenta valores de K_m y V_{max} para la reacción de fosfotransferasa y valores de actividad de glucosa-6-fosfohidrolasa, pero las actividades fueron determinadas en un homogeneizado total de testículo de rata adulta y no se utilizaron inhibidores de fosfatasa ácida para prevenir su participación en la hidrólisis de la G-6-P (Colilla *et al*, 1975).

Como un primer enfoque para definir la presencia de la glucosa-6-fosfatasa en el testículo de rata se decidió estudiar la actividad de glucosa-6-fosfohidrolasa tomando como fuente de la enzima una fracción subcelular enriquecida en esta actividad y utilizar inhibidores de fosfatasa ácida para impedir su participación en la reacción.

OBJETIVOS

I) Demostrar si la G-6-P puede ser hidrolizada en presencia de inhibidores de fosfatasa ácida.

II) Caracterizar la actividad de Glucosa-6-fosfohidrolasa insensible a inhibidores de fosfatasa ácida en células del epitelio germinal de rata. Utilizando como fuente de glucosa-6-fosfohidrolasa la fracción subcelular enriquecida en esta actividad a partir de testículo de rata de 38 días de edad, en donde el epitelio germinal está constituido en un 60% por espermátides en fase de maduración (Clermont & Perey 1957) que presenta el máximo desarrollo y organización de este organelo

III) Determinar si la actividad de glucosa-6-fosfohidrolasa varía de acuerdo con el estadio de diferenciación de las células del epitelio germinal, utilizando:

A) Poblaciones celulares enriquecidas con espermátocitos en leptoteno y paquiteno (15 días de edad).

B) Poblaciones enriquecidas en espermátides (38 días de edad).

C) poblaciones de espermatozoides extraídos del vaso deferente.

M E T O D O L O G I A

SOLUCIONES EMPLEADAS.

1.-Solución salina isotónica para recibir y lavar el tejido testicular:

NaCl₂ 154 mM

HEPES 20 mM pH 7.2

2.-Medio de homogeneización.

Sacarosa 250 mM

HEPES 20 mM pH 7.2

Conteniendo los siguientes inhibidores de proteasas

Leupeptina 0.001 mM

Antipaína 0.001 mM

Inhibidor de Tripsina 100 µg/ml

3.- Medio para lavar las fracciones y eliminar el exceso de sacarosa.

KCl 158 mM.

4.-Medio para resuspender y almacenar las fracciones subcelulares.

Tris 100 mM pH 7.4.

5.-Medio para determinar la actividad de fosfatasa ácida, se utilizaron 3 diferentes amortiguadores.

a) Acetato de sodio 50 mM pH 5.5

b) MES (2 (N-Morpholino) ethanesulfonic acid) 50 mM
pH 5.5.

c) HEPES (N-2Hidroxiethylpiperazine-N-2
ethanesulfonic acid) 50 mM pH 7.0-7.5.

Utilizando como sustrato p-Nitrofenil-Fosfato 5 mM.

6.-Medios para determinar la actividad de G6Pasa:

a) Imidazol 175 mM

Tris 12.5 mM pH 5.5 (Shulze et al 1985)

b) MES 50 mM, Imidazol 137 mM pH 6.5

c) Acetato de sodio 50 mM

Imidazol 137 mM pH 5.0-5.5

d) MES 50 mM pH 6.0-6.5

e) HEPES 50 mM, Imidazol 137 mM pH 7.0-7.5

Utilizando para estos casos glucosa-6-fosfato 25 mM
como sustrato.

OBTENCION DE LAS FRACCIONES SUBCELULARES.

El tejido testicular fue obtenido de 6-12 ratas macho de 38 días de edad, sacrificadas por dislocación cervical. Los testículos fueron disectados y se recibieron en solución salina isotónica a 4 °C después de eliminar la túnica albúginea y los vasos sanguíneos, se lavaron nuevamente y el exceso de solución salina se retiró con papel filtro antes de pesar el tejido. El tejido fue picado finamente con tijeras y se preparó un homogeneizado al 10 % p/v con sacarosa 0.25 M junto con inhibidores de proteasas descritos, empleando un homogeneizador Potter-Elvehjem de vidrio con piston de teflón flojo; posteriormente en un homogeneizador donde el pistón es más ajustado al tubo se dieron 4 golpes más. El homogeneizado total fue centrifugado a diferentes aceleraciones siguiendo la figura 9. Las pastillas fueron resuspendidas KCl 150 mM para quitar el exceso de sacarosa, y se centrifugaron a las aceleraciones correspondientes. Las pastillas se resuspendieron en 10 ml de Tris HCl 0.1 M a pH 7.4 (Shulze et al 1985), se almacenaron en alicuotas de 1 ml. La determinación de proteínas se realizó por el método de Lowry modificado por Hartree (1972). Para caracterizar las fracciones subcelulares

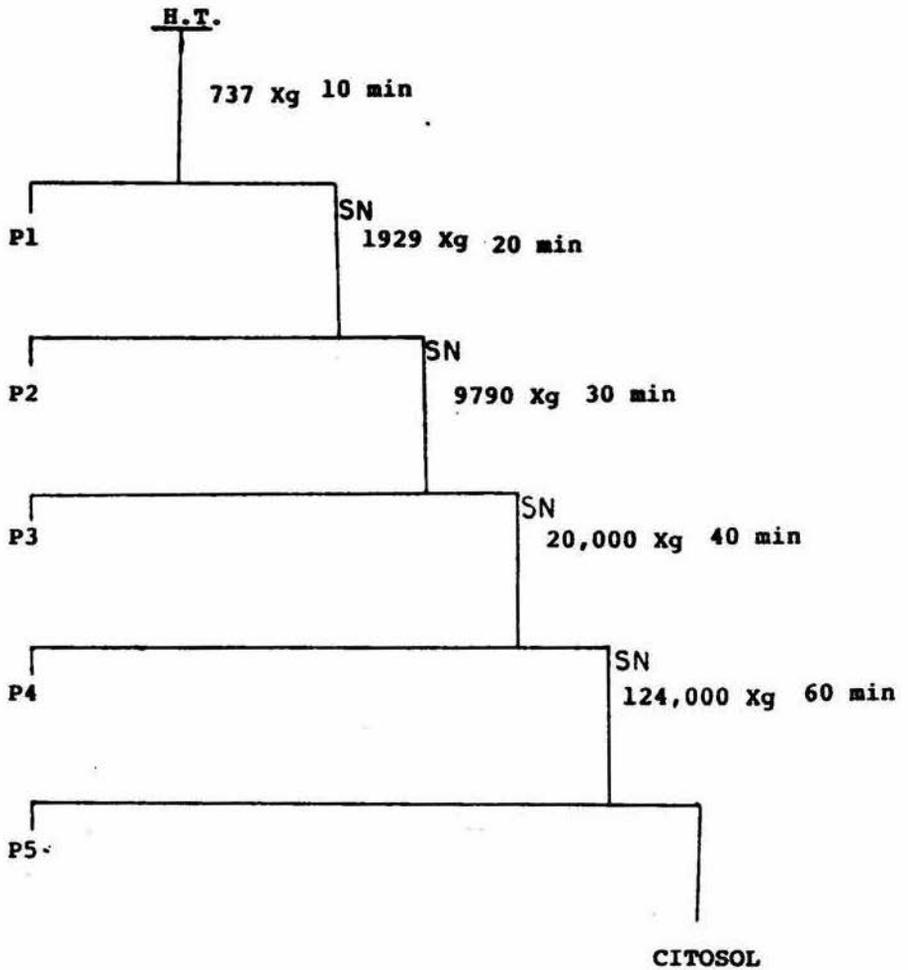


FIGURA 9: Esquema de centrifugación diferencial para la obtención de las distintas fracciones celulares. (P = pastilla obtenida)

se determinó la actividad de diversas enzimas consideradas como marcadora de los organelos (Mc Name, 1989):

Fosfatasa ácida	Marcadora de Lisosomas
Glucosa 6 Fosfatasa	Marcadora de R.E.

Otras enzimas marcadoras de organelos subcelulares de organos como hígado y riñon se han reportado:

Organelo	Enzima Marcadora
Membrana plasmática	ATPasa Na^{++} K^{++} 5' nucleotidasa
Vel. Sedimentación	(Aronson & Tawter, 1974) ATPasa
1500xg 15 min	de Ca^{++} (Fabiato & Fabiato,
145000xg 40 min	1979) Fosfatasa Alcalina (Van Belle, 1972).
Mitocondrias	Succinato deshidrogenasa
Vel. sedimentación	(Bryan, A.C. et al 1978)
10000xg 25 min	citocromo oxidasa.
	(McNamee, 1989)
Lisosomas	Fosfatasa ácida
Vel. sedimentación	b-glucoronidasa
10000xg 25 min	(McNamee, 1989)

Organelo	Enzima Marcadora
Aparto de Golgi	Glactosil transferasa
Vel. Sedimentación	NADP-phosfatasa
2000xg 20 min	(McNamee, 1989).
Retículo Endoplásmico	Glucosa-6-fosfatasa
Vel. sedimentación	NADPH-cyt reductasa
145000xg 40 min	(McNamee, 1989).
Cytosol	Lactato deshidrogenasa
	(McNamee, 1989).

**OBTENCION DE POBLACIONES CELULARES ENRIQUECIDAS EN
ESTADIOS DE DIFERENCIACION ESPECIFICOS**

- A) Obtención de espermatoцитos primarios a partir de ratas de 15 días de edad (leptoteno y paquiteno).

- B) Obtención de espermátides a partir de ratas de 38 días.

Las ratas se sacrificaron por dislocación cervical los testículos fueron recibidos en solución salina a temperatura ambiente se liberaron de la túnica albúginea y de la arteria espermática se secaron y se pesaron . El tejido fue picado finamente en presencia de 2 ml de medio mínimo esencial de Eagle (MEM). posteriormente se agregó más MEM y con una pipeta Pasteur de orificio grande, se pipeteó hasta quitar los grumos más gruesos. Esta suspensión se centrifugó a 85 Xg por 10 min. Se retiró el paquete de eritrocitos y el sobrenadante fué desechado. La pastilla se resuspendió con una solución de colagenasa-MEM equivalente a 8 mg de colagenasa/g de tejido en un volumen igual al doble del peso del tejido, se agitó

manualmente a una velocidad de 60 rpm durante 10 min. La acción de la colagenasa se detuvo por dilución, agregando MEM equivalente a 3 veces el volumen original. El tejido se resuspendió suavemente hasta hacer desaparecer los grumos y se dejó sedimentar. El sobrenadante se filtró tres veces primero a través de una malla de nylon, posteriormente por dos mallas de seda. El tejido restante se lavó con MEM varias veces y el sobrenadante se filtró a través de las mallas de nylon y seda. El filtrado se centrifugó a 178.85 Xg, 5 min y el botón se resuspendió con 3-6 MEM, agregando 1 ml de medio por 0.5 ml de botón.

Los diferentes tipos celulares presentes en esta suspensión fueron separados por centrifugación en gradientes discontinuos de densidad usando Dextran T-500-MEM al 7.0, 8.6, 11, 13.3 y 16.6 % P/P. utilizando el rotor de columpio SW 25.1. Se adicionaron 1-2 ml de la suspensión celular por cada gradiente (32 ml) y se centrifugó a 11,500 Xg por 20 minutos. Las células de cada interfase se recuperaron con una pipeta Pasteur, y se recibieron en 20 ml de MEM. Se resuspendieron y centrifugaron a 715 Xg 20 min. a 4 °C. El sobrenadante se desechó y la pastilla se resuspendió en solución salina para eliminar el MEM puesto que interfiere en la determinación de proteínas y en la determinación de la actividad enzimática.

OBTENCION DE ESPERMATOZOIDES

Ratas adultas fueron sacrificadas por dislocación cervical, extrayendo los testículos cortando por un extremo del vaso deferente el cual se había ligado previamente, los vasos deferentes fueron limpiados de tejido conectivo, grasa y vasos sanguíneos y separados del epididimo, los espermatozoides se extrajeron inyectando en la luz del vaso deferente 2 ml de solución salina isotónica (NaCl_2 0.09%). Los espermatozoides fueron lavados 2 veces y concentrados por centrifugación a 1,500 rpm por 5 min. la pastilla se resuspendió en 3 ml de solución salina.

DETERMINACION DE FOSFATASA ACIDA

La determinación de fosfatasa ácida se realizó por triplicado en presencia de acetato de sodio 50 mM pH 5.0, usando alícuotas de 150 µg de proteína, diluidas en un volumen final de 0.5 ml. La reacción se inició por adición del sustrato e incubación a 37 °C. Después de 30 min. se agregó 0.1 ml de TCA 30 % p/v. El para-nitrofenil liberado fue cuantificado por absorción a 410 nm.

La actividad fue reportada como nanomoles de para-nitrofenol/mg prot/30 min.

DETERMINACION DE GLUCOSA-6-FOSFOHIDROLASA

La actividad de la Glucosa-6-fosfatasa se determinó por triplicado utilizando como medio de incubación Tris 12.5 mM, Imidazol 175 mM pH 5.5; 150 µg de proteína y Glucosa-6-fosfato 25mM como sustrato, diluidos en un volumen final de incubación de 0.5 ml en presencia de inhibidores de fosfatasa ácida. La reacción se inició por adición del sustrato y se incubó a 37 °C 60 min deteniéndose con la adición de 1 ml de TCA/10 % p/v. Los tubos se mantuvieron 20 min a 4 °C y se centrifugaron a 1559 Xg por 20 min. El Pi se determinó por método de Bonting y colaboradores (1961) en 1 ml del sobrenadante. La actividad se expresó en micromoles Pi/mg Prot/hora.

La determinación de proteínas se realizó por triplicado siguiendo el método de Lowry modificado por Hartree (1972)

Se determinó la actividad de la G-6-Pasa en presencia de diferentes concentraciones de proteína con un rango que va de 80 μg hasta 200 μg figura 10 encontrando que la actividad es directamente proporcional a la concentración de proteína presente.

La determinación la actividad de la enzima a diferentes intervalos de tiempo se muestra en la figura 11 en donde tomando un rango de 0-60 min mostró una actividad lineal en forma ascendente llegando a una actividad de 1.4 $\mu\text{m Pi/mg}$ de proteína a los 60 min. de incubación.

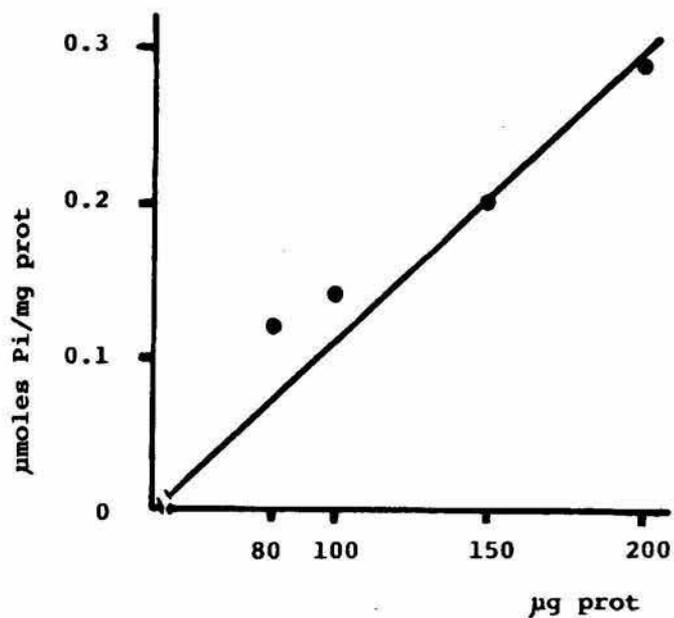


FIGURA 10 Actividad de glucosa-6-fosfatasa a diferentes concentraciones de proteína, en la fracción de 20,000 Xg de testículo de rata de 38 días de edad.

Medio: Imidazol 175mM Tris 12.5mM pH5.5
 CuCl₂ 5 mM, G-6-P 25mM

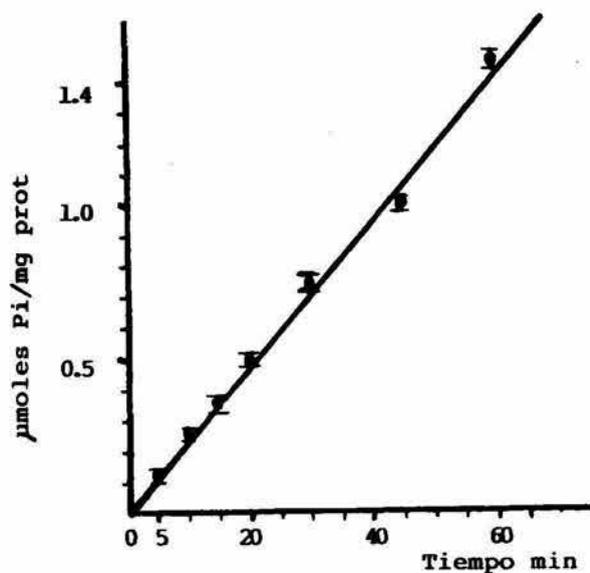


FIGURA 11 Actividad de glucosa-6-fosfatasa a diferentes intervalos de tiempo en la fracción de 20,000 Xg de testículo de rata de 38 días de edad.
 Medio: Imidazol 175 mM Tris 12.5 mM pH 5.5
 CuCl₂ 5mM G-6-P 25 mM

R E S U L T A D O S

DISTRIBUCION SUBCELULAR DE LA ACTIVIDAD DE G6PASA

Se determinó la actividad de glucosa-6-fosfohidrolasa en las fracciones obtenidas por centrifugación diferencial del homogeneizado total del testículo de rata de 38 días de edad. En la figura 12 se muestra la distribución de esta actividad enzimática en cada una de las fracciones. Como puede observarse la actividad de glucosa-6-fosfohidrolasa de ratas de 38 días de edad se encontró asociada a fracciones membranales que sedimentaron a 1929 xg, 9970 xg y 20000 xg y 124,000 xg indicando que cualquiera de estas fracciones pudieran ser adecuadas para la caracterización de glucosa-6-fosfohidrolasa. Sin embargo se decidió utilizar la fracción 9970xg y la de 20000xg ya que en la fracción de 1929xg se encontró enriquecida en actividad de deshidrogenosa succínica y catepsina B (Martinez, 1993), indicando la presencia tanto de mitocondrias como de lisosomas (Mc Namee, 1989) cuya actividad hidrolítica modificaba la determinación de la enzima en estudio.

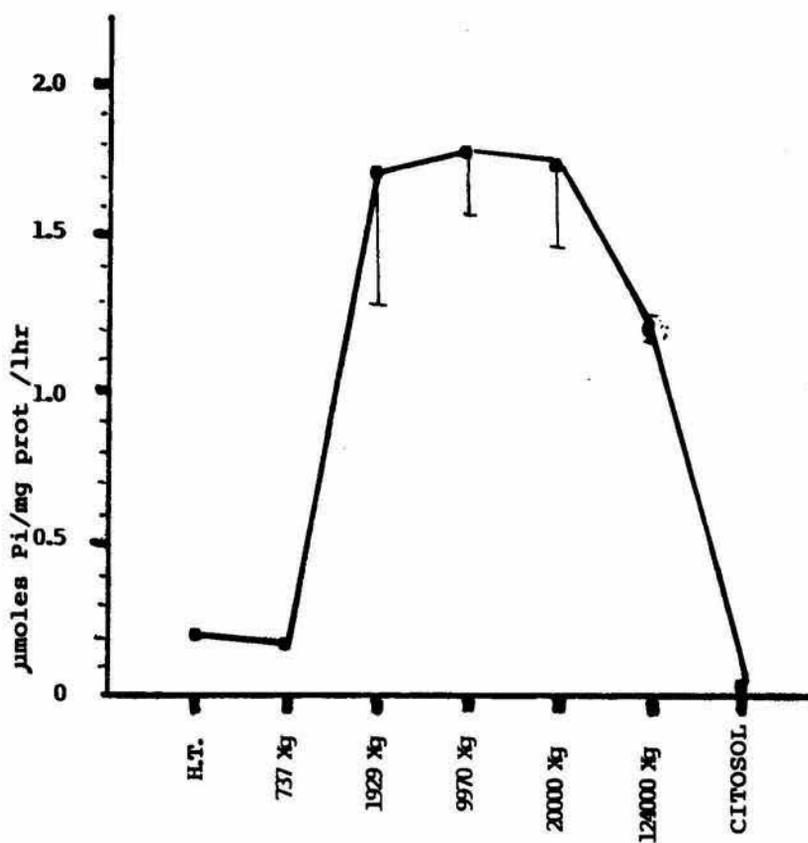


FIGURA 12 Distribución subcelular de la actividad de glucosa-6-fosfatasa de testículo de rata de 38 días de edad

INHIBICION DE LA ACTIVIDAD DE FOSFATASA ACIDA

Para descartar la posibilidad de participación de alguna de las isoenzimas de la fosfatasa ácida (F.A.) en la hidrólisis de glucosa-6-fosfato, se decidió averiguar si ésta estaba presente en las fracciones ricas en actividad de glucosa-6-fosfohidrolasa. Se seleccionó al p-nitrofenil-fosfato, a una concentración de 5 mM por ser un sustrato hidrolizable a pH 5.0 por las cuatro isoenzimas testiculares (Vanha-Perttula, 1970). La presencia de una alta actividad de F.A. en las fracciones utilizadas como fuente de glucosa-6-fosfohidrolasa fue confirmada, por lo que se decidió estudiar el efecto de CuCl_2 , Na_2WO_4 , NaF , y CdI_2 , que inhiben diferencialmente a las isoformas de la enzima descritas por (Vanha-Perttula 1970). Los resultados obtenidos se muestran en las figuras 13 y 13a. Como puede observarse el CuCl_2 fue el inhibidor más potente, la actividad de la enzima disminuyó casi el 50 % en presencia de 0.025 mM (25 μM) de CuCl_2 y a 2 mM no se observó actividad de F.A. El Na_2WO_4 también resultó ser un potente inhibidor, a 0.12 mM se alcanzó el 50 % de la actividad enzimática y a 1.5 mM se inhibió el 90 %.

El CdI_2 mostró sus efectos inhibitorios a concentra-

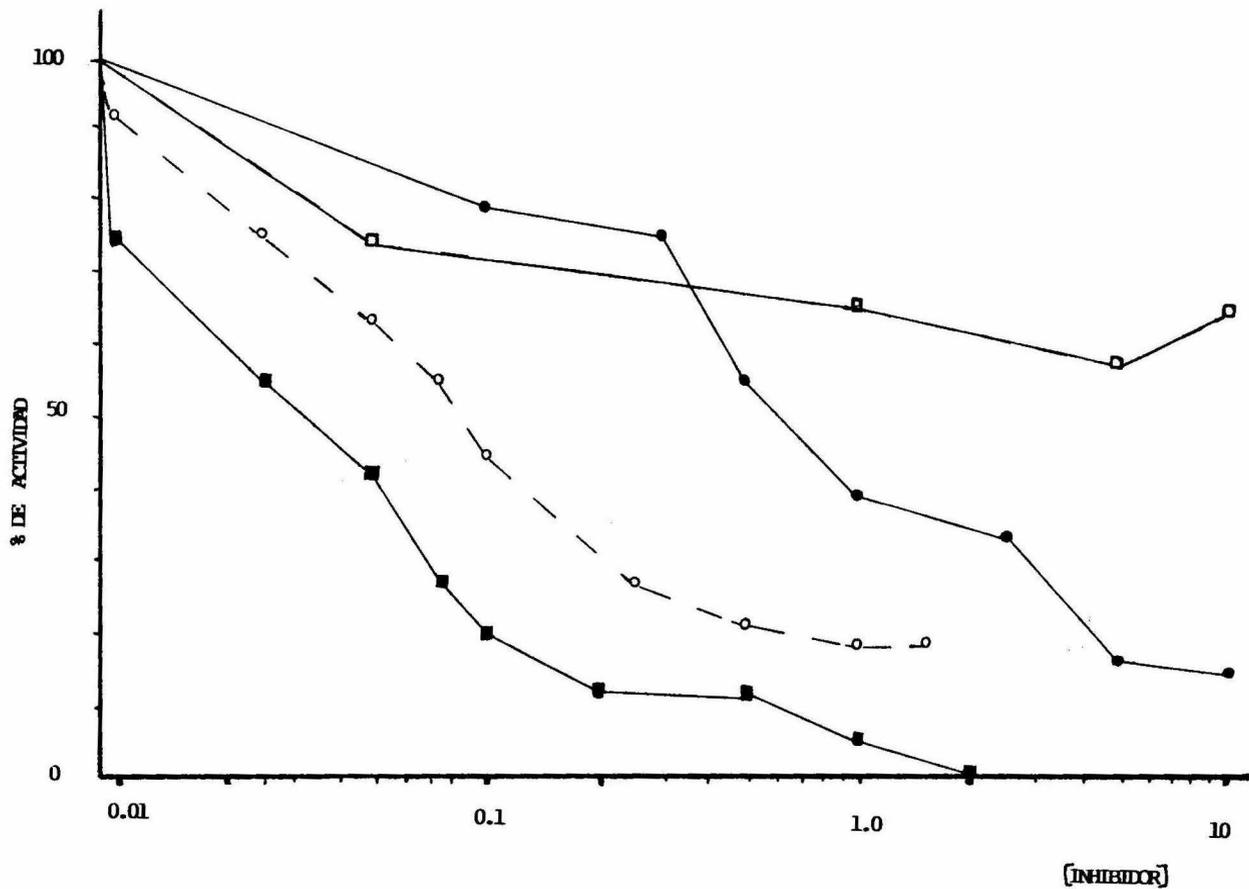


FIGURA 13 Porcentaje de inhibición de la actividad de fosfatasa ácida de testículo de rata de 38 días de edad, en la fracción 9970 Xg.

—□—□— NaF —●—●— CdI₂ —■—■— CuCl₂ —○—○— Na₂WO₄

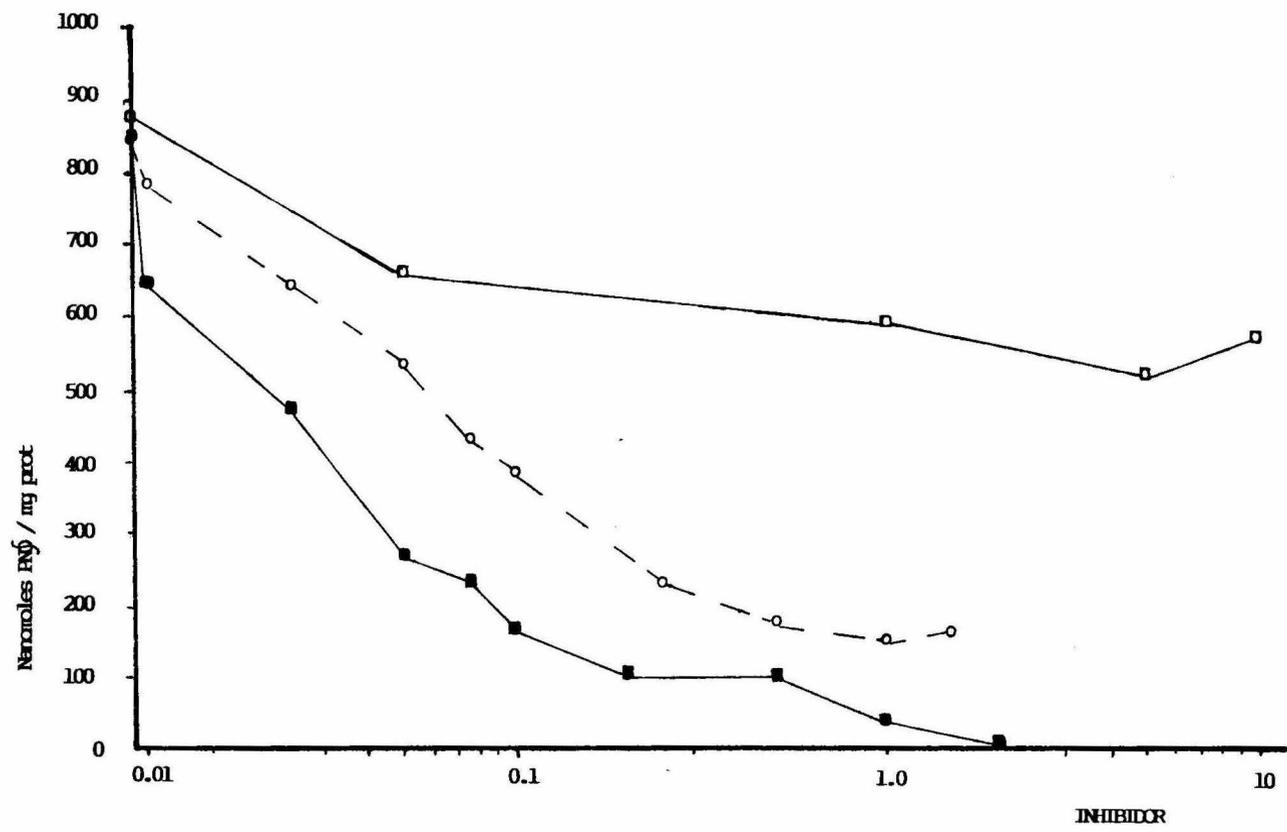


FIGURA 13a Actividad de Fosfatasa ácida de testículo de rata de 38 días de edad en la fracción de 9970 Xg frente a diferentes inhibidores de esta.

—○—○— NaF —■—■— CuCl₂ —○—○— Na₂WO₄

ciones mayores, se requirió de 0.6 mM para alcanzar el 50 % y de 10mM para lograr una inhibición del 93 %. El NaF fue el compuesto con menor capacidad inhibitoria de la hidrólisis de p-Nitrofenil-fosfato, a concentraciones de 10 mM solo fue capaz de inhibir el 40 % de la actividad de F.A.

Aunque los datos expuestos anteriormente demostraron que el Cobre (Cu^{++}), Wolframio (WO_2) y Cadmio (Cd^{++}) son los elementos capaces de inhibir la F.A. contaminante se demostró que también son capaces de inhibir la hidrólisis de G-6-P a pH 5.5 (figura 14). El CuCl_2 5 mM la inhibió en 60 % corroborando el efecto descrito sobre la actividad hidrolítica de la Glucosa-6-fosfohidrolasa hepática (Johnson & Nordlie, 1977). El Wolfrato a una concentración menor, 1.5 mM resultó ser un potentísimo inhibidor, en tanto que el cadmio, parece tener un efecto inhibidor menor sobre la hidrólisis de G-6-P aunque hay que recordar que a pH 5.5 se necesitan concentraciones más altas para poder inhibir completamente la F.A. Debido a que cada isoenzima de F.A. presenta un patrón de actividad característico en diferentes pH se decidió determinar la actividad de F.A. presente en la fracción utilizada como fuente de Glucosa-6-fosfohidrolasa.

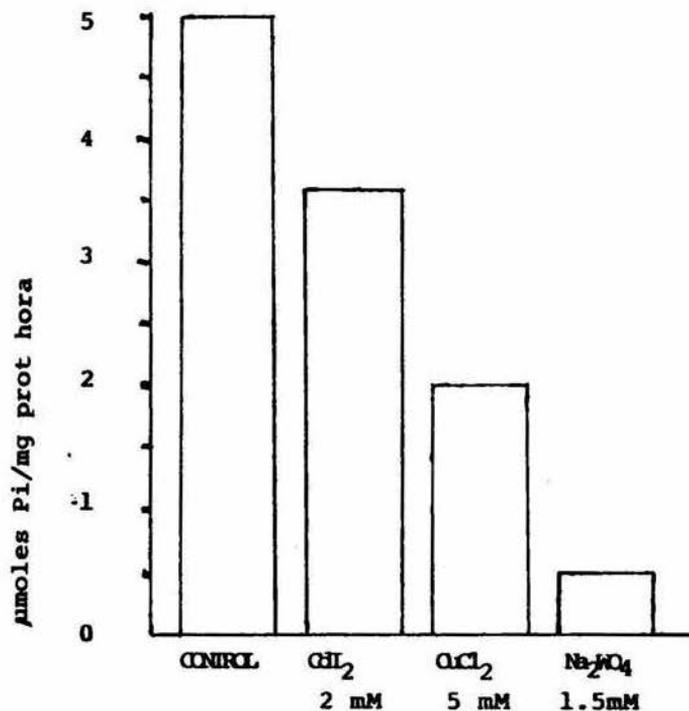


FIGURA 14 Efecto de inhibidores de fosfatasa ácida sobre la actividad de glucosa-6-fosfohidrolasa de testículo de rata de 38 días de edad.
 Medio de incubación: Imidazol 175 mM, tris 125 mM pH 5.5 37°C. El inhibidor se agregó en alicuotas con la concentración correspondiente.

En la figura 15 se muestra la actividad de fosfatasa ácida a diferentes valores de pH, los valores más altos de actividad se alcanzaron en un rango de pH de 5.5 a 6.0, a valores de pH mayores, de 6.5 a 8.0 se observó un descenso gradual en la actividad, inhibiéndose en 70 % a pH 7.5.

Se decidió determinar el efecto de pH sobre la hidrólisis de G-6-P y comparar su patrón de actividad con el de la F.A. La figura 15 muestra que la hidrólisis de glucosa-6-fosfato triplicó su actividad al aumentar el pH de 4 a 5 y se mantuvo hasta pH 6.5. A este pH se inhibió casi 50 % y a pH 8 la actividad fue semejante a la obtenida a pH 4. Como puede observarse la producción de Pi por la actividad de la glucosa-6-fosfohidrolasa alcanzó un nivel menor al 50 % del obtenido por la actividad de F.A. presente en la misma fracción y un patrón de actividad diferente al encontrado para la F.A. Estos resultados sugerían la posibilidad de determinar la actividad de glucosa-6-fosfohidrolasa a pH de 6.5 porque la actividad de F.A. es menor y por tanto más fácil de eliminar su participación. Para ello, se determinó la actividad de F.A. en presencia de diferentes concentraciones de CdI_2 a pH 5.0 y 6.5. Se seleccionó este compuesto porque es capaz de inhibir la actividad de F.A. y porque no modificó en forma importante la

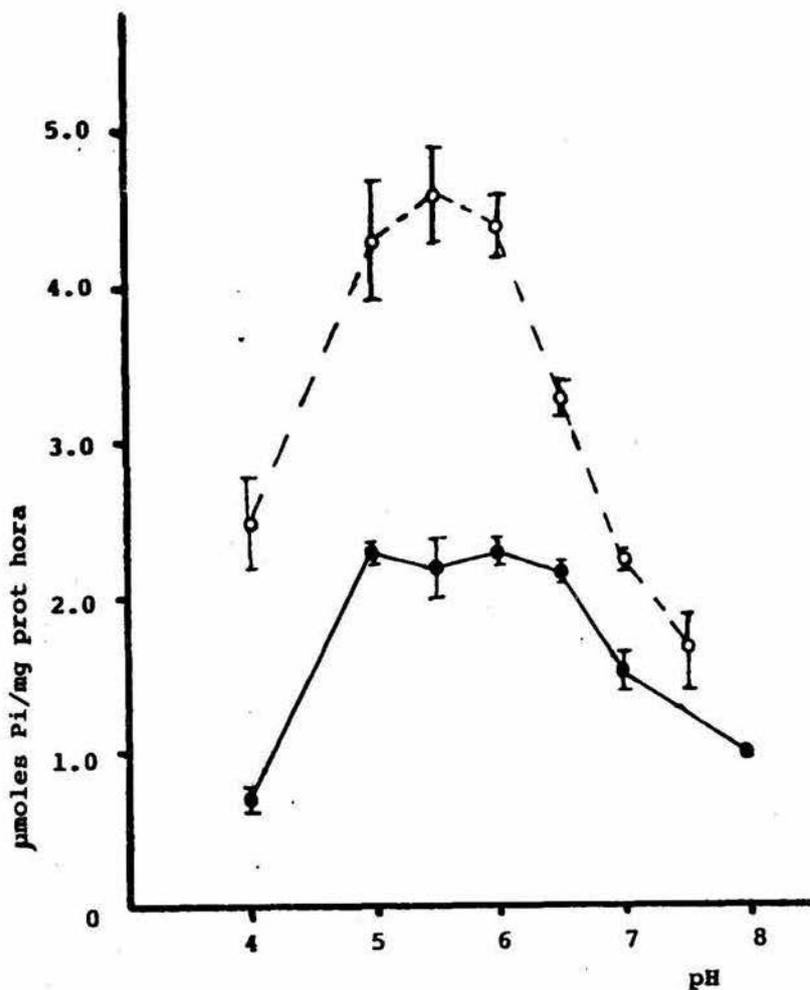


FIGURA 15 Efecto del pH sobre la actividad de fosfatasa ácida y glucosa-6-fosfohidrolasa. Fracción de 9970 xg de testículo de rata de 38 días de edad, n=3 Medio para F.A. pH 4-5.0 MES 50mM, pH 5.5-6.5 IMIDAZOL 175 mM pH 7.0-8.0 HEPES 50mM 150 µg prot p-NOF-P 5mM. 37°C. Medio para G6Pasa pH 4-5.0 MES 50 mM, pH 5.5-6.5 Imidazol 175 mM, pH 7.0-8.0 HEPES 50 mM 150 µg de prot G-6-P 25 mM 37°C.

○—○—○ Fosfatasa Ácida

●—●—● Glucosa-6-fosfohidrolasa

hidrólisis de G-6-P (figura 14). Como puede observarse en la figura 16 a pH de 5.0 se necesitó de una concentración de CdI_2 de 10 mM para inhibir el 86 % de la actividad y a pH de 6.5 se necesitó únicamente de 2.5mM para inhibir a la enzima 95 % con respecto al control. También se puede apreciar que solo el aumento de pH inhibe la actividad de fosfatasa ácida en un 50 % aún en ausencia de cadmio.

Aunque el CdI_2 afectó principalmente la actividad de la F.A. se decidió estudiar la actividad de glucosa-6-fosfohidrolasa a diferentes pH en presencia de cadmio 2.5 mM. Como puede observarse en la figura 17 el patrón de actividad en ausencia y presencia de cadmio es semejante, el CdI_2 provocó un descenso en la actividad de glucosa-6-fosfohidrolasa a todos los valores de pH probados. A pH de 5.0 la inhibió en 32 % y a pH 6.5, la inhibió solamente el 14 % con respecto al control. Estos resultados demostraron que la actividad de la glucosa-6-fosfohidrolasa podía determinarse a pH 6.5 en presencia de CdI_2 2.5 mM, sin la participación de la F.A. en la hidrólisis de G-6-P

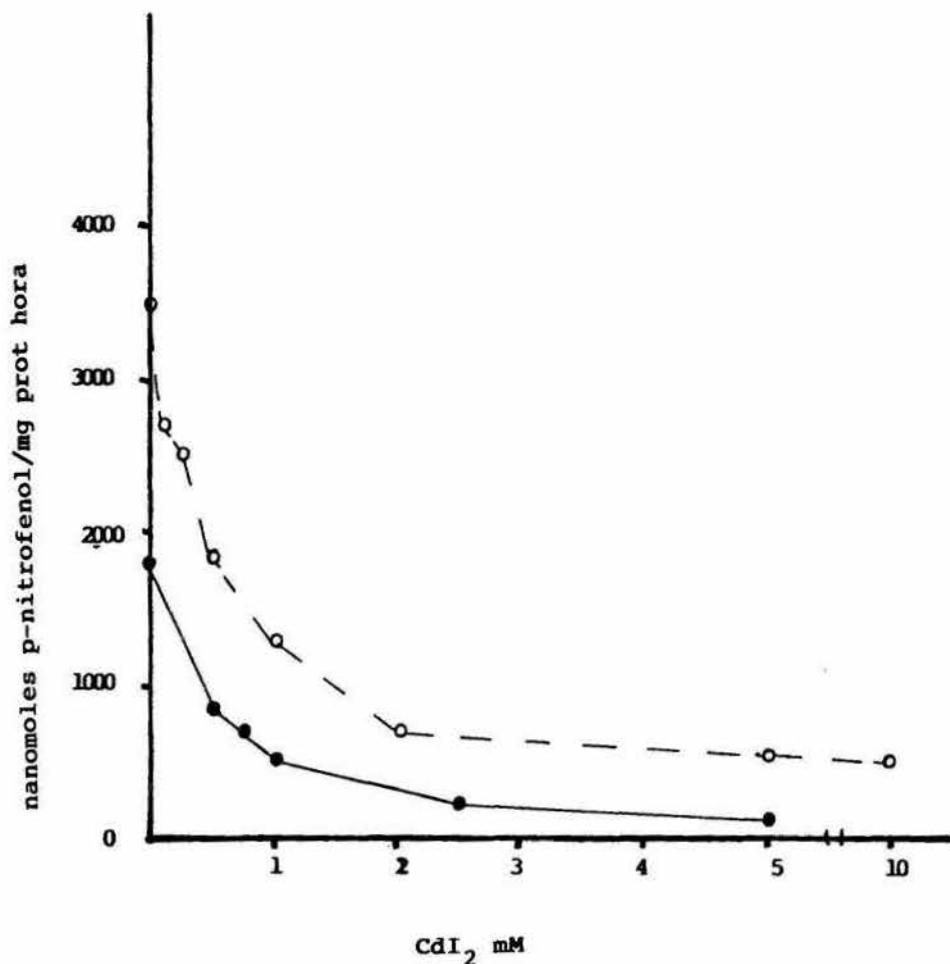


FIGURA 16 Efecto de diferentes concentraciones de CdI₂ sobre la actividad de fosfatasa ácida de testículo de rata en la fracción de 9970 xg, a dos diferentes valores de pH. Medio acetato de sodio 50 mM 30 min de incubación 150 µg de prot sustrato p-NO₂-P 5mM.

○—○—○ pH 5.0
 ●—●—● pH 6.5

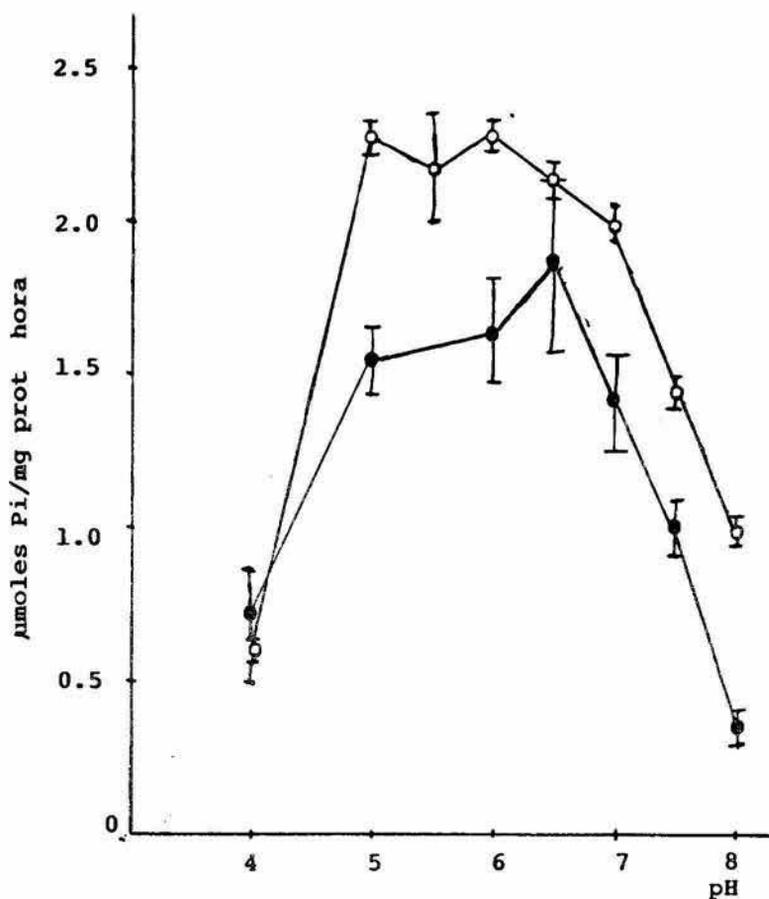


FIGURA 17 Perfil de actividad de glucosa-6-fosfohidrolasa a diferentes valores de pH,

○ — ○ — ○ Glucosa-6-fosfatasa sin CdI₂

● — ● — ● Glucosa-6-fosfatasa + CdI₂

Fracción de 9970 xg de testículo de rata de 38 días de edad n=3.

CURVA DE SUSTRATO

Para determinar la afinidad de la glucosa-6-fosfohidrolasa testicular por glucosa-6-fosfato (figura 18 y 18a), se emplearon las siguientes concentraciones de glucosa-6-fosfato 0.5, 2.0, 2.5, 5.0, 10, 15, 20, 25 y 50 mM y se determinó la actividad enzimática bajo las siguientes condiciones:

(A) pH 6.5 sin inhibidores, (B) pH 5.5 sin inhibidores, (C) pH 6.5 con CdI_2 2.5 mM.

Como se puede notar el cadmio muestra un efecto inhibidor sobre la actividad de glucosa-6-fosfatasa. Los valores de V_{max} fueron de 1.53 $\mu\text{moles Pi/mg prot.h}$ para pH 5.5 y 6.5 en ausencia de inhibidor de F.A. y de 1.0 $\mu\text{moles Pi/mg prot.h}$ en presencia de CdI_2 2.5 mM a pH de 6.5.

En la figura 18a se muestra la gráfica de Lineweaver-Burk de dobles recíprocos obtenida con los datos anteriores. El valor de K_m obtenido a pH 6.5 sin CdI_2 y 6.5 con Cd^{++} es de 20 mM indicando que la afinidad por el sustrato no se modificó por la adición de CdI_2 . A pH 5.5 sin cadmio (Cd^{++}) el valor de K_m fue de 16.6 mM.

Estos valores de K_m sugieren que ni pH, ni la adición de Cd^{++} modifican la afinidad de la enzima por G-6-P.

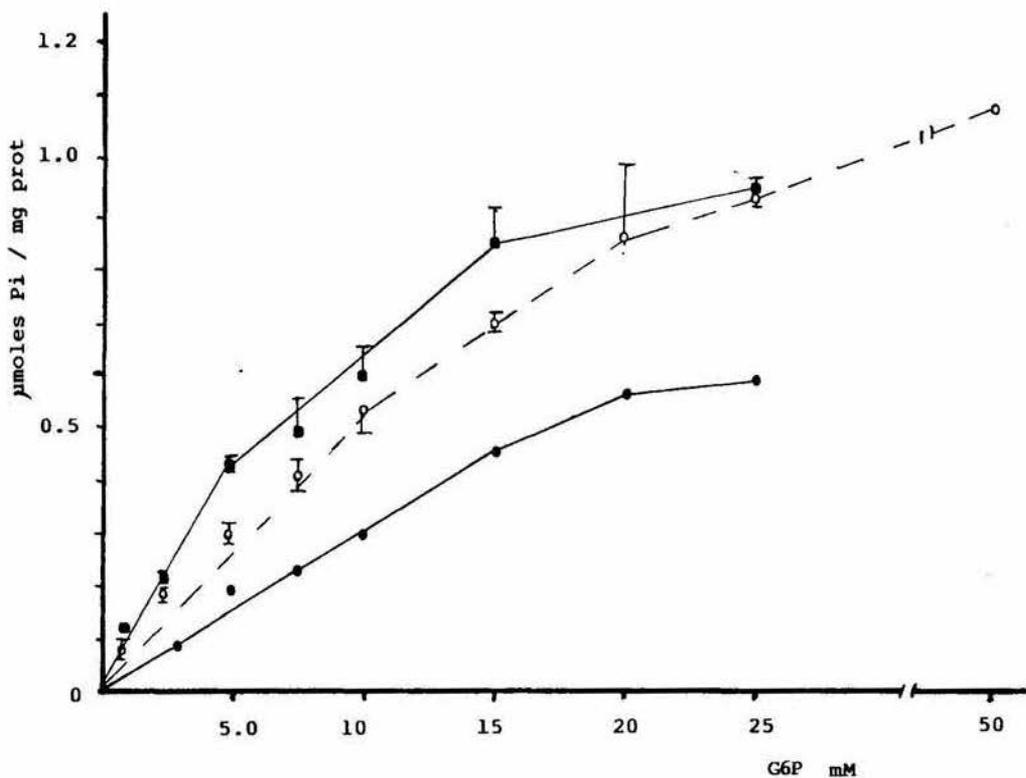


FIGURA 18 Curva de afinidad de glucosa-6-fosfatasa por su sustrato en la fracción de 9970 xg de rata de 38 días de edad.
 n= 3 medio imidazol 175 mM Tris 125 mM 60 min de incubación sin preincubación de la enzima

○—○—○ pH 6.5 sin inhibidores
 ●—●—● pH 5.5 sin inhibidores
 ●—●—● pH 6.5 + CdI₂ 2.5 mM

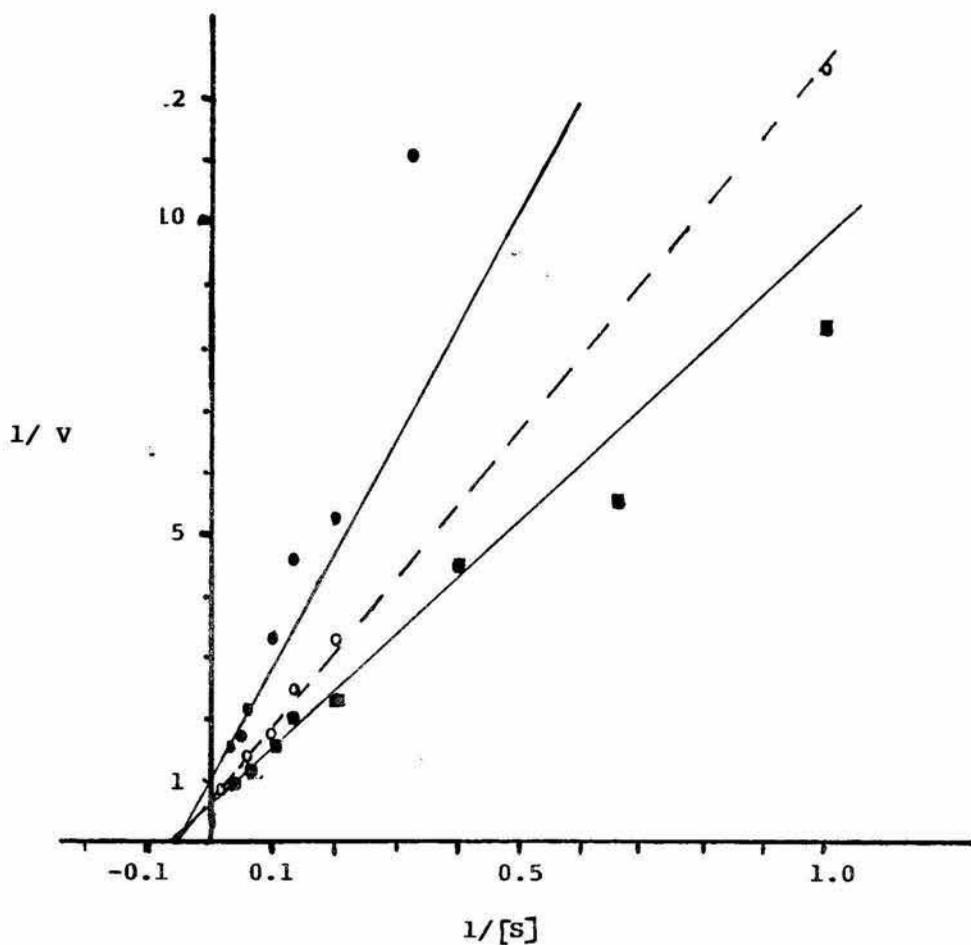


FIGURA 18 a Gráfica de Line Weaver-Burk de glucosa-6-fosfatasa de testículo de rata de 38 días de edad.

- pH 6.5 sin inhibidores
- pH 5.5 sin inhibidores
- pH 6.5 + CdI₂ 2.5 mM

EFEECTO DE LA TEMPERATURA

Debido a que en hígado se ha observado que la actividad de lucosa-6-fosfohidrolasa es inhibida por el aumento de temperatura (Schulze et al 1985), se decidió estudiar la termoestabilidad de la enzima del testículo tomando cuenta sobre todo por que la temperatura escrotal es de 34 °C, 3 °C inferior a la temperatura corporal. Por ello la actividad de G-6-Pasa testicular se determinó a 0, 15, 20, 32, 37, 40, 50 y 60, °C utilizando 25 mM de glucosa-6-fosfato en presencia de CdI 2.5 mM. En la figura 19 se muestra que a 0°C la actividad presente es de 0.188 μ moles Pi/mg prot h aumentando 2 veces la actividad cuando la temperatura se encuentra a 15 y 20 °C a los 32 °C mostró 5 veces la actividad de 0°C de 32 a 37°C existe un aumento de 50% mientras que, de 37 a 40-50 °C unicamente se incrementó 12 %, por ultimo de 50 a 60 °C se presentó una inhibición del 70 % de la actividad registrada a 40-50 °C. A estos resultados en una curva de Arrhenius figura 19b se pudo observar la presencia de dos pendientes diferentes mostrando el descenso abrupto de la actividad y no de una manera gradual.

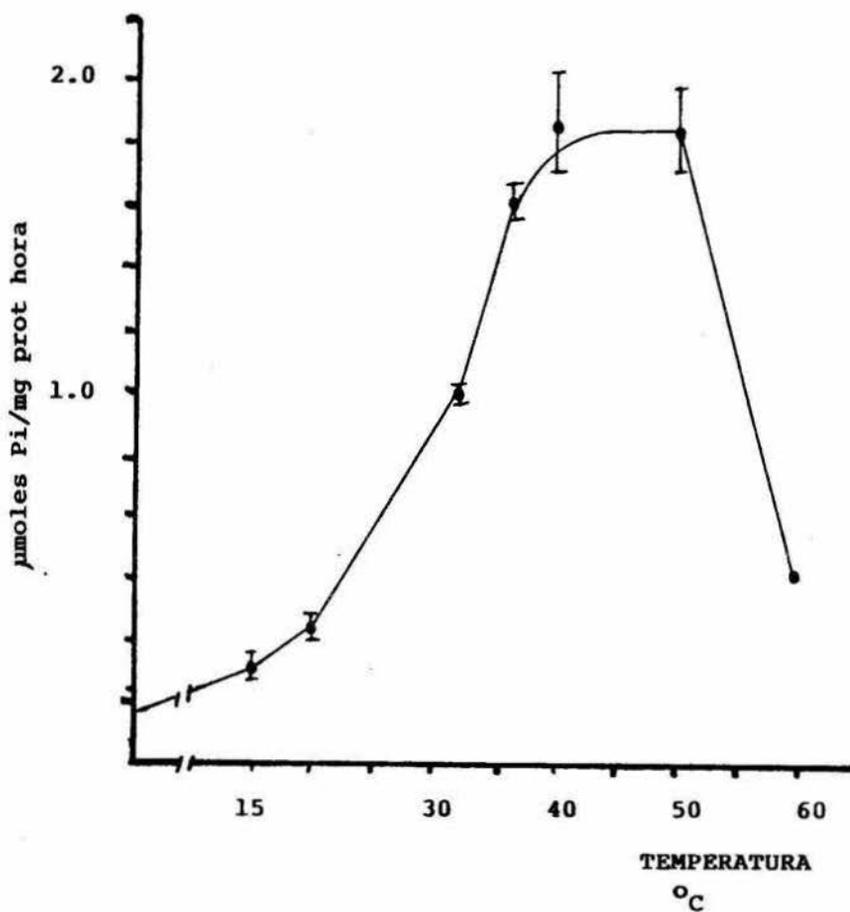


FIGURA 19 · Efecto de la temperatura sobre la actividad de glucosa-6-fosfatasa de testículo de rata de 38 días de edad, medio MES 50 mM imidazol 137 mM CdI_2 2.5 mM pH 6.5 60 min y 25 mM de G-6-P. n= 3.

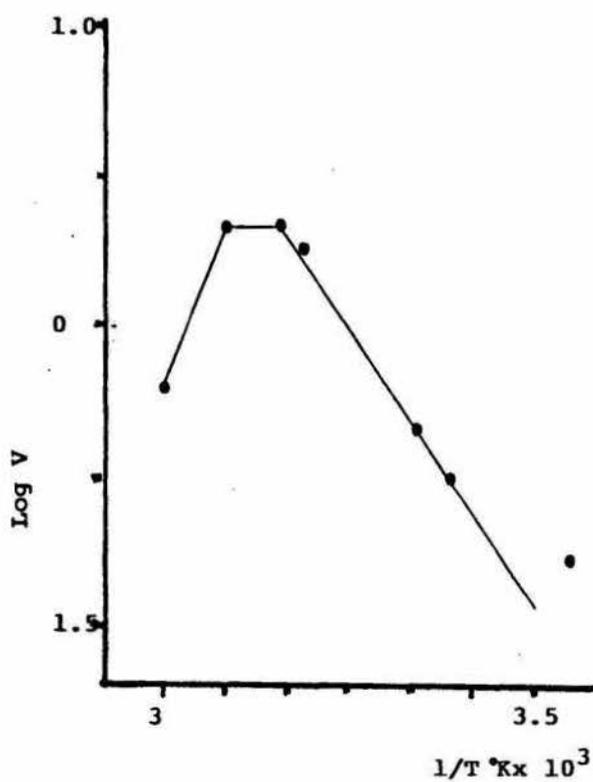


FIGURA 19 a Curva de Arrhenius de la actividad de glucosa -6-fosfatasa de testículo de rata de 38 días de edad.

EFEECTO DEL VANADATO (Na_2VO_5)

Este compuesto se ha utilizado como inhibidor de la G-6-Pasa hepática y se ha demostrado que es capaz de inhibirla desde $50 \mu\text{M}$ (Sing et al 1981). Para caracterizar a la glucosa-6-fosfohidrolasa testicular se decidió determinar si la hidrólisis de G-6-P era sensible a este compuesto. La figura 20 muestra el efecto del vanadato a diferentes concentraciones sobre la actividad de glucosa-6-fosfohidrolasa testicular. Como se puede notar, desde $0.5 \mu\text{M}$ vanadato inhibe el 18 % de la actividad, esta inhibición se incrementa a concentraciones más altas y a $5 \mu\text{M}$ produce una inhibición del 50%.

A concentraciones de 10 a $50 \mu\text{M}$ se observa la actividad residual que representa del 20 al 12.3 %, con respecto al control.

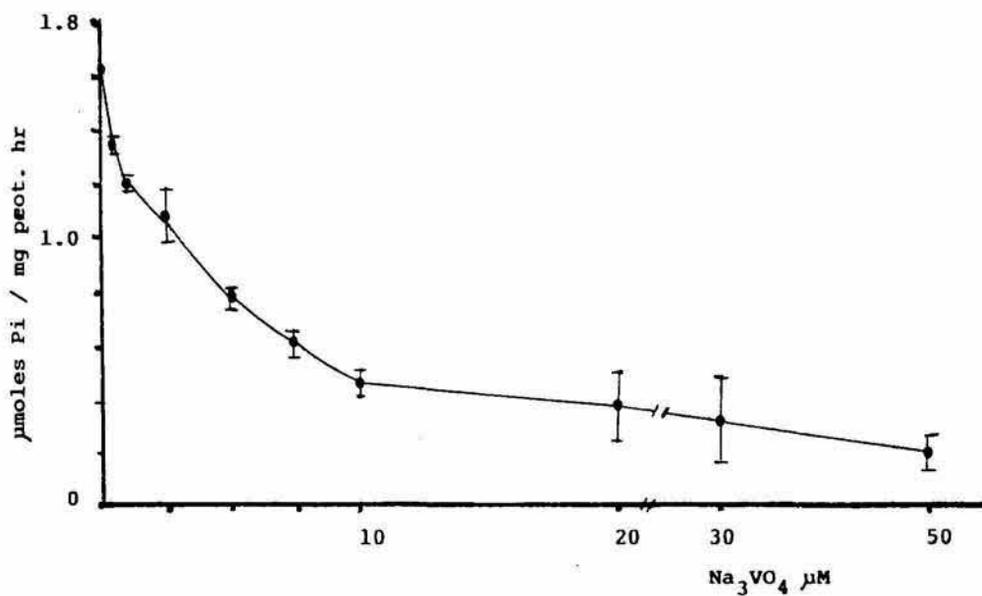


FIGURA 20. Curva de inhibición de glucosa-6-Fosfohidrolasa a diferentes concentraciones de vanadato, fracción 9970 Xg de testículo de rata de 38 días de edad.

EFEECTO DEL CALCIO Y MAGNESIO

Waddell et al (1990) muestra que el calcio y el magnesio interviene de alguna manera la actividad de glucosa-6-fosfohidrolasa.

Por tanto se estudió el efecto de CaCl_2 1 mM y MgCl_2 1 mM sobre la actividad de glucosa-6-fosfohidrolasa testicular, en presencia de Cu^{++} y Cd^{++} inhibidores de fosfatasa ácida, los resultados se muestran en la tabla 1.

La adición de calcio y magnesio en ausencia de inhibidores de F.A. no afectó la actividad de glucosa-6-fosfohidrolasa. Al adicionar CuCl_2 2.5 mM y 5.0 mM se registró una inhibición del 83 % y la adición de calcio o de magnesio redujo la inhibición ya que duplicó la actividad basal obtenida en presencia de 2.5 mM de CuCl_2 este resultando es igual estadísticamente utilizando la prueba de T con un alfa = 0.05. Sin embargo con 5 mM de CuCl_2 la adición de Ca^{++} o de Mg^{++} disminuyó poco la inhibición ya que solo aumentó en menos de la mitad, este resultado es igual estadísticamente utilizando la prueba de T con un alfa = 0.5.

La actividad basal con CdI_2 , a 2.5 mM y 5.0 mM se observó una inhibición de la actividad menor que con

T A B L A I

ADICION	CONTROL	CaCl ₂ 1mM	MgCl ₂ 1mM
NINGUNA	2 . 0 9 ± 0.102	2 . 2 7 ± 0.02	2 . 0 9 ± 0.007
CuCl ₂ 2.5mM	0.363 ± 0.102	0.78 ± 0.002	0.70 ± 0.70
CuCl ₂ 5.0mM	0.346 ± 0.18	0.628 ± 0.01	0.540 ± 0.01
CdI ₂ 2.5 mM	1.063 ± 0.05	1.33 ± 0.02 (58 %)	1.24 ± 0.15 (59 %)
CdI ₂ 5.0 mM	0.627 ± 0.17	0.87 ± 0.01	0.70 ± 0.007

EFEECTO DE CALCIO (CaCl₂) y magnesio (MgCl₂) sobre la actividad de glucosa-6-fosfatasa, en presencia de inhibidores de fosfatasa ácida (CuCl₂, CdI₂); en la fracción de 9970 xg de testículo de rata de 38 días de edad, medio de incubación imidazol 175 mM Tris 125 mM 150 mg de prot en 0.5 ml de medio de incubación, 25 mM de G-6-F.n=3

CuCl_2 . Aunque la glucosa-6-fosfohidrolasa fue inhibida sólo el 51 % con 2.5 mM de CdI_2 y 58 % con 5.0 mM de CdI_2 , la adición de Ca^{++} o de Mg^{++} no produjo cambios significativos estadísticamente utilizando la prueba de T con $\alpha = 0.05$, en la hidrólisis de G-6-P.

ACTIVIDAD DE GLUCOSA 6 FOSFATASA DURANTE LA DIFERENCIACION DEL EPITELIO GERMINAL

Con el objeto de saber si la actividad de glucosa-6-fosfohidrolasa cambiaba con respecto a la evolución del retículo endoplásmico, se decidió determinar la actividad de la enzima en las células germinales aisladas en diferentes etapas de maduración que representan grados de complejidad distinto del R.E. En la figura 21 se muestra la actividad de glucosa-6-fosfohidrolasa de espermátocitos primarios, de espermátides y de espermatozoides obtenidos de testículo de rata.

Como se puede notar la actividad máxima se registró en las espermátides. La actividad de los espermátocitos primarios, en leptoteno y paquiteno representó más del 50 % de la actividad del que se observó en las espermátides, resultando estadísticamente significativa utilizando para ello la prueba de T con $\alpha = 0.05$.

La actividad en espermatozoides del epidídimo alcanzó solamente el 0.29 % de la actividad registrada en espermátides. Este patrón de actividad es coincidente con las etapas de desarrollo del retículo endoplásmico durante la espermatogénesis.

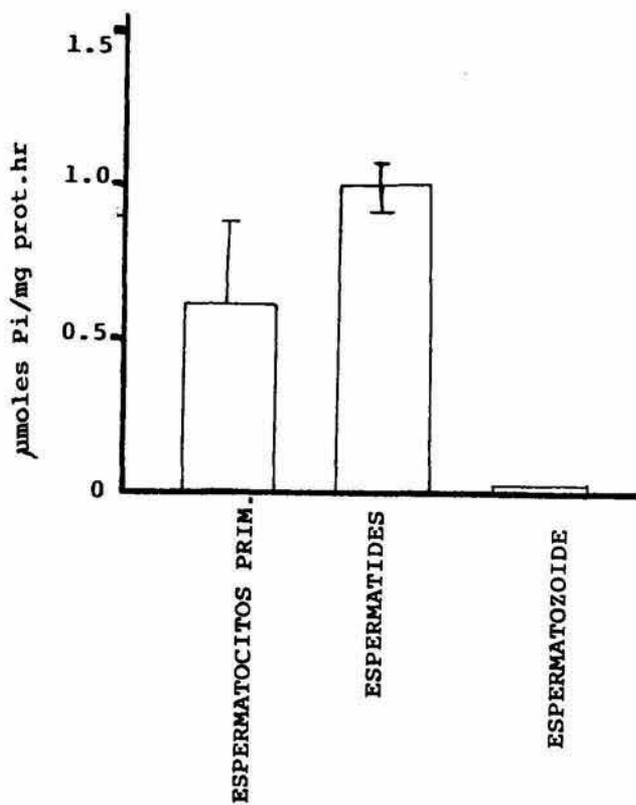


FIGURA 21 Actividad de glucosa-6-fosfatasa en células aisladas de epitelio germinal del testículo de rata medio MES 50 mM imidazol 137 mM CdI_2 2.5 mM pH 6.5 150 µg prot 37 °C 25 mM G-6-P n=2

D I S C U S I O N

**DISTRIBUCION DE LA ACTIVIDAD DE
GLUCOSA-6-FOSFOHIDROLASA**

La localización subcelular de glucosa-6-fosfohidrolasa en hígado se ha asociado principalmente a la fracción microsomal (Beaufay y colaboradores 1974, Amar-Costesec et al 1974, Anchors y Kornovsk 1975, Reczeck y Ville 1982, Arion et al 1980, Arion et al 1976, McNamee 1989). El empleo de técnicas histoquímicas utilizando la glucosa-6-fosfatasa como marcadora de R.E. ha permitido la identificación de estructuras derivadas de este organelo. Por ejemplo, en plaquetas se ha sugerido que el sistema tubular denso se origina a partir de membranas de R.E. basándose en la reacción positiva de Glucosa-6-fosfatasa (Daimon, 1982). En el testículo se de rata también se demostró, a través de estudios histoquímicos, actividad de glucosa-6-fosfatasa en las cisternas del retículo endoplásmico de las espermátides y espermatoцитos, así como en células de Leydig y de Sertoli (Thorne-Tjomsland et al 1991).

En el presente estudio, la actividad de glucosa-6-fosfohidrolasa, se recuperó en varias fracciones que sedimentan a 1929, 9790, 20000 y 124000 xg. En la fracción de 1929 xg se encontró enriquecida en actividad de deshidrogenasa succínica así como de catepsina B

(Martinez, 1993) y estas enzimas son marcadoras de mitocondrias y lisosomas, respectivamente (Mc Namee 1989). En las fracciones de 9790 y 20000 xg también se presentó una actividad alta de glucosa-6-fosfohidrolasa mayor que la encontrada en la pastilla que sedimenta a 124000 xg lo que indica que el testículo de rata esta actividad enzimática está asociada principalmente a membranas de retículo endoplásmico pesadas y no a la fracción microsomal más ligera que se obtiene a 105000 xg, como en la mayoría de los trabajos publicados. Este hecho podría explicarse al considerar que en las ratas de 38 días de edad, el epitelio germinal se encuentra constituido en un 60 % por espermátides, (Clermont & Pery 1957) cuyo retículo endoplásmico presenta gran desarrollo y arreglos estructurales complejos (Clermont & Rambourg 1978), que al ser fragmentado durante la homogeneización del tejido, las vesículas que se forman no toman un tamaño uniforme, sedimentando así a velocidades diferentes, que no permitió enriquecer una sola fracción la actividad de la enzima. Esta distribución subcelular de la glucosa-6-fosfohidrolasa testicular fue obtenida inhibiendo la participación de la fosfatasa ácida utilizando los inhibidores descritos por Vanha-Perttula, (1970).

Otra posible explicación al patrón de distribución subcelular de la glucosa-6-fosfohidrolasa testicular se basa en observaciones de otros autores que han reportado que esta actividad enzimática no es exclusiva de membranas del retículo endoplásmico, se ha encontrado actividad asociada a la membrana nuclear y a membranas de retículo endoplásmico que se asocian a mitocondria (Vorhaben & Campell, 1979). Se ha sugerido que la relación entre la mitocondria y las vesículas de retículo endoplásmico, podría tener significado fisiológico, ya que, el pirofosfato producido en mitocondria a partir del metabolismo de ácidos grasos de cadena corta, podría ser rápidamente hidrolizado por la glucosa-6-fosfatasa a ortofosfato inorgánico (Veech et al 1980). Lueck & Nordlie (1970) apoyan esta posibilidad y también sugieren que el carbamil-fosfato producido por la mitocondria, podría ser utilizado en la síntesis de glucosa-6-fosfato, gracias a la actividad de fosfotransferasa de glucosa-6-fosfatasa del R.E.

En el caso del testículo, la fracción de 1929 xg es una fracción enriquecida en actividad de deshidrogenasa succínica y de catepsina B, lo que indica que posiblemente también en este tejido existe una asociación entre R.E. y mitocondria.

INHIBICION DE LA ACTIVIDAD DE FOSFATASA ACIDA

Con el fin de eliminar la participación de fosfatasa ácida (F.A.) en la hidrólisis de glucosa-6-fosfato se utilizaron inhibidores de esta, que actúan de una manera diferencial para poder inferir que tipo de isoenzima se encuentra presente; así las isoenzimas I y II no son muy sensibles a cobre y a cadmio a 0.05 mM estos inhibidores actúan principalmente en las isoenzimas III y IV. El fluoruro de sodio a 0.5 mM inhibe a las isoenzimas I y II en un 90 %, mientras que solo inhibe en un 50 % la actividad de las isoenzimas III y IV. Por último el wolframato a 0.5 mM inhibe todas las isoenzimas y no puede ser utilizado como indicador del tipo de F.A. (Vanha-Perttula, 1970).

El pH óptimo para la actividad de fosfatasa ácida (5.0-6.0) determinado en este trabajo, no permite discriminar de que isoenzima se trata, puesto que abarca los valores para las isoenzimas II, III y IV (Vanha-Perttula, 1970), sin embargo la inhibición de la actividad en presencia de Cd^{++} , Cu^{++} , $\text{WO}_4^{=}$ y la resistencia a la inactivación en presencia de NaF, sugieren que la isoenzima de F.A presente en la fracción usada como fuente de glucosa-6-fosfohidrolasa se trata de la isoenzima III y/o IV. por otra parte y en

apoyo a esta sugerencia se sabe que las isoenzimas de F.A. se manifiestan dependiendo del grado de diferenciación del epitelio germinal por tanto según la edad del animal, las isoenzimas III y IV aparecen a la edad en que se alcanza el estadio de espermátides y durante su maduración a espermatozoides (Guha & Vanha-Perttula, 1983) que en el caso de la rata representarían el tipo celular predominante a 38 días de edad.

pH óptimo de Glucosa-6-fosfohidrolasa testicular

El hallazgo de que la hidrólisis de glucosa-6-fosfato fuera constante a un intervalo de pH de 5 a 6.5, tanto en presencia como en ausencia de inhibidores de F.A., permitió determinar la actividad de la glucosa-6-fosfohidrolasa a pH de 6.5 utilizando una concentración de CdI_2 de 2.5 mM permitiendo así bloquear en un 50 % la actividad de F.A. y su posible participación en la hidrólisis de G-6-P.

Aunque empleando técnicas histoquímicas Thorne-Tjomsland et al (1991) encontraron que la actividad de glucosa-6-fosfohidrolasa en espermatoцитos y espermátides de rata, no cambia cuando varía el pH del medio en un rango de 5.0 a 7.5. Colilla et al (1975) mencionan que la máxima actividad de glucosa-6-fosfohidrolasa del

homogeneizado total de testículo de rata adulta se registró a pH de 5.5. Estos resultados son congruentes con lo encontrado en el presente estudio. El pH de la enzima testicular no es diferente del reportado para la glucosa-6-fosfohidrolasa de otros tejidos; ya que se ha reportado que el pH óptimo de glucosa-6-fosfohidrolasa hepática se encuentra en un rango de 6.0 a 7.0. Nordlie y colaboradores (1968) encontraron que la actividad de fosfohidrolasa de la glucosa-6-fosfatasa de hígado tiene un pH óptimo de 6.5 en microsomas rotos y de pH 6.0 en intactos. Hay que tomar en cuenta que se ha demostrado que cada una de las reacciones catalizadas por la glucosa-6-fosfatasa tienen un valor de pH óptimo diferente. Johnson y colaboradores (1974) determinaron que la glucosa-6-fosfatasa de hígado presenta un pH óptimo de 6.0 en la reacción de fosfohidrolasa mientras que la reacción de fosfotransferasa el pH óptimo es de 5.0 a 5.5

K_m y V_{max} de glucosa-6-fosfatasa

En el presente estudio la K_m determinada a pH 5.5, sin inhibidores de F.A., fue de 16.6 mM. Mientras que a pH de 6.5 sin inhibidores así como en presencia de CdI₂ 2.5 mM (inhibidor de fosfatasa ácida) la K_m calculada

fué de 20 mM. Estos valores de Km son semejantes a los reportados para el espermatozoide eyaculado de toro donde la Km para glucosa-6-fosfatasa fue 18.5 mM Hipakka y Hammersted (1978).

Los valores de Vmax a pH 5.5 y 6.5 sin inhibidores de fosfatasa ácida fueron 1.53 μ moles de Pi/mg de prot./60 min. A pH de 6.5 con cadmio, el valor fue de 1 μ mol de Pi/mgprot hora descendiendo 30%.

Los datos de Vmax reportados para la glucosa-6-fosfatasa de espermatozoide de toro fue de 0.16 μ moles de Pi/mg prot hora/ 10^6 cel.

Los valores de Km para glucosa-6-fosfato del espermatozoide y de testículo son más altos que los reportados para hígado (Hammerstedt et al 1975, Hiipakka 1978)).

Se sabe que la glucosa-6-fosfatasa hepática es una enzima que varía su actividad de acuerdo al estado hormonal y de ayuno del organismo. Trabajos realizados en hígado muestran una Vmax de 2.61 μ moles de Pi/mg prot/20min igual a 7.83 μ moles Pi/hora después de que se alimentó al animal la Km calculada fue de 2.7 mM, en animales que se les ha mantenido en ayuno muestran una Vmax de 6.05 y una Km de 2.6 mM. La afinidad por el sustrato parece no ser modificada por esta situación, sino que únicamente aumenta la actividad (Jackobsson et al 1968).

Los valores de Km y Vmax a pH de 7.0 en la fracción microsomal de hígado de rata, empleando microsomas intactos y rotos, tanto en animales diabéticos como normales, apoyan la observación de que la afinidad de la glucosa-6-fosfatasa por el sustrato no se modifica sino que es la Vmax la que se altera en las diferentes condiciones estudiadas.

En estudios realizados por Canfield et al (1988) se obtuvieron los valores de estos parámetros cinéticos en hígado bajo diferentes condiciones:

Microsoma intacto	Vmax	Km
	$\mu\text{moles Pi/mgprot.}$	mM
Normal	0.23	2.2
Diabético	0.69	3.0
 Microsoma Roto		
Normal	0.37	1.6
Diabético	1.9	2.0

Termoestabilidad de glucosa-6-fosfatasa

Se ha propuesto que la actividad de la glucosa-6-fosfatasa depende del ambiente hidrofóbico de la membrana (Zakim, 1970, Carter et al, 1975). y una vez que la enzima ha sido solubilizada es extremadamente lábil a altas temperaturas. Se ha demostrado que diferentes compuestos pueden proteger a la enzima de la inactivación térmica por ejemplo NaF, $\text{MoO}_4^{=}$ (Burchell & Burchell, 1980) y que si el sitio catalítico está ocupado por un sustrato como G-6-P la enzima también se protege (Zakim & Dannenberg, 1990; Huang & Nordlie, 1972).

Sin embargo estos no son los únicos factores que pudieran determinar la alta resistencia a la inactivación por temperatura, por lo que es importante tomar en cuenta los componentes del medio de incubación; en el presente trabajo el medio incluía:

a) CdI^{++} que además de participar en la inhibición de la actividad de fosfatasa ácida, igualmente es capaz de actuar sobre los grupos SH cuyo efecto sobre glucosa-6-fosfohidrolasa no puede precisarse.

I^- es un agente cautrópico que modifica las estructuras del agua y que incrementa la permeabilidad de grupos hidrofóbicos (Hatefi & Hanstein, 1969).

Efecto del vanadato

El vanadato es el más potente inhibidor de glucosa-6-fosfatasa (Sing et al 1981). Este compuesto inhibe en forma competitiva la actividad hidrolítica así como la sintética de la enzima tanto en microsomas tratados con detergente como en microsomas intactos. Los valores de KI a pH de 7.4 fueron:

- a) G6P fosfohidrolasa = 1.5 μM
- b) PPI-glucosa-fosfotransferasa = 0.48 μM
- c) Carbamil-fosfato-fosfatransferasa = 1.0 μM

El efecto de vanadato para la glucosa-6-fosfohidrolasa testicular en el presente trabajo, fue similar, con 5 μM del compuesto se inhiben 50 % la actividad.

Efecto de calcio (CaCl_2) y magnesio(MgCl_2)

Los estudios iniciados por Yamaguchi & Momose, (1983) señalaron que la administración de calcitonina aumentaba el contenido de calcio y de la actividad de glucosa-6-fosfatasa en hígado sugirieron que el calcio podría regular la actividad de esta enzima. Sin embargo en reportes posteriores se ha demostrado que concentraciones fisiológicas de calcio no afectan de ninguna manera la actividad de la enzima (Nordlie & Sukalski, 1985; Werve, 1989).

Como puede apreciarse el papel del calcio en la regulación de la glucosa-6-fosfatasa debe ser estudiado más profundamente.

El magnesio en concentraciones fisiológicas no muestra ningún efecto sobre la actividad fosfohidrolasa de glucosa -6-fosfatasa (Johnson et al 1974).

En el presente estudio no se encontró una diferencia significativa del efecto del calcio o magnesio en la actividad de la glucosa-6-fosfohidrolasa apoyando observaciones previas de otros autores.

Actividad de glucosa-6-fosfohidrolasa y evolución del retículo endoplásmico en células germinales

Como se mencionó anteriormente, durante la maduración de las espermátides a espermatozoides, el retículo endoplásmico alcanza un gran desarrollo y muestra una serie de transformaciones. En la etapa de espermátocitos en paquiteno leptoteno no se presenta este desarrollo del R.E. y en espermatozoide el R.E. prácticamente es nulo (Clermont & Rambourg, 1978).

La actividad de glucosa-6-fosfohidrolasa en células aisladas del epitelio germinal así como de espermatozoides extraídos del vaso deferente puede correlacionarse con el grado de desarrollo de retículo endoplásmico presente. El nivel más alto de actividad se encontró en espermátides seguido por la actividad de los espermátocitos y la poca actividad encontrada en espermatozoide pudiera ser atribuida a la membrana nuclear si se considera que esta es originada de retículo endoplásmico (Berkaloff, 1982).

Aunque se ha reportado que hay una alta actividad en espermatozoides eyaculados de toro (Hammstedt & Lardy 1983) y en espermatozoides eyaculados de mono donde se muestran una actividad mayor que los espermatozoides testiculares (Panse et al 1983), sería importante

determinar si para estos casos la actividad de la enzima es la misma en presencia de inhibidores de fosfatasas ácidas.

CONCLUSIONES

- 1.- A 60 min de incubación bajo nuestras condiciones de trabajo la actividad de la enzima mantiene una linealidad al graficar sus valores.
- 2.-La actividad de glucosa-6-fosfohidrolasa de testículo de rata de 38 días de edad se encuentra asociada principalmente a fracciones membranales pesadas.
- 3.- En homegeneizados totales de testículo de rata se encuentra una alta actividad de fosfatasa ácida, que es importante eliminar si se quiere medir la actividad real de glucosa-6-fosfohidrolasa
- 4.-La actividad de fosfatasa ácida de testículo de rata pudo ser eliminada utilizando CdI_2 y aumentando a pH de 6.5.
- 5.- El rango de pH optimo de la glucosa-6-fosfohidrolasa fue de 5.5-6.5 semejante a la enzima hepática.
- 6.-La K_m calculada en el presente estudio fue 20 mM más al más alta que la mostrada en hígado pero semejante al espermatozoide de toro.
- 7.-El vanadato fue un potente inhibidor de la actividad de glucosa-6-fosfohidrolasa testicular al igual que para la glucosa-6-fosfatasa hepática.
- 8.-La glucosa-6-fosfohidrolasa es una enzima que bajo las las condiciones de trabajo utilizadas en el presente pudo protegerse de la inactivación por calor hasta una temperatura de 60 °C.
- 9.-El calcio y el magnesio en ausencia de inhibidores de fosfatasa ácida no mostraron efecto sobre la actividad de la enzima.
- 10.-La actividad de glucosa-6-fosfatasa fué mayormente asociada a espermátides (ratas de 38 días de edad).

BIBLIOGRAFIA.

- 1 .-Alberts,B.; Bray,D.; Lewis,J.; Raff,M.;Keith,R. y Watson J.D. (1983). The Endoplasmic reticulum. The molecular Biology of the cell. Garland N.Y.: 325-355.
- 2 .-Amar-Costesec,A.; Beaufay,H.; Wibo,M. y Thines-Sempoux Feytmans (1974). Analitical study of microsomes from rat liver II preparation and composition of the microsomal fraction. J.CELL.BIOL. 61: 201-212.
- 3 .-Anchors,J.M. y Karnovsky,M.L.(1975) Purification of cerebral glucose - 6 - phosphatase an enzyme involved in sleep. J.BIOL.CHEM. 250: 6408-6416.
- 4 .-Andre,J.(1962) Contribution to the Knowlege of the chondrine study of its ultrastructural changes during spermiogenesis. J. ULTRAS. RES. 6 (3): 1-185
- 5 .-Arion,J.W.; Lange,J.A. y Ballas,L.M.(1975) On the involvement of a glucose-6-phosphate transport system in the function of microsomal glucose-6-phosphatase. MOL. CELL. BIOCHEM. 6: 75-83.
- 6 .-Arion, J.W.;Ballas,M.L.; Lange,J.A. y Wallin K.B.(1976) Microsomal membrane permeability and the hepatic glucose-6-phosphatase system. J.BIOL.CHEM. 251 (16): 4901-4907.
- 7 .-Arion,J.W.; Lange,J.A.; Walls E.H. y Ballas, M.L. (1980) Evidence for the participation of independent translocases for phposphatase and glucose-6-phosphatase in the in the microsomal glucose-6-phosphatase system. J. BIOL. CHEM. 255 (2): 10396-10406.
- 8 .-Aronson, N.N. y Touster, O. (1974) isolation of rat liver plasma membrane fragmnts in isotonic sucrose. Methods in Enzymology Vol XXI part A. Academic Press: 90
- 9 .-Band, G.C. y Jones, C.T. (1980) Functional activation by glucagon of glucose-6-phosphatase and gluconeogenesis of the perfused liver of the fetal guinea pig. FEBS LETTERS 22: 190-194.
- 10.-Bardin,W.C.;Cheng,Y.C.;Musto,A.N. & Gunsalus G.L. (1988) The Sertoli Cell. THE PHYSYOL. OF REPROD. Edited por E. Knobil and J. Neill. Raven Press. New York: 933-974.
- 11.-Beaufay,H. y Berthet,J.(1974). Analitical study of microsomes and isolated,subcellular membranes from rat liver. II preparation and composition of the microsomal fraction. J.CELL.BIOL. 61: 202-212.

- 12.-Berkaloff (1982) Retículo Endoplásmico en Biología y fisiología celular. Omega, España. : 229-266.
- 13.-Bonting, S.L.; Coravagio, L.L.; Canady M.R. y Howking, N. H. (1964) Studies on sodium potassium activated ATP. ARCHIV.BIOCHEM.BIOPHIS. 95: 416-423.
- 14.-Boxer, J.; Kirby, L.T. y Hahn P. (1974). The response of glucose-6-phosphatase in human and rat fetal liver cultures to dibutyryl cyclic AMP. PROC.SOC.EXP. MED. 145: 901-903.
- 15.-Bryan, A.C.; Ackel, E.D. y Singer, T. (1978) Mammalian succinate deshidrogenase. Methods in Enzymology Vol LIII Academic Press, N.Y. : 466.
- 16.-Burchell y Burchell(1980)Stabilization of partially-purified glucose -6- phosphatase by fluoride. FEBS LETTERS 118 (2):180-184.
- 17.-Canfield W.K. y Arion W.J. (1988) The glucose-6-phosphatase system in rat hepatic microsomes display hyperbolic kinetics at physiological glucose-6-phosphate concentration. J. BIOL.CHEM.263 (16): 7458-7460.
- 19.-Carter, B. R.; Trivedi, P. y Hallilan T. (1975) Inhibition of glucose-6-phosphatase by pure and impure c-type phospholipases. BIOCHEM J. 148: 279-294.
- 20.-Christ, B.; Probst, I. y Jungermann, K. (1986) Antagonistic regulation of the glucose/glucose-6-phosphate cycle by insulin and glucagon in cultured hepatocytes. BIOCHEM. J. 238: 185-191.
- 21.-Clermont, Y. y Perey, B. (1957) Quantitative study of the seminiferous in immature rat AM. J. ANAT. 100 : 241.
- 22.-Clermont, Y. y Rambourg, A. (1978) Evolution of the endoplasmic reticulum during rat spermiogenesis. AMER. J. ANAT. 151:191-212.
- 23.-Colilla, W.; Jorgenson, R.A. y Nordlie R.C. (1975) Mammalian carbamyl phosphate: glucose phosphotransferase and glucose phosphate phosphohidrolase: extended tissue distribution. BIOCHIM. BIOPHIS. ACT. 377:117-125
- 24.-Daimon, L. (1982) Cytochemical evidence of the origin of the tubular system in the mouse platelet. HISTOCHEMISTRY 76: 189-196.

- 25.-Davis, J.R. y Firlit, F.F. (1965) Effect of glucose on uptake of lysine- H^3 in cell of the seminiferous epithelium. AM. J. PHYSIOL. **209** (2): 425-432.
- 26.-Davis, J.R. (1969) Metabolic Aspects of spermatogenesis BIOL. REPROD. **1** : 93-118.
- 27.-Freedland, R.A.; Cunliffe, T.L. y Zinkl, J.G. (1966) The effect of insulin on enzyme adaptations to diets and hormones. J.BIOL.CHEM. **241** (22):5448-5451.
- 28.-Fabiato y Fabiato (1970) Excitation-contraction coupling of isolated cardiac fiber with disrupted or closed sarcolemman calcium-dependent cyclic and tonic contractions CIRC. RESS. **31** : 293.
- 29.-Garcia, M.V.; Cabezas, J.A. y Perez-Gonzales, M.N. (1985) Alteration in the activities of subcellular fractions-marker enzymes in rat liver and brain by hydrocortison and corticosterone treatment. J.BIACHEM. **17** (2):203-208.
- 30.-Garfield, S.A. y Cardell, R.R. (1979) Hepatic glucose-6-phosphatase activities end correlation ultrastructural alterations in hepatocytes of diabetic rat. DIABETES. **28** : 664-679.
- 31.-Garland R.C. (1988) Effect of insulin on the induction by dexamethasone of glucose phosphohidrolase and translocase activities in cultured hepatoma cells. BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMUN. **153** (1): 307-312.
- 32.-Gomes; W.R. (1971) Oxigen consumption by seminiferous tubules and interstitial tissues of normal and criptorchid rat testes. J. REPROD. FERT. **26**: 427-429.
- 33.-Grootegoed, J.A.; Jansen R. y Van Der Molen J.H. (1984) The role of glucose, Pyruvate and lactate in ATP production by rat spermatocytes and spermatids. BIOCHIM. BIOPHYS. ACT. **767** : 248-256.
- 34.-Grootegoed, J.A.; Jansen, R. y van der Molen H.J. (1986) Effect of glucose on ATP dephosphorylation in rat spermatids. J. REPROD. FERT. **77** : 99-107.
- 35.-Guha, K. y Vanha-Perttula, T. (1983) Acid phosphatase in the mouse testis: activity changes during development ARCHIV. ANDROL. **10** : 7-16.
- 36.-Hammersted, R.H. (1975) Tritium release from (2- H^3) D-glucose consumption by bovine sperm. BIOL. REPROD. **12**: 545-551.

- 37.-Hammersted R.H. y Lardy, H.A. (1983) The effect of substrate cycling on the ATP yield of sperm glycolysis J.BIOL.CHEM. 258 (14): 8759-8768.
- 38.-Hartree, E.F.(1972) Determination of proteina: modification of the lowry method than gives a linear photometric responce. ANALITICAL BIOCHEMISTRY 48: 422-427.
- 39.-Hass, L.F.y Byrne, W.L. (1960) The mechanism of glucose-6-phosphatase. J.AM.CHEM.SOC.82:947-954.
- 40.-Hatefi, Y y Hanstein, W.G.(1969) Solubilization of particulate proteins and non electrolites by chaotropic agents. PROC. NATL. ACAD. SCIENCES 62:1129
- 41.-Hiipakka, R.A. y Hammerstedt, R.O. (1978) 2-Deoxiglucose transport and phosphorylation by bovine sperm. BIOL. REPROD. 19 : 368-379.
- 42.-Hilcher, B. y Hilscher, W. (1979) Kinetics of the enzymatic activity and its relation to cellular interactions in the testis of the Wistar rat. ANDROLOGIA,11: 169-181.
- 43.-Hooker, C.W. (1970) The testis I. editado por Johnson A. Gomes W.R. y Van Dermark N.L.Academic Press London: 483.
- 44.-Huang, S-M y Nordlie, R.C.(1972) Liver microsomal glucose-6-phosphatase: protection by inhibitors and substrate against thermal inactivation. PROC.SOC.EXP.BIOL.MED.: 140 : 269-272.
- 45.-Hue,L. (1981)The role of futile cycles in the regulation of carbohydrate metabolism in liver ADV.ENZYMOL. 52: 247-331.
- 46.-Jacquot,R.L. y Felix, J.M. (1977), Multihormonal control of glucose-6-phosphatase activity in rat fetal liver,in: Hormonal receptor in digestive tract physiology (S.Bonfils,ed.),north-holland, Amterdan 198.
- 47.-Jakobsson,S.V. y Dallner,G. (1968) Nature of the increase in liver microsomal glucose-6-phosphatase activity during the early stages of alloxan-induced diabetes. BIOCHIM. BIOPHYS.ACT. 165: 380-392.
- 48.-Johnson,W.T.; Colilla,W. y Nordlie,R.C. (1974) Differential effects of Mg^{++} on varius hydrolitic and synthetic activities of multifunctional glucose-6-phosphatase. ARCH.BIOCHEM. BIOPHYS. 163: 297-305.

- 49.-Johnson,W.T. y Nordlie,R.C.(1977) Diferential effects of Cu^{+} on carbamyl phosphate:glucose phosphate. BIOCHEMISTRY 16 : 2458-2466.
- 50.-Jutte,N.H.P.; Grootegoed, J.A.; Rommerts,E.F.G.y van der Molen H.J. (1981) Exogenous lactate is essential for metabolic activities in isolated rat spermatocytes. J. REPROD. FERT. 62 : 399-405.
- 51.-Kanai,K. Asada-Kabota,M. Kanamura,S. (1981) Ultrastructural localization of glucose-6-phosphataseactivity in the cells of the epididymis of the mouse. EXPERIENTIA. 37 : 509-511.
- 52.-Katz,J. y Rognstand R.(1976)Futile cycles in the metabolism of glucose. CURR.TOP.CELL.REGUL. 10: 237-289.
- 53.-Katz, J. y McGarry, J.D. (1984) The Glucose Paradox (Is glucose a substrate for liver metabolism?). AME.SOC. CLIN. INVES. 74 : 1901-1909.
- 54.-Korman M. (1967) J.REPROD 14 : 427.
- 55.-Lacy,D. (1960) Light and electron microscopy and its use in the study of factor influencing spermatogenesis in the rat. J. MICROSC.SOC. 79: 209.
- 56.-Leblond, C.P. y Clermont, Y. (1952) Sprmiogenesis of rat mouse, hamnter and ginea pig as revealed by the peryodic acid fuchshin sulfurous acid technique. J.ANAT. 90 (2) : 1167-1215.
- 57.-Lehninger,A.(1978)The biosintesis of carbohydrates. BIO-CHEMISTRY Cap.23 Wort Publishers N.Y.pp 623-628.
- 58.-Longo,J.F.; George,K. y Wener, W.F.(1987). J. CELL BIOL. 105 : 1105-1120.
- 59.-Lueck,J.D. y Nordlie, R.C.(1970) Carbamyl phosphate:Glucose phosphotransferase activity of hepatic microsomal glucose - 6 - phosphatase at physiological pH. BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMUN. 39 : 190-196.
- 60.-Lueck, J.D.; Herrman,J.L. y Nordlie,R.C.(1972) The general kinetic mechanism of microsomal carbamyl-phosphate: glucose phosphotransferase, glucose-6-phosphatase and other associated activities BIOCHEMISTRY. 11 :2792-2799.
- 61.-Mancini,R.E.; Penhos,J.C.;Izquierdo,I.A. y Heinrich J.J. (1960) Effects of acute hypoglycemia on rat testis. PROC. SOC. EXP. BIOL. MED. 104 : 699-702

- 62.-Means, A.R. y Hall, P.F. (1968a) Protein biosynthesis in the testis: II. Role of adenosine triphosphate (ATP) in stimulation by glucose. *ENDOCRINOLOGY*. **83**: 86-96
- 63.-Means, A.R. y Hall, P.F. (1968b) Protein biosynthesis in the testis: I. Comparison between stimulation by FSH and glucose: *ENDOCRINOLOGY*. **82** : 597-602.
- 64.-Martínez, A.A.M. (1993) Catepsina B y diferenciación del epitelio germinal testicular (Tesis licenciatura) ENEP. Iztacala : 84
- 65.-Mc Namee, M.C. (1989) Isolation and characterization of cell membrane techniques, part 1 *BIOTECNIQUES* **7** (5): 466-475.
- 66.-Meistrich, M.L.; Tronsle, P.K.; Frapart, M. y Erickson. (1977) Biosynthesis and localization of lactate Dehydrogenase X in pachytene spermatocyte and spermatids of mouse testis. *DEV. BIOL.* **60** : 428-441.
- 67.-Mills, N.C. y Means, A.R. (1972) Sorbitol dehydrogenase of rat testis: change of activity during development after hypophysectomy and following gonadotropic hormone administration. *ENDOCRINOLOGY*. **91** : 147.
- 68.-Mita, M. y Hall, P.F. (1982) Metabolism of round spermatids from rats: Lactate as the preferred substrate. *BIOL. REPROD.* **26** : 445-456.
- 69.-Nakamura, M. y Hall, P.F. (1976) Inhibition by 5-thio D-glucopyranose of protein biosynthesis in vitro in spermatids from rat testis. *BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA.* **447**: 474-483.
- 70.-Nakamura, M. y Hall, P.F. (1977) Effect of 5-thio-D-glucose on protein synthesis in vitro by various types of cell from rat testes. *J. REPROD. FERT.* **49** 395-397.
- 71.-Nakamura, M.; Romrell, L.J. & Hall, P.F. (1978) The effects of temperature and glucose on protein biosynthesis by immature (round) spermatids from rat testes. *J. CELL. BIOL.* **79** : 1-9.
- 72.-Nakamura, M; Hino, A.; Yasumasu, I, y kato, J. (1981). Stimulation of protein synthesis in round spermatids from rat testis. *J. BIOCHEM.* **89** : 1309-1315.
- 73.-Nakamura, M.; Okinaga, S. y Arai, K. (1984) Metabolism of round spermatids evidence that lactate is preferred substrate. *AM. J. PHYSIOL.* **247**: E234-E242.

- 74.-Nakamura, M.; Okinaga, S. y Arai, K. (1986) Studies of metabolism of raund spermatids: glucose as unfavorable substrate. BIOL. REPROD. 35 :927-935.
- 75.-Nordlie, R.C.; Arion, W.J.; Hanson, T.L.; Gilsdorf, J.R. Horne, R.N. (1968) Biological regulation of liver microsomal inorganic pyrophosphatase-glucose, glucose-6-phosphatase, and inorganic pyrophosphatase. J. BIOL. CHEM 243 (6): 1140-1146.
- 75.-Nordlie, R.C. (1970) Some properties and possible physiological function of phosphotransferase activities of microsomal glucose-6-phosphatase. ANN. N.Y. ACADEMIC. SCI. 166 694-718.
- 76.-Nordlie, R.C. (1979) Multifunctional glucose-6-phosphatase: Cellular biology. LIFE. SCI. 24: 2397-2404.
- 77.-Nordlie, R.C. y Sukalski, K.A. (1985) The enzymes of biological membrane A.N. Martonos; (ed) vol 2 Biosynthesis and metabolism. Plenum Press. pp 349-398
- 78.-Panse, G.T.; Jayarama S. y Sheth, A.R. (1983) Shift of glycolysis as marker of sperm maturation. ARCHIV OF ANDROL. 11: 137-140.
- 79.-Reczeck, P.R. y Ville, C.A. Jr. (1982) A purification of microsomal glucose-6-phosphatase from human tissue. BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMUN. 107 : 1158-1165.
- 80.-Schulze, H. V.; Kannler, R. y Junker, B. (1985) Latency studies on rat liver microsomal glucose-6-phosphate. Correlation of membrane modification and solubilization by triton X-114 with the enzymatic activity. BIOCHIM. BIOPHYS ACT. 814 : 85-95.
- 81.-Setchell, B.P. (1970) The testis. Editado por Jhonson, Gomes W.R. y Van Demark N.L. Academic Press London 483.
- 82.-Seni, R.; Gandhi, B.S. (1981) Hormonal effects of glucose-6-phosphatase in the liver and kidney of rats of different ages. INDIAN J. BIOCHEM. BIOPHYS. 18 : 291-294
- 83.-Sing, H.J.; Nordlie, R.C. y Jorgenson, R.P. (1981) Vanadate: A potent inhibitor of multifunctional glucose-6-phosphatase. BIOCHIM BIOPHYS ACTA. 678 : 477-482.
- 84.-Speth, M. y Schulze, H.U. (1981) Hormone-induced effects on the rat liver microsomal glucose-6-phosphatase system in vitro. BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMUN. 99:134-141.

- 85.-Stadman E.R.(1966) Allosteric regulation of enzyme activity. ADV. ENZYMOL 28 : 42-154
- 86.-Stetten,M.R.(1964a)Metabolism of inorganic pyrophosphate I Microsomal inorganic pyrophosphate phosphotransferase of rat liver.J.BIOL CHEM. 239 (10): 3576-3583
- 87.-Stetten, M.R. (1964b) Metabolism of inorganic phosphate. II The probable identy of microsomal inorganic pyrophosphatase,pyrophosphate phosphotranferase and Glucose-6-phosphatase.J.BIOL.CHEM.239 (12): 4041-4046.
- 88.-Stetten,M.R.(1964c) Metabolism of inorganic pyrophosphate III Acceptor specificity studies with rat liver pyrophosphate phosphotransferase activity.J. BIOL.CHEM. 240 (5): 2248-2253.
- 89.-Thorne-Tjomsland,G.;Clermont,Y. y Tang,X. (1991)Glucose-6- phosphatase activity ofedoplasmic reticulum and golgi apparatus in spermatocytes and spermatids of rat: an electron microscopic cytochemical study.BIOL. CELL. 71: 33-41.
- 90.-Vakili,B. y Banner,M.(1981) The effects of N-alkilmaleimides on the activity of rat liver glucose-6-phosphatase. BIOCHEM.J. 194 : 319-325.
- 91.-Van Belle, H. (1972) Kinetics and inhibition of alkaline phosphatases from canine tissues. BIOCHIM BIOPHYS ACTA. 289:158.
- 92.-Vanha-Pertula,T.C.(1970)Chromatografic fraction and characterization of rat testicular acid phosphatase. BIOCHIM. BIOPHYS.ACT. 227 : 390-401.
- 93.-Veech, R.L.; Cook,G.A. y King,M.T.(1980) Relationship of free cytoplasmic pyrophosphate to liver glucose content and total pyrophosphate to cytoplasmic phosphorylation potential. FEBS LETT. 11: k65-k72.
- 94.-Vera, C.J.;Brito,M. y Burzio,O.C. (1987) Biosynthesis of rat sperm outer dence fibers during spermiogenesis in vivo incorporation of (³H) leucine in to the fibrillar complex. BIOL. REPROD. 36 : 193-202.
- 95.-Vernon,R.E.;Go V.L.W. y Fritz,I.B.(1971) Sudies on spermatogenesis in rats.II evidence that carnitine acetiltransferace is a marker enzyme for investigation of germ cell diferentiation. CAN.J. BIOCHEM.49: 761

- 96.-Vorhaben, J.E. & Campbell, J.W. (1979) Subcellular localization of glucose-6-phosphatase in animal tissues. COMP. BIOCHEM. PHYSIOL. 62B: 85-87.
- 97.-Waddell, D.; Gibb, L. y Burchell, A. (1990) Calcium activates G6Pase in intact rat hepatic microsomes. BIOCHEM. J. 267 : 549-551.
- 98.-Werve, C.V. (1989) Liver glucose-6-phosphatase activity is modulated by physiological intracellular Ca^{++} concentrations. J. BIOL. CHEM. 264 (11):6033-6036.
- 99.-Web, J.L. (1966) Enzyme and metabolic inhibitors. Academic Press N.Y. II : 635.
- 100.-Yamaguchi, M. y Momose, K. (1983) Calmodulin dependency of calcitonin action on glucose 6-phosphatase and phosphohidrolase activities. ACTA ENDOCRINOL. 104:490-494.
- 101.-Zakim, D. (1970) Regulation of microsomal enzymes by phospholipids. J. BIOL. CHEM. 245 (19):4953-4961
- 102.-Zakim, D. & Dannenberg, A. (1990) Thermal stability of microsomal glucose 6 phosphatase. J. BIOL. CHEM. 265(1): 201-208.
- 103.-Zoccoli, M.A.; Hoopes, R.R. & Karnovsky, M.L. (1982) Rat liver microsomal glucose-6-P translocase. Effect of physiological status on inhibition and labelling by stilbene disulfonic acid derivatives. J. BIOL. CHEM. 257 : 11296-11300.
- 104.-Zysk, J.R.; Bushway, A.A.; Whistler, R.L. y Carlto W. W. (1975) Temporary sterility produced on mice by 5-thio-D-glucose. J. REPROD. FERT. 45 69-72.