



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES**

**" I Z T A C A L A "**

**"CARACTERIZACION DE LA ACTIVIDAD DE LA  
 $\text{Ca}^{2+}$ -ATP<sub>asa</sub> DE ESPERMATOCITOS PRIMARIOS Y  
ESPERMATIDES MEDIANTE EL USO DE  
INHIBIDORES"**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:**

**B I O L O G O**

**P R E S E N T A :**

**SERGIO ENRIQUE NAJERA ESQUIVEL**



**LOS REYES IZTACALA, EDO. DE MEX.**

**1995**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

**ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES  
IZTACALA**

**"CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA Ca<sup>2+</sup>-ATPasa DE  
ESPERMATOCITOS PRIMARIOS Y ESPERMÁTIDES MEDIANTE EL USO DE  
INHIBIDORES."**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
B I Ó L O G O

P R E S E N T A :  
SERGIO ENRIQUE NAJERA ESQUIVEL

LOS REYES IZTACALA , EDO DE MEX.

1995

"Vuestro corazón conoce en silencio los secretos de los días y las noches. Pero vuestros oídos ansían el sonido del conocimiento de vuestro corazón. Querríais saber en palabras lo que siempre habéis sabido en pensamiento. Querríais palpar con vuestros dedos el desnudo cuerpo de vuestros oídos. Y está bien, que así sea: El recóndito manantial de vuestra alma necesita brotar y correr murmurando hacia el mar."

Gibran Jalil Gibran

A mis padres  
A mi hermana  
A toda mi familia  
A mi Creador  
A mis amigos.

¿Qué más puedo pedir?

El presente trabajo fue realizado en la Unidad de Investigación Clínica en Enfermedades Oncológicas del Centro Nacional Siglo XXI, bajo el asesoramiento de la M. en C. Raquel Trejo Albarrán

## **AGRADECIMIENTOS**

A todas aquellas personas que contribuyeron a la realización de este trabajo mediante la donación de reactivos, en especial al Dr. Luis Benítez Bibriesca, Jefe de la Unidad de Investigación Clínica en Enfermedades Oncológicas del Centro Médico Nacional siglo XXI del IMSS.

Al Lic. Ismael Herrera Arias, Director del Colegio de Ciencias y Humanidades, plantel Azcapotzalco, por las facilidades prestadas para la encuadernación del manuscrito final.

## RESÚMEN

En este trabajo se estudiaron las características de la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa de la fracción microsomal de testículo de rata a 15 y 38 días de edad, encontrando varios factores que son similares a los que se presentan en otros modelos celulares. Aquellas características que se encuentran en general dentro de la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa es de que se activa a concentraciones  $\mu\text{M}$  de  $\text{Ca}^{2+}$ , presenta una curva de actividad bifásica por la adición de diferentes concentraciones de ATP, se observa que es activada por Calmodulina, su actividad es inhibida por Lantano. Sin embargo, esta actividad de  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa mostró diferencias a otros modelos con lo que respecto a su sensibilidad a vanadato, lantano y N-Etilmaleimida consideradas como herramientas para la caracterización de este sistema enzimático. Lo que nos indica que existe dentro de la actividad de las  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasas, diferencias que pueden estar relacionadas con la función que desempeñan los tipos celulares empleados. Por otro lado, se observaron algunas diferencias entre la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa de 15 y la de 38 días de edad, lo cual puede ser el reflejo de cambios en el control de  $\text{Ca}^{2+}$ , relacionados con las necesidades requeridas según el estado de desarrollo de el epitelio germinal testicular, o a la presencia de dos isoformas de la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa que se manifiestan cada una a diferente tiempo, según la maduración de las células testiculares.

## INDICE

ABREVIATURAS	1
INTRODUCCION	3
1.- Características de la $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa	4
2.- Mecanismo de reacción	6
3.- Regulación de la $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa	7
a) Complejo $\text{Ca}^{2+}$ -Calmodulina	8
b) Activación por proteólisis	8
c) Activación por lípidos ácidos	9
4.- Inhibidores de la $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa	10
I.- Iones inorgánicos	10
II.- Agentes anticalmodulina	11
III.- Compuestos que reaccionan con grupos funcionales en proteínas	12
5.- Niveles de calmodulina y actividad de la ( $\text{Ca}^{2+}$ $\text{Mg}^{2+}$ )-ATPasa	15
6.- Elementos del citoesqueleto en las células germinales y en células de Sertoli	16
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	18
OBJETIVOS	19
MATERIAL Y METODOS	20
1.- Fraccionamiento subcelular de testículo de rata	20
2.- Caracterización de las fracciones subcelulares	21
3.- Determinación de la actividad de la $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa en el epitelio germinal testicular	22
4.- Determinación de la actividad de la $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa utilizando $\text{P}^{32}$ -ATP	22
5.- Actividad de ATPasa semejante a miosina	23
6.- Purificación de calmodulina	23
7.- Efecto de calmodulina sobre la $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa	24
8.- Inhibidores de la $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa	24
vanadato	25
lantano	25
Concanavalina A	25
N-etilmaleimida	25
L-cisteína	25

## RESULTADOS

1.- Distribución subcelular de las enzimas marcadoras de organelos	26
2.- Distribución de la actividad de ATPasas	27
3.- Efecto de diferentes concentraciones de calcio libre sobre la $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa	30
4.- Efecto del Magnesio sobre la actividad de la ATPasa	30
5.- Efecto de diferentes concentraciones de ATP sobre la $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa	31
6.- Efecto del pH sobre la $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa	32
7.- Activación por calmodulina	33
8.- Efecto del vanadato sobre la $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa a dos diferentes edades	34
9.- Efecto del lantano sobre la $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa	35
10.- Efecto de L-cisteína	35
11.- Efecto de N-etilmaleimida	35
12.- Efecto de Concanavalina A sobre la $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa y la $(\text{Ca}^{2+}+\text{Mg}^{2+})\text{ATPasa}$	36
DISCUSIÓN	37
BIBLIOGRAFÍA	45
PREPARACIÓN DE SOLUCIONES	55

## ABREVIATURAS.

ADP	Difosfato de adenosina.
ATP	Trifosfato de adenosina.
Ca-CaM	Complejo calcio-calmodulina.
Ca <sup>2+</sup>	Calcio.
[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub>	Calcio libre intracitoplásmico.
Ca <sup>2+</sup> -ATPasa	ATPasa dependiente de calcio.
(Ca <sup>2+</sup> +Mg <sup>2+</sup> )-ATPasa	ATPasa dependiente de calcio-magnesio.
CaCl	Cloruro de calcio.
CaM	Calmodulina.
DAG	Diacilglicerol.
EDTA	Sal tetrasódica de ácido etilen diamino tetracético.
g	Gramo.
G6Pasa	Glucosa 6 fosfatasa.
HEPES	N-Hidroxietilpiperazina-N'2-ácido etanosulfónico.
IF <sub>3</sub>	Inositol 1,4,5 trifosfato.
K <sup>+</sup> -ATPasa	ATPasa dependiente de potasio.
KCl	Cloruro de potasio.
kDa	Kilodaltons.
K <sub>i</sub>	Constante de inhibición.
K <sub>m</sub>	Constante de Michaelis.
La <sup>3+</sup>	Lantano.
m	mili
ml	Mililitro
M	Molar.
Mg <sup>2+</sup> -ATPasa	ATPasa dependiente de magnesio.
MgCl <sub>2</sub>	Cloruro de manesio.
n	nano.
Na <sup>2+</sup> -Ca <sup>2+</sup>	Sodio-calcio..
Na <sup>2+</sup> ,K <sup>+</sup> -ATPasa	ATPasa dependiente de sodio, potasio.
NEM	N-etilmaleimida.
pH	Potencial de hidrógeno.
P <sub>i</sub>	Fosforo inorgánico.

rpm	Revoluciones por minuto.
RNA <sub>m</sub>	Ácido ribonucleico mensajero.
SDH	Succinato deshidrogenasa.
V <sub>max</sub>	Velocidad máxima.
μ	micro.

## INTRODUCCIÓN

En las células eucariontes, la concentración basal de  $\text{Ca}^{2+}$  en el citosol es de  $10^{-7}$  a  $10^{-8}$  M, si se le compara con la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en el medio extracelular, que es de  $10^{-3}$  M, por lo tanto, la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en el citoplasma es 10,000 veces menor.

La baja concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  libre de las células animales, se debe:

- a) A la escasa permeabilidad que existe en la membrana plasmática para dicho catión.
- b) A la compartimentalización del  $\text{Ca}^{2+}$  en depósitos intracelulares, como en las vesículas de retículo endoplásmico (Streb *et al.*, 1984). El calcisoma es un ejemplo de la compartimentalización en vesículas del retículo endoplásmico en músculo, el cual tiene una proteína denominada calsecustrina (Hashimoto *et al.*, 1988), responsable de la unión de  $\text{Ca}^{2+}$  dentro de la cisterna del retículo sarcoplásmico. El  $\text{Ca}^{2+}$  es transportado al interior por una  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa del mismo tipo que la observada en el retículo sarcoplásmico (Hashimoto *et al.*, 1988).
- c) A una  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa de la membrana plasmática que bombea el ion al exterior y mantiene la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracitoplásmico a niveles basales (Inesi & Scarpa, 1972; Rega & Garrahan, 1987).
- d) A la acción de aniones intracelulares que lo quelan (Cambell, 1983).

Diferentes estímulos que llegan a las células, como factores de crecimiento, hormonas y neurotransmisores, provocan un incremento en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  libre intracitoplásmico ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ), que puede disparar diversos procesos celulares como la contracción muscular, la mitosis, la exocitosis, la degradación del glucógeno y de lípidos, la despolimerización de la tubulina, etc. (revisado por Cambell, 1983 (b); Putney & Bird, 1993). Por estas razones, el ion  $\text{Ca}^{2+}$  es considerado como un importante mensajero intracelular.

El incremento en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  es típicamente bifásico, un primer aumento en la concentración de este catión se presenta por su liberación de almacenes intracelulares, disparada cuando los neurotransmisores o factores de crecimiento se unen a sus receptores, dispuestos en la superficie de la membrana plasmática. La unión de estos ligandos a su receptor induce la liberación de inositol 1,4,5 trifosfato ( $\text{IP}_3$ ) y diacilglicerol (DAG) (Putney & Bird, 1993), ya sea por la acción directa de la fosfolipasa C- $\beta$ 1 de la membrana plasmática, a través de la proteína G, o bien, por la translocación de la fosfolipasa C- $\gamma$ 1 a la membrana plasmática, después de la

fosforilación de los residuos de tirosina de la porción citoplasmática de los receptores que responden a factores de crecimiento.

Los almacenes intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  poseen receptores a IF3 (Putney & Bird, 1993), que al ser ocupados disparan la apertura de canales membranales que permiten la salida de  $\text{Ca}^{2+}$ . Este incremento de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  es transitorio y se ha propuesto que cuando se han agotado las reservas intracelulares se induce la segunda fase del aumento en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , a través de la apertura de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  de la membrana plasmática, que permiten la entrada desde el medio extracelular y eleva la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  en una forma más sostenida. Este segundo incremento es motivo de varios estudios, pues al parecer, existe un mensajero que se localiza en el interior de los almacenes intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$ , y al momento de comenzar a agotarse la cantidad de  $\text{Ca}^{2+}$  almacenada, este nuevo mensajero es liberado al citosol para viajar a la membrana plasmática, en donde permitirá la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  del medio extracelular (Putney & Bird, 1993).

Después del incremento en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  libre por el estímulo recibido, la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  disminuye a los niveles basales por medio de la participación de diferentes mecanismos, los cuales, pueden estar acoplados directa o indirectamente a la hidrólisis del ATP. Los intercambiadores  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Ca}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$ , a nivel de la membrana plasmática, dependen del gradiente de  $\text{Na}^+$  creado por la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa, debido a esto, se considera que dependen indirectamente de la hidrólisis de ATP (Baker, 1978). El intercambiador  $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$  que se encuentra presente en la mitocondria utiliza la energía derivada del gradiente de  $\text{H}^+$  generado por el transporte de electrones de la cadena respiratoria, o bien, generado por la hidrólisis de ATP por la ATPasa mitocondrial (Nichols, 1981). Por lo tanto, estos tres sistemas utilizan la hidrólisis de ATP en forma indirecta.

El transporte de  $\text{Ca}^{2+}$ , que depende directamente de la hidrólisis del ATP, lo realizan dos ATPasas: la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa del retículo endo(sarco)plásmico, encargada de transportar a  $\text{Ca}^{2+}$  hacia el interior de ese organelo, y la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa de la membrana plasmática, la cual, transporta a ese ión hacia afuera de la célula (Carafoli, 1992).

#### **Características de la $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa de la membrana plasmática.**

Dadas las características de la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa de membrana plasmática, que se encuentra dentro de las ATPasas de tipo "P" (Pedersen & Carafoli, 1987), resulta ser el principal mecanismo responsable de mantener una diferente concentración celular de  $\text{Ca}^{2+}$  con respecto al medio extracelular. Las ATPasas de la clase "P" se

caracterizan por involucrar, como parte de su ciclo de reacción, a un intermediario fosforilado, el que aparece cuando el  $\gamma$ -fosfato del ATP reacciona con un sólo residuo de ácido aspártico, que se encuentra en el sitio de fosforilación de la ATPasa (Nishigaki, et al, 1974). Entre estas ATPasas se encuentra incluida la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa, la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa y la  $\text{H}^+$ -ATPasa de la membrana plasmática de células eucariontes además de la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa de retículo endoplásmico y sarcoplásmico (Pedersen & Carafoli, 1987).

La actividad de la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa de la membrana plasmática fue observada por primera vez en eritrocitos por Dunham y Glynn en 1961; cinco años más tarde, Schatzmann demostró la relación que existe entre el consumo de ATP y el eflujo de  $\text{Ca}^{2+}$  en los fantasmas de eritrocitos, con lo que se logró entender la relación que tiene la actividad de la ATPasa y el transporte de este ión. A partir de estas observaciones, se inicia una intensa actividad científica sobre dicho tema, del cual se han obtenido valiosas revisiones (Sarkadi et al, 1980, Carafoli, 1992).

Las propiedades generales de la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa de la membrana plasmática son las siguientes (Carafoli 1992):

- 1.- Se encuentran distribuidas en todas las células eucariontes
- 2.- Tienen un peso molecular cercano a los 134,000 daltons.
- 3.- El ciclo catalítico incluye la formación de un intermediario fosforilado cuando el  $\gamma$ -fosfato del ATP se une a un residuo específico de ácido aspártico.
- 4.- Es inhibida por vanadato ( $K_i$  cercana a  $3 \mu\text{M}$ ) y con Lantano ( $K_i$  cercana a  $1 \mu\text{M}$ ).
- 5.- Presenta dos sitios para ATP, un sitio de alta afinidad con una  $K_m$  de  $1 - 2.5 \mu\text{M}$ , y otro sitio de baja afinidad, con una  $K_m$  de  $145-180 \mu\text{M}$ . La respuesta para ATP de la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa de la membrana plasmática puede ser descrita por la suma de dos ecuaciones de Michaelis-Menten:

$$v = \frac{V_1[\text{ATP}]}{K_{m1} + [\text{ATP}]} + \frac{V_2[\text{ATP}]}{K_{m2} + [\text{ATP}]}$$

La primera (señalada por el símbolo 1) tiene una alta afinidad para ATP pero una baja velocidad máxima ( $K_{m1} = 1-2.5 \mu\text{M}$ ,  $V_1 \approx 25\%$  de  $V_{\text{max}}$ ) mientras que la segunda tiene una aparente baja afinidad para ATP y una elevada velocidad máxima ( $K_{m2} = 145-180 \mu\text{M}$ ,  $V_2 \approx 75\%$  de  $V_{\text{max}}$ ).

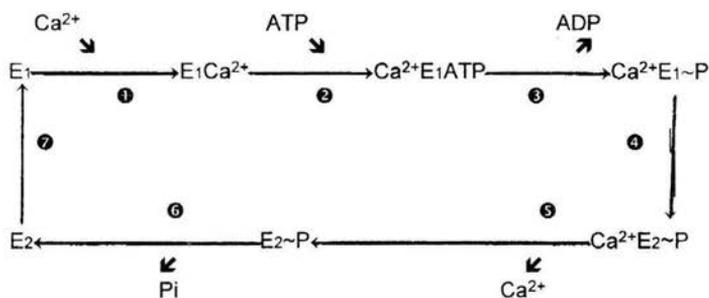
- 6.- Afinidad para  $\text{Ca}^{2+}$  con una  $K_m > 10 \mu\text{M}$  en un estado de reposo y  $< 0.5 \mu\text{M}$  en el estado activo óptimo .

- 7.- La calmodulina es un importante activador de esta enzima con una  $K_m$  de aproximadamente 1 nM. Los ácidos grasos polinsaturados, los fosfolípidos ácidos y la fosforilación mediada por cinasa son también activadores, en por lo menos una isoforma.
- 8.- Por último, la estequiometría entre  $Ca^{2+}/ATP$  de las membranas reportadas se encuentra en el rango de 0.86 a 2.1 (Schatzmann, 1973; Quist & Rafougalis, 1975; Sarkadi et al, 1977; Quist & Rafougalis, 1977, Larsen et al, 1978).

### Mecanismo de reacción

La  $Ca^{2+}$ -ATPasa se encarga del transporte de dicho catión a través de la membrana plasmática, por medio de la hidrólisis de ATP; esto se produce mediante una serie de reacciones en las que se presenta la fosforilación y defosforilación de la enzima, las cuales se muestran en el siguiente esquema (Rega y Garrahan, 1986).

#### INTERIOR



#### EXTERIOR

#### ESQUEMA 1

- 1.- La enzima se presenta en dos estadios conformacionales  $E_1$  y  $E_2$ .
- 2.- La actividad enzimática de  $E_1$  es expresada unicamente en presencia de niveles micromolares de  $Ca^{2+}$  libre (reacción 1).
- 3.-  $E_1$  posee un sitio catalítico de alta afinidad para  $ATP$ , por lo que son necesarias concentraciones micromolares de este sustrato para realizar la fosforilación de la enzima a concentraciones micromolares de  $Ca^{2+}$  (reacción 2). La hidrólisis de  $ATP$  se realiza en la reacción 3 pero la liberación del  $P_i$  se presenta hasta la reacción 6.

- 4.- E1 cataliza la transfosforilación entre la enzima y ATP (reacción 3).
- 5.- La reacción 4 muestra un cambio conformacional de la enzima, que según Luterbacher & Schetzmann (1983) requiere de  $Mg^{2+}$  para que realice su mayor actividad (reacción 4). Algunos autores (Adamo et al., 1988), demostraron que  $Mg^{2+}$  incrementa la velocidad de la fosforilación de la  $Ca^{2+}$ -ATPasa en eritrocitos humanos. Es en el complejo  $Ca^{2+}E_1-P$  en donde el inhibidor  $La^{3+}$  puede actuar al impedir que el ciclo catalítico se continúe a la defosforilación de la enzima y por lo tanto se produce un incremento en la cantidad del intermediario fosforilado (Luterbacher & Schetzmann, 1983).
- 6.- La actividad catalítica de E2 ya no requiere de  $Ca^{2+}$ , por lo que este es liberado al medio extracelular (reacción 5). Además, el ATP unido a su sitio de baja afinidad puede activar a la enzima. Cuando se da el cambio de  $Ca^{2+}E_1-P$  a  $Ca^{2+}E_2-P$  la enzima modifica su afinidad por  $Ca^{2+}$ ; el sitio que antes era de alta afinidad, debido al cambio conformacional de la enzima, se modifica y puede entonces liberar al  $Ca^{2+}$  al lado externo de la membrana plasmática.
- 7.- Se produce la defosforilación de la enzima, la cual es incrementada por altas concentraciones de ATP (mayores a  $100 \mu M$ ), posiblemente en la forma de MgATP (a  $37^\circ C$  y en presencia de calmodulina) (reacción 6).
- 8.- La transición de E2 a E1 puede ser acelerada por ATP unido a su sitio de baja afinidad (reacción 7). Adamo et al, (1990) descubrieron que  $Mg^{2+}$  aumenta la velocidad de la conversión de E2 a E1 en la reacción 7 en más de 10 veces. Por otro lado, se reconoce que  $Mg^{2+}$ , cuando se encuentra presente en la fosforilación, acelera dicha reacción (Rega, 1986).

#### **Regulación de la $Ca^{2+}$ -ATPasa de la membrana plasmática.**

La velocidad máxima de la  $Ca^{2+}$ -ATPasa puede ser regulada por tres mecanismos independientes:

- A. Complejo calcio-calmodulina.
- B. Proteólisis controlada.
- C. Composición de lípidos en la membrana.

### **A. Complejo calcio-calmodulina.**

La calmodulina es una proteína citosólica capaz de unir con alta afinidad y especificidad a calcio. Su acción estimulante sobre la actividad de la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa fue observada por primera vez por Bond y Clough, en 1973, y confirmada por Gopinath y Vincenzi en 1977; además, Jarrett y Penniston en el mismo año reportaron que el hemolizado obtenido de eritrocitos era capaz de estimular la hidrólisis de ATP dependiente de calcio, en los fantasmas de eritrocitos. La semejanza de este activador citosólico de la ATPasa y del activador de la fosfodiesterasa fue establecida posteriormente y Cheung, en 1980, decidió llamarla calmodulina.

La calmodulina incrementa tanto la afinidad por  $\text{Ca}^{2+}$  como la velocidad máxima de la hidrólisis del ATP y el transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  al medio extracelular. Se sabe que la unión de calmodulina con la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa es absolutamente dependiente de calcio en una relación molar 1:1 (Rega & Garrahan, 1986 [b]). Además, algunos autores demostraron que la calmodulina actúa sobre la interacción de ATP en el sitio de baja afinidad de la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa y que la calmodulina afecta a  $V_2$  y no a  $K_m$  (Cardie et al, 1990).

Se ha demostrado que el efecto estimulador de la calmodulina sobre la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa puede verse afectado por la acción de tripsina o quimiotripsina, los cuales, al fragmentar a la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa, llegan a eliminar la unión de calmodulina a la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa e incluso al transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  (ver más adelante).

Además de su participación directa, la calmodulina es capaz de actuar indirectamente. Es conocida que la actividad de la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa de sarcolema (membrana plasmática de corazón) se activa por la fosforilación a través de una cinasa dependiente de AMPc y regresa a su nivel basal de actividad cuando se defosforila. Si consideramos que la calmodulina participa en la regulación de los niveles de AMPc, tanto para activar a la fosfodiesterasa como a la adenilato ciclasa, podría regular la actividad de la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa por medio de la estimulación de la cinasa que fosforila a la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa. Por otra parte, se sabe que la defosforilación de proteínas puede ser catalizada también por una clase de fosfatasa dependientes del complejo  $\text{Ca}^{2+}$ -Calmodulina (Tada et al, 1975; Brostrom et al, 1977).

### **B. Activación por proteólisis.**

Una segunda forma de estimular la hidrólisis de ATP y el transporte de calcio, es por medio de una proteólisis controlada. Taverna y Hanahan (1980), mostraron que la adición de tripsina o quimiotripsina incrementa la actividad de la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa de la membrana de los eritrocitos. Sarkadi et al, (1980) utilizaron vesículas

invertidas de membrana de eritrocitos y demostraron que la tripsinización producía el efecto de calmodulina, incrementando el transporte de calcio y la hidrólisis de ATP.

La  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa es un péptido de 138 kDa, que por acción de la tripsina, da origen a dos péptidos, uno de 90 kDa y otro de 40 kDa. El polipéptido de 90 kDa retiene su capacidad para unir calmodulina y además bombear a calcio. Si la hidrólisis se continúa en presencia de  $\text{Mg}^{2+}$  y vanadato, se obtiene un péptido de 81 kDa que es incapaz de unirse a calmodulina, presentando una elevada actividad del transporte de calcio e hidrólisis de ATP. Si el fragmento de 90 kDa se hidroliza en presencia de calcio y calmodulina, se obtiene un péptido de 85 kDa, el cual es todavía capaz de unirse a calmodulina con disminución en la actividad de transporte de calcio y de hidrólisis de ATP (Zurini *et al.*, 1984; Benaim *et al.*, 1966).

Se ha sugerido que el fragmento de 9 kDa que se libera por la proteólisis del péptido de 90 kDa (en presencia de  $\text{Mg}^{2+}$  y vanadato), contiene una secuencia de aminoácidos, esenciales para la interacción de la enzima con la calmodulina y para la expresión completa de la actividad hidrolítica de ATP y de transporte de calcio. Dentro de este fragmento de 9 kDa se sugiere se encuentre un fragmento inhibitorio de 4 kDa, que después de eliminarse libera la actividad de la ATPasa y del transporte de calcio.

### **C. Activación por lípidos ácidos.**

La  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa es una proteína integral de membrana que se encuentra estrechamente relacionada con un anillo de fosfolípidos, los cuales son esenciales para su función. Un ataque enzimático con fosfolipasas, libera a los fosfolípidos de la membrana plasmática, sin producir daños irreversibles en la actividad de la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa, ya que esta puede ser recuperada por la adición de lípidos (Richards *et al.*, 1977; Roelofsen & Schetzmann, 1977; Ronner & Gazzotti, 1977). Preparaciones con la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa reconstituida en liposomas con una composición controlada de lípidos, ha llevado a la conclusión de que la integridad estructural y funcional de la enzima no tiene requerimientos específicos de lípidos membranales. Sin embargo, para que se presente el efecto activador de la calmodulina, existe una gran dependencia de las propiedades fisicoquímicas de los lípidos que componen la membrana o el liposoma. La completa sensibilidad a calmodulina fue observada cuando la enzima se reconstituyó con fosfolípidos neutros como fosfatidil colina (Niggli *et al.*, 1981; Carafoli & Zurini, 1982), mientras que, cuando la enzima es reconstituida con fosfolípidos ácidos, como la fosfatidil serina, o ácidos grasos polinsaturados, la actividad de la ATPasa se incrementa a los niveles observados

por la estimulación con calmodulina; bajo estas condiciones, la presencia de calmodulina no produce un aumento adicional de la actividad enzimática (Roelofsen & Schetzmann, 1977; Niggli *et al.* 1981; Carafoli & Zurini, 1982).

El efecto estimulante de la calmodulina sobre la ATPasa se pierde en la presencia de lípidos ácidos, más no la unión de calmodulina con la enzima, ya que la ATPasa, estabilizada con fosfatidil serina, sí logra ser retenida en una columna de Sefarosa-Calmodulina, con la misma eficiencia que cuando es estabilizada con fosfatidil colina (Niggli *et al.*, 1979).

### **Inhibidores de la Ca<sup>2+</sup>-ATPasa**

Son varias las sustancias conocidas como inhibidores de las diferentes ATPasas, pero, a pesar de ello, no se conoce ningún inhibidor específico para la bomba de calcio. La importancia que representa el estudio del efecto de diversos agentes inhibidores sobre la actividad de la Ca<sup>2+</sup>-ATPasa, es la información que genera sobre los mecanismos del transporte de este catión a través de la membrana plasmática. Considerando los factores que intervienen en la actividad de la ATPasa, se ha estudiado el efecto de (Garrahan, 1986):

- I) Iones inorgánicos.
- II) Agentes anticalmodulina.
- III) Componentes que reaccionan con grupos funcionales de proteínas.
- IV) Otros compuestos.

#### **I) Iones inorgánicos.**

##### **a) Lantano.**

Gran parte del conocimiento que se tiene sobre el efecto del lantano sobre la bomba de calcio, se debe a los estudios hechos en eritrocitos (Quist & Roufoalis, 1975; Sarkadi *et al.*, 1977; Szasz *et al.*, 1978), además de los trabajos que se han efectuado en ATPasas de la membrana de vesículas sinápticas (Sorensen & Malher, 1981; Michaelis *et al.*, 1983), de adipocitos (deSmedt *et al.*, 1982) y de membrana plasmática de células renales (Pershadising & McDonald, 1980).

El mecanismo de inhibición del lantano a nivel de los procesos elementales de la reacción de la ATPasa, se ha descrito por Luterbacher y Schatzmann (1983), quienes demostraron que el lantano incrementa el nivel máximo de la fosfoenzima, es decir, el efecto inhibitorio del lantano se debe a que evita la transición de E<sub>1</sub>~P ⇌ E<sub>2</sub>~P, el cual es dependiente de Mg<sup>2+</sup> en la fosfoenzima. (reacción 4 del

esquema 1). Sobre el efecto de otros lantánidos, que no sea  $\text{La}^{3+}$ , es poco lo que se conoce, Holmio (Ho) y Praseodimio (Pr) inhiben a la ATPasa dependiente de calcio y el transporte activo de dicho catión en eritrocitos humanos (Schatzmann, 1971).

#### **b) Vanadato.**

El vanadato es uno de los inhibidores más comunmente usados para la bomba de calcio de la membrana plasmática debido a que disminuye la actividad de la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa y el transporte activo de  $\text{Ca}^{2+}$ , tanto en preparaciones purificadas de membrana de eritrocitos humanos (Barrabin *et al.*, 1980; Bond & Hudings, 1980) como en el axón de calamar (DiPolo & Beaugé, 1981). La eficiencia del vanadato como inhibidor, depende fuertemente del medio iónico en que se encuentre, así como de la concentración de ATP (Barrabin *et al.*, 1980). Esto se debe de tomar en cuenta al momento de estudiar la sensibilidad de una preparación membranal al vanadato. Dicho inhibidor no es eficiente cuando no se adiciona  $\text{Mg}^{2+}$ , el cual junto con el potasio, incrementa el efecto inhibitor del vanadato. (Barrabin *et al.*, 1980).

#### **II) Agentes anticalmodulina.**

Debido a que el transporte de calcio a través de la membrana plasmática no es completamente dependiente de calmodulina, las drogas que bloquean el efecto de calmodulina son inhibidores parciales de la actividad de la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa. Los antagonistas de calmodulina fueron descritos por Weiss y Levin en el año de 1978, quienes estudiaron el efecto de diferentes antiscicóticos, como las fenotiazinas, sobre la actividad de enzimas estimuladas por  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM, estos componentes bloquearon la actividad de la fosfodiesterasa dependiente de calcio, debido a que las fenotiazinas interaccionan con alta afinidad sobre el complejo  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM (y no cuando se encuentra la calmodulina libre), impidiendo la interacción con la enzima. Son ya varias las sustancias que se han identificado como antagonistas de la calmodulina; la lista realizada por Roufogalis (1982) menciona a los siguientes agentes anticalmodulina:

- 1.- Antiscicóticos como fenotiazinas, butofenonas, difenilbutaminas y un grupo heterogéneo de compuestos que incluyen a la clozapina y a la sulpirida.
- 2.- Antidepresivos como amitriptilina, desipramina e imipramina.
- 3.- Relajantes musculares como naftalensulfonamidas (W7, W13).
- 4.- Tranquilizantes menores, como diazepam y clordiazepóxido.
- 5.- Anestésicos locales como dibucaína tetracaína y lidocaína.
- 6.- Derivados de antimicóticos obtenidos de *Vinca* como vinblastina y vincristina.

- 7.- Alcaloides derivados de *Rauwolfia*.
- 8.- Opiáceos endógenos, como las endorfinas.
- 9.- Calmidazolio (conocido como compuesto R24571), derivado del antimicótico miconazol.
- 10- Compuesto 48/80, que es usado como relajador de histamina.

Las fenotiazinas (en particular la trifluoroperzina) son los antagonistas de calmodulina más comunmente usados, aunque el compuesto 48/80 y el calmidazolio parecen ser los más potentes. La trifluoroperazina puede producir efecto inhibitorio de la actividad de la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa aún en la ausencia de calmodulina (Luthra, 1982; Vincenzi *et al.*, 1982); por su naturaleza hidrofóbica, además, las drogas anticalmodulina pueden actuar directamente sobre la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa, disminuyendo su actividad, aunque ésta fuera incrementada por proteólisis o por la presencia de lípidos ácidos (Adunyah *et al.*, 1982).

El calmidazolio y el compuesto 48/80 son los inhibidores más selectivos (Luthra, 1982; Vincenzi *et al.*, 1982), puesto que su acción sobre otras ATPasas de la membrana plasmática o sobre el efecto de estimulación producidos por lípidos ácidos o por proteólisis, a la bomba de  $\text{Ca}^{2+}$ , se considera ausente o de una participación muy baja.

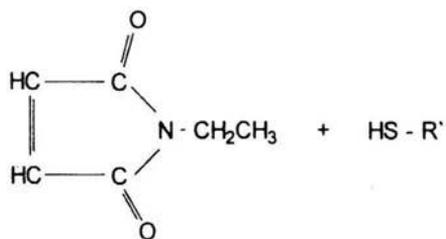
### III) Compuestos que reaccionan con grupos funcionales en proteínas.

#### a) N-Etilmaleimida (NEM).

La N-Etilmaleimida es una maleimida sustituida con nitrógeno, la cual reacciona rápidamente con tioles, además de que dentro de los miembros de este grupo, es uno de los reactivos sulfhidrilo más utilizados, una de las características más importantes de la N-Etilmaleimida es su doble enlace  $\text{C}=\text{C}$ , ya que cuando se compara el efecto que tiene un compuesto que tiene la estructura general de la N-etilmaleimida a excepción del tipo de enlace como es la N-etilsuccinamida, este último no posee a habilidad para reaccionar con grupos tiol. (Webb, 1966).

En la membrana de los eritrocitos, NEM es un inhibidor irreversible de la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa y de actividades de fosfatasa (Richards *et al.*, 1977). El NEM, además inhibe la  $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPasa}$ , pero, al menos en el caso de los eritrocitos, la concentración del NEM necesaria para reducir a la mitad la actividad de la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa es menor en 10 veces aproximadamente, de la que se necesita para producir el mismo efecto sobre la bomba de sodio (Richards *et al.*, 1977).

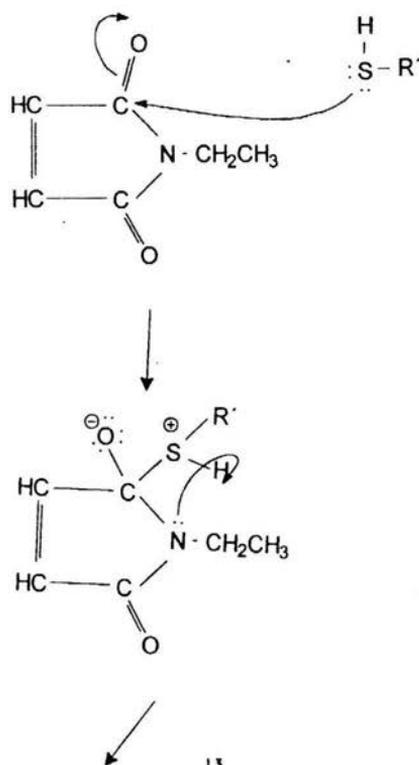
Debido a que la reacción que tiene este compuesto sobre proteínas que tienen grupos SH es de una gran especificidad y es posible seguirla por métodos electrofotométricos, se ha observado el siguiente efecto (Eyzaguirre. J, 1987):

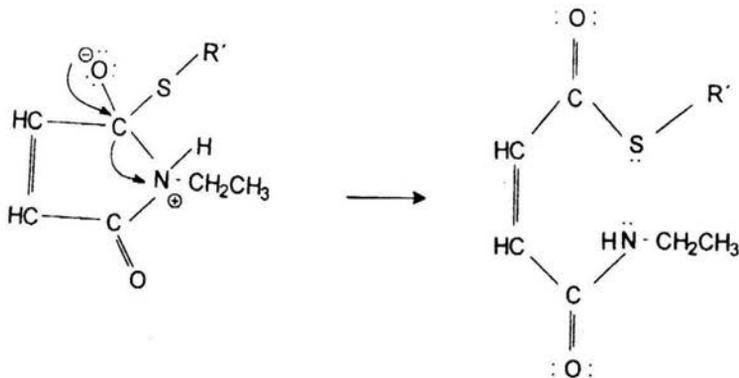


N-Etilmaleimida

Compuesto con grupo SH

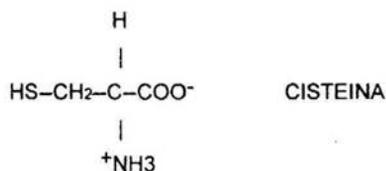
### REACCIONES POSTERIORES



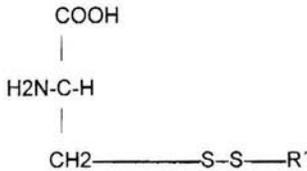


#### b) L-cisteína

La cisteína pertenece a los aminoácidos con grupo R polares sin carga (neutros), que pueden establecer enlaces de hidrógeno con el agua, por lo que son relativamente más solubles en ella que los aminoácidos con grupo R no polares. La polaridad de la cisteína se debe a la presencia del grupo sulfhidrilo (-SH),



La cisteína y la tirosina poseen las funciones más polares de esta clase de aminoácidos; a saber, los grupos tiol e hidroxilo fenólico, respectivamente. Estos grupos tienden a perder protones por ionización más fácilmente que los grupos R de otros aminoácidos de esta clase. La cisteína se encuentra frecuentemente en las proteínas en su forma oxidada, en la presencia de proteínas que tienen grupos SH, se une la cisteína por medio de su oxidación para formar un grupo disulfuro, de modo que se establece un enlace covalente transversal entre ellas:



Se sabe que los compuestos celulares que contienen grupos SH pueden ser agrupados en tres categorías (Lehninger, 1985):

- 1) Tioles de bajo peso molecular (tales como la coenzima A, glutatona y varios aminoácidos, como cisteína, homocisteína, 2-tiolistidina, ergotioneína y tioglicolato).
- 2) Proteínas no enzimáticas (muchas de las proteínas citoplásmicas como actomiosina y proteínas ciliares, proteínas de la membrana plasmática y proteínas estructurales).
- 3) Enzimas de todos los tipos y que catalizan una gran variedad de reacciones.

#### **Niveles de calmodulina y actividad de la (Ca<sup>2+</sup> + Mg<sup>2+</sup>)-ATPasa durante el desarrollo testicular.**

Se ha observado que el contenido de calmodulina aumenta en los testículos durante la proliferación y la diferenciación del epitelio germinal. La aparición de espermatocitos primarios fue acompañada por el incremento de aproximadamente cuatro veces en el contenido de calmodulina, este aumento de calmodulina se debe a que se eleva el nivel de la síntesis específica de su RNAm (Trejo, *et al* 1985 ; Lagacé *et al* 1981). Por otra parte, la evolución de los espermatocitos primarios, a través de la primera profase meiótica, se vió acompañada por cambios en la actividad de Ca<sup>2+</sup>-ATPasa y en sensibilidad a trifluoroperazina. Los estadios primarios (estadio paquitenio) mostraron una actividad de (Ca<sup>2+</sup>+Mg<sup>2+</sup>)-ATPasa 6 veces más alta que el de los espermatocitos leptoteno y una mayor sensibilidad a trifluoroperazina, lograndose una inhibición del 80 % de la actividad de (Ca<sup>2+</sup>+Mg<sup>2+</sup>)-ATPasa a 160 µM de trifluoroperazina (Trejo, 1982).

Estas observaciones sugieren que los niveles mayores de calmodulina, encontrados en espermatoцитos primarios paquiteno, pudieran relacionarse con su nivel de  $(Ca^{2+}+Mg^{2+})$ -ATPasa más elevado.

Sin embargo, los espermatoцитos primarios leptoteno y las espermátides con actividades de  $(Ca^{2+}+Mg^{2+})$ -ATPasa semejantes, mostraron resistencia a trifluoroperazina; es decir, su actividad de  $(Ca^{2+}+Mg^{2+})$ -ATPasa sólo fue inhibida 55 % con la misma concentración que inhibió el 80 % de la actividad de los espermatoцитos primarios paquiteno. Hay que hacer notar que los espermatoцитos paquiteno y las espermátides tienen el mismo contenido de calmodulina expresado como ng calmodulina /  $\mu$ g proteína total (Trejo *et al.* 1985)

Estas observaciones sugieren que la actividad de la  $Ca^{2+}$ -ATPasa del epitelio germinal de testículo de rata, podría ser regulada por distintos mecanismos, durante la diferenciación de las células del epitelio germinal, alcanzando sus niveles máximos en la profase meiótica, aunque, sin embargo, se desconocen cuales son aquellos factores que intervienen en su regulación.

#### **Elementos del citoesqueleto en las células germinales y en células de Sertoli durante la espermiogénesis**

Muchos de los cambios morfológicos que ocurren en el epitelio seminífero durante la espermiogénesis, tales como la translocación de espermátidas y el movimiento de células espermatogénicas, se piensa que están relacionados con elementos del citoesqueleto (Vogl, 1990). Uno de los mayores componentes de este citoesqueleto es la F-actina, que por interacción con la miosina produce varios tipos de movimiento intracelular. La actina existe en dos formas básicas dentro de las células, la forma globular (G), y filamentosa (F).

Junto con otros elementos del citoesqueleto, los filamentos de actina forman extensivas redes tridimensionales que abarcan el citoplasma y en los cuales, los filamentos de actina son uno de los mayores componentes. Los filamentos de actina están implicados en numerosos eventos relacionados con movilidad, tales como la endocitosis, segregación, fagocitosis, translocación celular, y el movimiento vesicular intracelular.

Muchas de las funciones que tiene la actina, tanto aquellas relacionadas con la movilidad y como con funciones estructurales, tienen una interacción con la membrana plasmática o con la membrana intracelular (Vogl, 1990). La presencia de

uniones directas o indirectas de actina con moléculas específicas de membrana, pueden proveer a la célula con un mecanismo de :

- 1) establecer dominios específicos dentro de la membrana.
- 2) regiones específicas internas en la membrana.
- 3) movilizar organelos membranosos de una región de la célula a otro.
- 4) generar cambios en el contorno o forma de la célula.
- 5) movilizar a la célula de un punto a otro.

Korn y Hammer (1988), definieron a la miosina de manera general, como una proteína que se une a la F-actina con lo cual produce una actividad de ATPasa. Las miosinas expresan varios niveles de actividad de  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa,  $(\text{K}^+$ -EDTA)-ATPasa y  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPasa, sin embargo, únicamente la actividad de la  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPasa se expresa dentro de condiciones fisiológicas y es activada por F-actina (Korn & Hammer, 1988).

La citosinesis se cree que se efectúa por la acción de anillos contráctiles situados en el surco de división, en los cuales la presencia de actina y miosina es importante, sin embargo, en células espermatogénicas de mamíferos no se ha encontrado a la miosina como un componente de la estructura del puente, mientras que filamentos de actina se encuentran alrededor de la circunferencia del canal puente, estando además está asociados con el material denso que está unido a la membrana plasmática (Vogl, 1990).

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se ha observado que la actividad de la  $(Ca^{2+}+Mg^{2+})$ -ATPasa de la fracción microsomal de testículo de rata y de células germinales aisladas, sufre modificaciones dependiendo del grado de maduración del epitelio germinal. En la primera profase meiótica, durante la diferenciación de los espermatoцитos primarios, la actividad de esta enzima aumenta, siendo más alta en el estadio de espermatoцитos paquitenos. Las espermátides muestran un nivel de actividad semejante al de los espermatoцитos primarios leptotenos (Trejo 1982). Sin embargo, las variaciones de la actividad de la  $Ca^{2+}$ -ATPasa durante la diferenciación del epitelio germinal testicular no han sido todavía explicadas;

- 1.-Se desconoce el origen de los cambios de actividad de  $(Ca^{2+}+Mg^{2+})$ -ATPasa durante la diferenciación de los espermatoцитos primarios
- 2.-Se desconoce si la mayor cantidad de calmodulina presente en espermatoцитos primarios paquitenos esté asociada estrechamente con la actividad de la  $(Ca^{2+}+Mg^{2+})$ -ATPasa en este estadio.
- 3.-Tampoco se sabe si la  $(Ca^{2+}+Mg^{2+})$ -ATPasa puede ser activada por lípidos ácidos de la membrana, o por proteólisis durante la profase meiótica.
- 4.-No se ha descartado la posible contribución en la degradación de ATP por la presencia de otras ATPasas.

## OBJETIVOS

El objetivo general del presente trabajo de tesis es:

Estudiar los factores que regulan la actividad de la  $(Ca^{2+}+Mg^{2+})$ -ATPasa de la membrana plasmática en fracción microsomal de testículo de rata de la cepa Sprage Dawly, a dos diferentes edades: 15 y 38 días de edad, que corresponden a la etapa inicial de la profase meiótica y a la diferenciación de las espermátides.

Objetivos específicos:

- 1.- Analizar la actividad de esta enzima a diferentes concentraciones de  $Ca^{2+}$  libre. o sea, la dependencia de la enzima por  $Ca^{2+}$
- 2.- Afinidad por ATP.
- 3.- Determinar el efecto de  $Mg^{2+}$
- 4.- Determinar su activación por calmodulina purificada.
- 5.- Caracterizar la actividad de la  $Ca^{2+}$ -ATPasa mediante el uso de inhibidores.

## MATERIAL Y METODOS.

### ANIMALES

En este trabajo de tesis fueron empleadas ratas macho albinas de la cepa Sprague Dawly, las cuales fueron proporcionadas por el bioterio de Centro Médico Nacional Siglo XXI, alimentadas con purina y agua *ad libitum*.

### PROCEDIMIENTOS.

#### Fraccionamiento subcelular de testículo de rata.

Con el propósito de obtener la fracción microsomal, que fue utilizada como fuente enzimática durante este trabajo de tesis, se emplearon los testículos de rata a dos diferentes etapas de maduración del epitelio germinal:

Etaapa inicial de la profase meiótica (15 días de edad).

Diferenciación de las espermátidas (38 días de edad).

El número de ratas utilizadas por fraccionamiento subcelular, varió dependiendo de la edad, y por consecuencia del peso de los testículos. Para aquéllas que tenían 15 días de edad fueron necesarias entre 24 y 28 ratas, mientras que se emplearon 15 animales para las ratas de 38 días de edad.

Las ratas fueron sacrificadas por dislocación cervical y decapitadas para desangrarlas lo más posible; posteriormente, los testículos fueron expuestos por medio de un corte en la zona abdominal y extraídos rápidamente para ser recibidos en un medio de solución salina 0.9 %, amortiguada con HEPES a una concentración de 20 mM y un pH de 7.2, siendo esta solución enfriada previamente en hielo; a partir de este momento, todo el proceso se realizó en cuarto frío (4 °C) o en hielo.

Después, tanto la túnica albugínea como la arteria espermática se desecharon, y los testículos fueron enjuagados en la misma solución, secados en papel filtro y pesados con el fin de preparar un homogeneizado total al 10% (p/v).

Los testículos fueron picados finamente con tijeras en la solución de homogeneización, empleando para este caso un medio de sacarosa 250 mM, HEPES 20 mM y un pH de 7.2, adicionando una solución con diferentes inhibidores de proteasas para evitar la activación de la  $Ca^{2+}$ -ATPasa por proteólisis. Estos inhibidores fueron: Leupeptina 100  $\mu$ M, Antipaina 50  $\mu$ M y el inhibidor de tripsina 100

$\mu\text{g/ml}$  y se homogeneizó en un homogeneizador de vidrio tipo Potter Elveejhem provisto con un pistón de teflón flojo en relación al homogeneizador; se dieron de 4 a 5 golpes para después pasarse a un homogeneizador con pistón de teflón a su medida, para dar 3 golpes.

El homogeneizado fue sometido a un sistema de centrifugación diferencial representado en el esquema 1, resuspendiendo cada una de las pastillas en una solución de sacarosa 250 mM y HEPES 20 mM, a un pH de 7.2

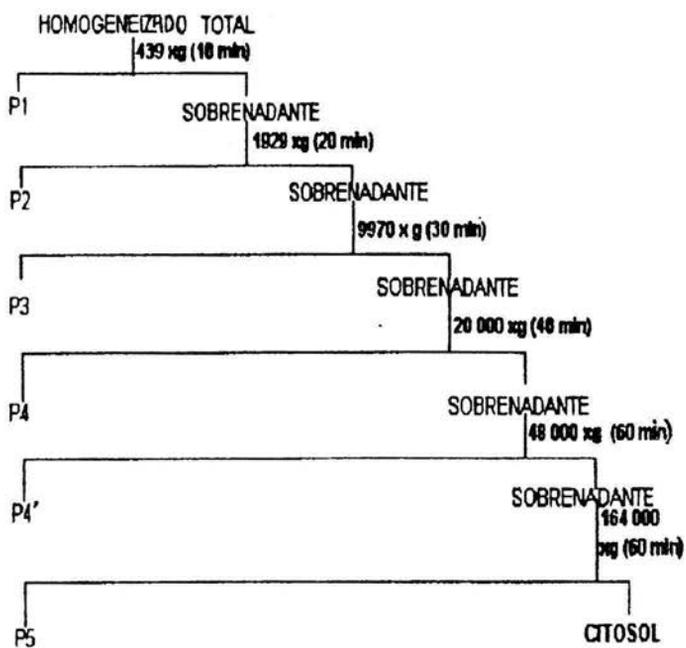
Todas las preparaciones obtenidas, fueron divididas en alícuotas de 1 ml y almacenadas a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de realizar el ensayo enzimático, se tomaron alícuotas de 200  $\mu\text{l}$  de cada fracción de homogeneizado para la cuantificación de proteínas por el método de Lowry, modificado por Hartree (1972).

### **Caracterización de las fracciones subcelulares.**

Se procedió a medir la actividad de diferentes enzimas que son consideradas como marcadoras de organelos subcelulares, esto con el propósito de identificar a las diferentes fracciones celulares obtenidas.

- Para la membrana plasmática:  
Fosfatasa alcalina (VanBelle, 1972).  
5' nucleotidasa (Aronson y Tawter, 1974).  
 $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa (Fabiato y Fabiato, 1979).
  
- Para los lisosomas:  
Fosfatasa ácida (McNamee, 1989)  
Catepsina B (Szego *et al.*, 1976).
  
- Para las mitocondrias:  
Deshidrogenasa succínica (Bryan, *et al.* 1978).
  
- Para el retículo endoplásmico:  
Glucosa-6-fosfatasa (McNamee, 1989).

## ESQUEMA DEL FRACCIONAMIENTO SUBCELULAR



### **Determinación de la actividad de la $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa en el epitelio germinal testicular.**

La actividad fue determinada utilizando el medio de incubación que describen Fabiato y Fabiato (1972), el cual utiliza EGTA 1 mM, para obtener el  $\text{Ca}^{2+}$  libre deseado, a una fuerza iónica de 0.28 y considerando que EGTA tiene diferente  $K_a$  que  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ .

Alícuotas de 80  $\mu\text{g}$  de proteína de la fracción microsomal se adicionaron a un medio de 80 mM de KCl, 20 mM de HEPES y 1 mM de EGTA, a un pH de 7.5, en un volúmen final de 0.5 ml y trabajando en hielo. A continuación se agregó al medio ATP concentrado para dar una concentración final de 2 mM, incubándose inmediatamente la muestra a 37 °C por diferentes tiempos. La reacción se detuvo por la adición de un ml de TCA frío al 10 % (p/v). Después las muestras fueron centrifugadas durante 20 minutos a 1086 xg y por último, se determinó el Pi tomando una alícuota de 1 mM del sobrenadante, según la técnica de Botting y col., leyéndose en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 700 nm. Cada experimento fue realizado por triplicado.

En el caso del experimento realizado para determinar la distribución subcelular de la actividad de la  $(\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+})$ -ATPasa, se utilizó, además de las condiciones mencionadas anteriormente, una concentración de  $\text{MgCl}_2$  de 1 mM.

### **Determinación de la actividad de la $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa y $(\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+})$ -ATPasa utilizando $\text{P}^{32}\gamma$ ATP .**

La fracción microsomal, se obtuvo por un esquema de centrifugación que incluyó una centrifugación de 40,000 xg, antes de realizar la de 164,000 x g; además, ésta fue lavada con EDTA 2 mM. Se adicionaron 50  $\lambda$  de ATP marcado con  $\text{P}^{32}$  al medio de incubación, el cual consistió de 20 mM de HEPES, 80 mM DE KCl, 1 mM de EGTA y  $10^{-5}$  M de  $\text{Ca}^{2+}$  (en su caso además con 1 mM de  $\text{MgCl}_2$ ), y una cantidad de proteína de 27  $\mu\text{g}$  en un volúmen total de 0.4 ml; posteriormente se inició la reacción al incubar las muestras durante 30 segundos a 37°C; después de transcurrido el tiempo, se paró la reacción con la adición de 0.5 ml de TCA al 10%, agregándose 0.121 ml de reactivo de Pi a una concentración de 20 mM, a continuación se adicionaron 0.4 ml de Molibdato- $\text{H}_2\text{SO}_4$  agitando durante 30 segundos. 0.3 ml de acetona se adicionaron y nuevamente se sometió la muestra a agitar durante 90 segundos, finalmente, se agregaron 2.0 ml de acetato de butilo y se sometieron las muestras a centrifugar durante 10 minutos a 2,500 rpm. Fue tomado 1.5 ml del sobrenadante a los cuales se les adicionó la misma cantidad de

reactivo de centelleo, poniendo las muestras a contar en un aparato Beckman para cuantas  $\gamma$ .

#### **Actividad de ATPasa semejante a miosina**

La actividad de ATPasa semejante a miosina de la fracción microsomal de testículo de rata de 38 días de edad, fue determinada empleando los medios de Conzelman & Mooseker (1987). Para la actividad de la  $K^+$ -EDTA-ATPasase utilizó el siguiente medio: 0.575 KCl, 20 mM, Imidazol (pH 6.85), 2 mM EDTA, 0.02 %  $NaN_3$ , 0.2 mM DTT, Para la  $Ca^{2+}$ -ATPasa sólo varía la concentración del KCl a 75 mM, y se adiciona además 0.1 mM de  $MgCl_2$  y 1 mM de  $CaCl_2$ . En cuanto a la  $Mg^{2+}$ -ATPasa, también varía el KCl a 75 mM y el EGTA a 5 mM, adicionando  $MgCl_2$  a una concentración de 5 mM.

#### **Purificación de calmodulina.**

Esta técnica fue diseñada por Gopalakrishna y Anderson (1982), en ella se utilizaron 250 gramos de testículo de toro los cuales se adicionaron a un medio de homogeneización y posteriormente la muestra fue licuada durante 30 segundos repitiendo este procedimiento 5 veces con intervalos de reposo entre cada uno de ellos de 3 minutos. Después la muestra fue centrifugada a una velocidad de 13,484 xg durante 15 minutos y el sobrenadante formado fue pasado por una fibra de vidrio colectando todo en un matraz Erlenmeyer. A continuación, se resuspendió la pastilla adicionando un volumen igual a ésta, del amortiguador de homogeneización; posteriormente fue centrifugada esta preparación durante 15 minutos nuevamente a 10,000 rpm y el sobrenadante se pasó nuevamente a través de fibra de vidrio. Hasta este momento, todos los pasos se llevaron a cabo a una temperatura de 4°C.

Con los sobrenadantes obtenidos, se formaron alícuotas de 100 ml en matraces erlenmeyer de 250 ml y fueron calentadas en agua hirviendo de 60 a 90 segundos, pasandolas rapidamente a enfriar en una mezcla de etanol-hielo seco hasta alcanzar una temperatura de 10 °C. Esta preparación fue centrifugada a 13,484 xg durante 30 minutos y se puso a dializar durante una noche a una temperatura entre 3 y 5 °C con el amortiguador de diálisis. Posteriormente fue dializada la muestra en el mismo amortiguador de diálisis durante 4 hrs, pero esta vez a temperatura ambiente.

La muestra dializada se sometió a una centrifugación de 13,484 xg durante 60 minutos y el sobrenadante fue medido para así poder aplicar una concentración final de 2 mM de  $CaCl_2$ , de esta forma, la muestra se aplicó a una columna de fenil-

sacarosa previamente equilibrada con un amortiguador de baja concentración de sales (ver anexo 1) y a temperatura ambiente.

Después, se adicionó un amortiguador de alta concentración de sales (ver anexo 1) al instante de que la muestra había terminado de pasar por la columna, posteriormente se aplicó un amortiguador de baja concentración de sales; tanto el amortiguador de alta concentración de sales como el de baja concentración, se utilizaron para eliminar a proteínas contaminantes. A continuación, la columna fue eluida y se separaron fracciones de 1 ml para ser leídas en un espectrofotómetro a un longitud de onda de 280 nm. La determinación de la concentración de calmodulina se determinó de acuerdo a la Ley de Lambert-Beer, considerando el coeficiente de extinción molar de calmodulina que es igual a 0.221.

Las fracciones al graficarse contra la densidad óptica formaron un pico, guardándose aquellas que salieron en la segunda mitad de éste, siempre y cuando tuvieran un valor de D.O. mayor a 0.1. Dichas fracciones se juntaron y se dializaron en un amortiguador de boratos, para después filtrarse en millipore y quedar finalmente esterilizada; por último, la calmodulina se guardó a una temperatura de 2 a 5 ° C en alícuotas de 0.5 ml

#### **Efecto de la Calmodulina sobre la Ca<sup>2+</sup>-ATPasa de 15 y 38 días de edad.**

Las actividades fueron determinadas utilizando el siguiente medio de incubación: 80 mM de KCl, 20 M HEPES y 1 mM de EGTA, a un pH de 7.2, con una concentración de 10<sup>-5</sup> M de Ca<sup>2+</sup> y 79 µg de proteína. Las muestras fueron preincubadas en hielo durante 30 minutos antes de iniciar la reacción, la cual se inició por la adición de 0.2 mM de ATP durante 2 minutos a 37°C, parandola con TCA al 10 % frío. El Pi liberado se determinó en una alícuota de 1 ml del sobrenadante por el método de Bonting et al (1961).

#### **Inhibidores de bomba de calcio.**

Cuando se adicionaron los inhibidores con el propósito de determinar su efecto sobre la actividad de la Ca<sup>2+</sup>-ATPasa, estos fueron diluidos con medio y no se preincubó excepto cuando se usó N-Etilmaleimida y la concanavalina A, en que las muestras fueron preincubadas a temperatura ambiente durante 30 minutos. Las determinaciones fueron hechas por triplicado y los valores son el resultado de 1 a 3 experimentos según el caso. El intervalo de las concentraciones de los inhibidores que se utilizaron y sus condiciones experimentales fueron las siguientes:

**a) Vanadato de 0 a 500  $\mu$ M.**

Las condiciones experimentales fueron de un medio de incubación de 80 mM de KCl, 20 mM de HEPES y 1 mM de EGTA, además de incluirse 50 mM de fenilalanina al medio. La concentración de proteína fue de 80  $\mu$ g; reacción se inició por la adición de 2 mM de ATP durante 2 minutos a 37°C

**b) Lantano de 0 a 3000  $\mu$ M.**

Se utilizó un medio de incubación de 80 mM de KCl, 20 mM HEPES sin EGTA, la reacción se inició por la adición de 2 mM de ATP por 2 minutos a 37°C, se utilizó una concentración de 80  $\mu$ g de proteína y 1 mM de CaCl<sub>2</sub>.

Otros inhibidores.

**a) Concanavalina A: 0, 200 y 500  $\mu$ g/ ml.**

Se utilizó un medio de incubación de 80 mM de KCl, 20 mM de HEPES y 1 mM de EGTA, pH 7.5 con una concentración constante de proteína de 80  $\mu$ g y 10<sup>-5</sup> M de Ca<sup>2+</sup>. Se preincubó durante 30 minutos a 37°C y la reacción se inició por la adición de 2.5 ó 5.0 mM de ATP durante 2 minutos a 37°C. Las determinaciones fueron hechas por triplicado

**b) N-etilmaleimida: 0, 0.1, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 10 mM.**

Las condiciones experimentales para este caso fueron las siguientes, un medio de incubación de 80 mM de KCl, 1 mM de EGTA y 20 mM de HEPES , pH 7.5, esta enzima fue preincubada durante 30 minutos a 37°C antes de iniciar la reacción por la adición por la adición de 2 mM de ATP por 2 minutos a 37°C. Se utilizó una concentración constante de proteína de 80  $\mu$ g y de 10<sup>-5</sup> M de Ca<sup>2+</sup>.

**c) L-cisteína: 10 mM.**

Se utilizó un medio de incubación de 80 mM de KCl, 20 mM de HEPES y 1 mM de EGTA, pH 7.5 con una cantidad de proteína de 80  $\mu$ g y de Ca<sup>2+</sup> de 10<sup>-5</sup> M. La reacción se inició por la adición de 2 mM de ATP durante 2 minutos a 37°C.

Todas las gráficas y cálculos se realizaron en MicroCal Origin para Windows número 3.

## RESULTADOS

### DISTRIBUCION SUBCELULAR DE LAS ENZIMAS MARCADORAS DE ORGANELOS EN TESTICULO DE RATA DE 15 Y 38 DIAS DE EDAD.

Con el propósito de caracterizar a las distintas fracciones subcelulares de testículo de rata de 15 y 38 días de edad, obtenidas por centrifugación diferencial, se determinó la actividad de las diferentes enzimas consideradas como marcadoras de organelos: La deshidrogenasa succínica como marcadora de mitocondrias, la fosfatasa ácida y Catepsina B, como marcadoras de lisosomas, G6Pasa como marcadora de retículo endoplásmico y 5'AMPasa y fosfatasa alcalina para señalar la presencia de vesículas derivadas de membrana plasmática (Van Belle, 1972).

En la gráfica 1, 2 y 3 se aprecia la distribución de la actividad específica de dichas enzimas en las diferentes fracciones subcelulares:

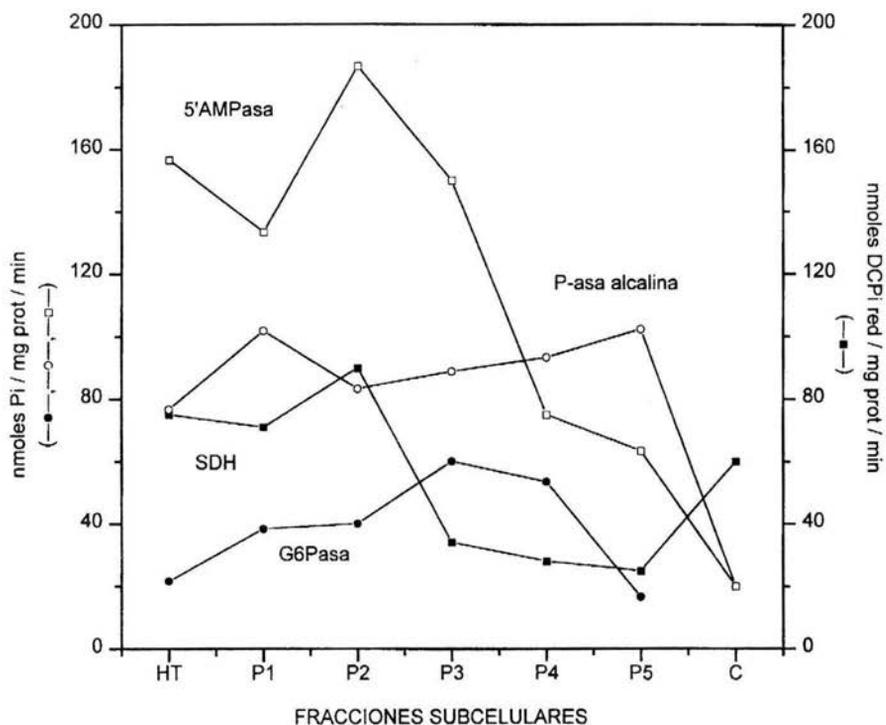
La fracción mitocondrial se recuperó en la pastilla 2 ya que la actividad mayor de la deshidrogenasa succinica se observó en la fracción que sedimentó a 1,929 x g, tanto a 15 como a 38 días de edad (P2 en las gráficas 1 y 2 respectivamente) (Martínez, A. Tesis, 1993).

La actividad de la G6Pasa alcanzó un nivel de 3 veces más elevado en las pastillas P2, P3 y P4, con respecto al homogeneizado total, indicando la presencia de vesículas derivadas de retículo endoplásmico en estas fracciones, tanto a 15 como a 38 días de edad (Camarillo, R. Tesis, 1995; Díaz, M. Tesis, 1994).

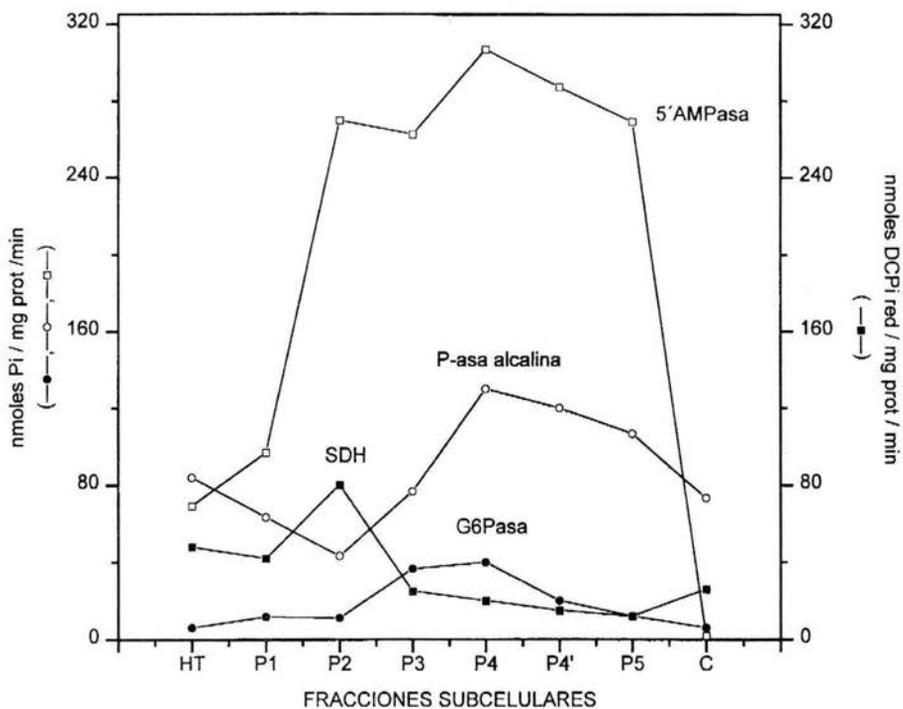
La mayor actividad de la Catepsina B a 15 días de edad, se observó en la pastilla que sedimenta a 1,929 x g (gráfica 3) indicando que esta fracción está enriquecida en vesículas lisosomales, aunque por la distribución de la fosfatasa ácida, se determinó que también en la fracción de 9,970 x g sedimentan vesículas de origen lisosomal (gráfica 3) (Martínez, A. Tesis, 1993).

La distribución de la actividad de 5'AMPasa, enzima marcadora de membrana plasmática, indicó que esta fracción membranal se recupera en las fracciones de testículo de rata de 38 días de edad que sedimentaron desde 1,929 hasta 164,000 x g alcanzando un nivel de hasta 4 veces mayor al del homogeneizado total (gráfica 2), mientras que a 15 días de edad, la mayor actividad se aprecia en P2 y P3, sin que estas actividades sean muy diferentes a la que se presenta en el homogeneizado total y P1 (gráfica 1) (Martínez, A. Tesis, 1993).

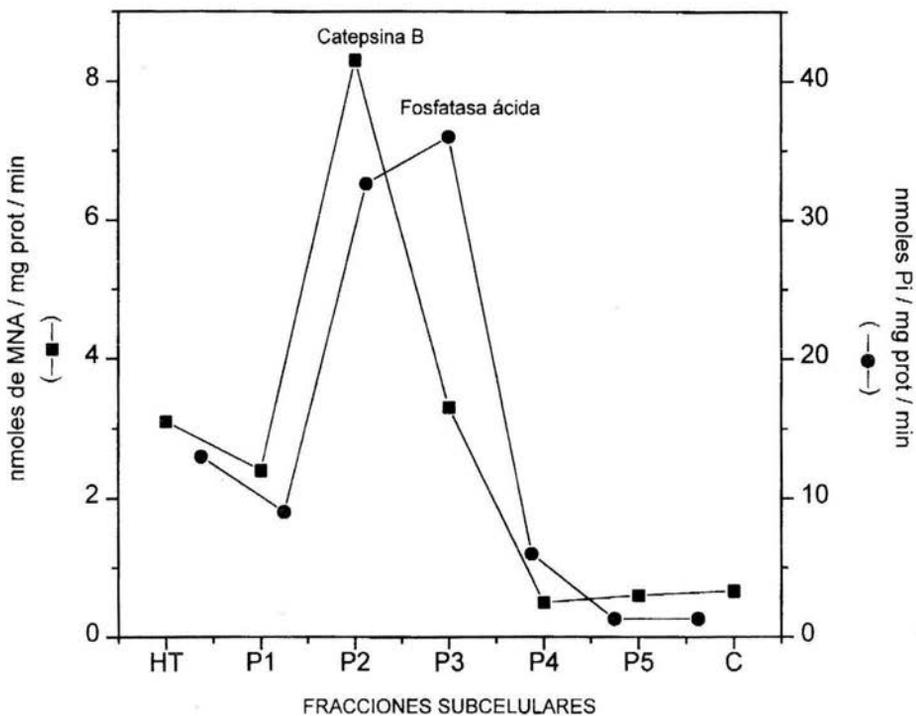
En cuanto a la fosfatasa alcalina, que es la otra enzima marcadora de membrana plasmática, se observó a 15 días de edad, que todas las fracciones presentaron una



Gráfica 1. Distribución subcelular de enzimas marcadoras de organelos a 15 días de edad. La actividad fue determinada por triplicado utilizando alicuotas de 80-160  $\mu\text{g}$  de proteína dependiendo de la actividad determinada.



Gráfica 2. Distribución subcelular de las enzimas marcadoras de organelos a 38 días de edad. Se utilizaron alicuotas de 80-160 $\mu$ g de proteína dependiendo de la actividad determinada.



Grafica 3. Distribución subcelular de Catepsina B y Fosfatasa ácida, marcadores lisosomales de 15 días de edad. Las actividades fueron determinadas por triplicado utilizando concentraciones variables de proteína, dependiendo de la edad que fue ensayada.

actividad semejante (gráfica 1), mientras que a 38 días de edad, solamente las fracciones P4 y P5 presentaron una actividad de 2 veces mayor respecto al homogeneizado total (gráfica 2) (Martínez, A. Tesis, 1993).

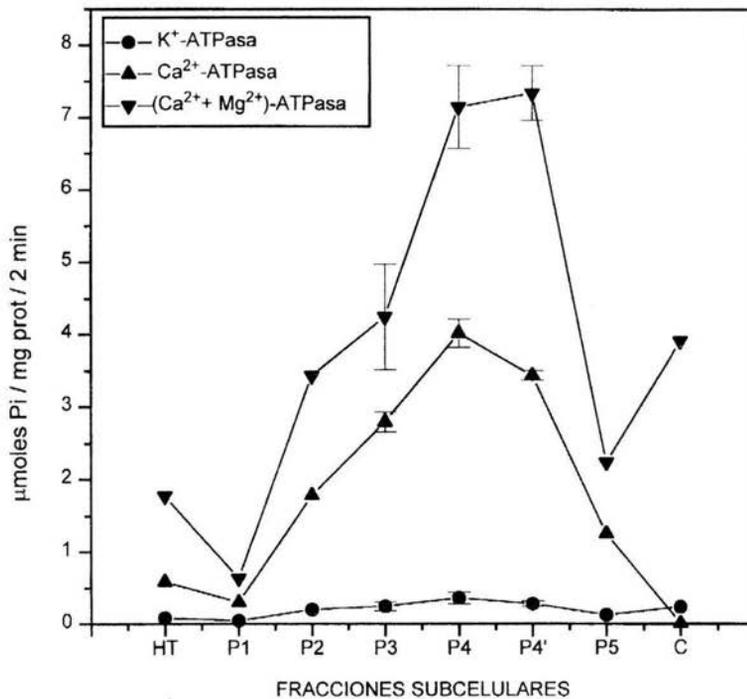
Debido a los resultados presentados en la gráfica 1, 2 y 3 se puede concluir lo siguiente:

- La fracción de vesículas de origen mitocondrial se recuperó principalmente en la fracción que sedimentó a 1,929 x g tanto a 15 como a 38 días de edad (P2 en las gráficas 1 y 2 respectivamente).
- La fracción lisosomal de 38 días de edad, sedimentó después de haber sido centrifugada a 1,929 y 9,970 x g ( P2 y P3 respectivamente en la gráfica 3).
- La fracción de retículo endoplásmico fue localizada con ligeras variaciones según la edad: mientras que a 15 días de edad se vió la mayor actividad de la enzima marcadora (G6Pasa) en las pastillas formadas por la centrifugación a 435, 1,929, 9,970 y 20,000 x g (P1, P2, P3 y P4 respectivamente en la gráfica 1), a 38 días de edad, se encontró que a 9,970, 20.000 y 48,000 x g, presentaron la principal actividad de dicha enzima (es decir, P3, P4 y P4' respectivamente en la gráfica 2).
- Por último, las vesículas derivadas de membrana plasmática se encontraron más purificadas en la fracción que resultó de la centrifugación a 164,000 x g (P5 de las gráficas 1 y 2).

#### **DISTRIBUCION DE LA ACTIVIDAD DE ATPasas EN LAS DIFERENTES FRACCIONES OBTENIDAS DE TESTICULO DE RATA DE 38 DIAS DE EDAD.**

En cada uno de los experimentos que se realizaron para medir a la actividad de la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa fue necesario tomar en cuenta la hidrólisis de ATP en presencia de KCl 80 mM, 1 mM de EGTA correspondiente a la actividad de  $\text{K}^{+}$ -ATPasa, pues se sabe que la bomba de calcio de la membrana plasmática puede ser estimulada por cationes monovalentes; la hidrólisis de ATP determinada en estas condiciones fue considerada como actividad basal.

En la gráfica 4 se presentan las actividades de la  $\text{K}^{+}$ -ATPasa,  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa y de la  $(\text{Ca}^{2+}+\text{Mg}^{2+})$ -ATPasa, que se obtuvieron en las diferentes fracciones de testículo de rata de 38 días de edad. Se incluyó una centrifugación a 48,000 x g con el propósito de eliminar vesículas de retículo endoplásmico contaminantes de la fracción que sedimentó a 164,000 x g, la cual, está enriquecida en vesículas de membrana plasmática.



Gráfica 4. Distribución subcelular de las actividades de la K<sup>+</sup>-ATPasa, Ca<sup>2+</sup>-ATPasa y la (Ca<sup>2+</sup>+ Mg<sup>2+</sup>)-ATPasa de la fracción microsomal de testículo de rata de 38 días de edad

La hidrólisis de ATP dependiente de  $K^+$  se distribuyó uniformemente en todas las fracciones, con un nivel de  $0.5 \mu\text{moles de Pi/mg proteína/2 minutos}$  (gráfica 4). Sin embargo, este patrón de actividad basal fue muy diferente a la actividad que se presentó con la adición de  $Ca^{2+}$  a una concentración final de  $10^{-5} \text{ M}$ , éste ión estimuló, entre 4 y 6 veces la actividad, principalmente a las fracciones P4 y P4' comparada con la que se presenta sin la participación de  $Ca^{2+}$  (gráfica 4).

Por otro lado, en las fracciones P2, P3 y P5 la adición de  $10^{-5} \text{ M}$  de  $Ca^{2+}$  produjo un incremento en la hidrólisis de ATP cercano a 3 veces respecto a la actividad estimulada por  $K^+$ .

La actividad de la  $Ca^{2+}$ -ATPasa y de la  $(Ca^{2+}+Mg^{2+})$ -ATPasa en la fracción P2 puede ser explicada por la participación de la ATPasa mitocondrial, ya que la actividad de la deshidrogenasa succínica, enzima marcadora de mitocondrias, tiene su mayor actividad en esta fracción (gráficas 1 y 2).

La actividad de la  $Ca^{2+}$ -ATPasa presente en las fracciones P3, P4 y P4' puede deberse tanto a la participación de la  $Ca^{2+}$ -ATPasa presente en el retículo endoplásmico, como a la  $Ca^{2+}$ -ATPasa de membrana plasmática ya que estas fracciones mostraron un enriquecimiento en G6Pasa (marcadora de retículo endoplásmico), confirmando el resultado tanto en P3 como en P4 con la actividad de la 5'AMPasa y de la fosfatasa alcalina (marcadoras de membrana plasmática); ambas ATPasas pueden incrementar su actividad con niveles micromolares de calcio libre. Como puede apreciarse, la pastilla obtenida a  $48,000 \times g$  (P4') también presentó una actividad alta de  $Ca^{2+}$ -ATPasa del mismo nivel que la actividad de la fracción obtenida a  $20,000 \times g$  (P4), sin embargo, ambas fracciones son ricas en retículo endoplásmico según lo demuestra el patrón de distribución de actividad de la G6Pasa.

La adición de  $1 \text{ mM}$  de  $MgCl_2$  al medio, en presencia de  $10^{-5} \text{ M}$  de  $Ca^{2+}$  produjo un incremento en la actividad determinada sólo en presencia de  $Ca^{2+} 10^{-5} \text{ M}$  y la mayor actividad de  $(Ca^{2+}+Mg^{2+})$ -ATPasa fue observada en P4 y P4'.

La fracción P4', obtenida después de centrifugar a  $48,000 \times g$  parece disminuir la contaminación con retículo endoplásmico que pudiera estarse presentando en la pastilla 5, según lo indica el patrón de distribución de la actividad de la G6Pasa de esa fracción, por lo que se decidió incluir permanentemente esa centrifugación y utilizar las vesículas que sedimentan a  $164,000 \times g$  para el estudio de la  $Ca^{2+}$ -ATPasa de la membrana plasmática.

Ya que el ATP podría ser hidrolizado por otras enzimas, como las ATPasas asociadas a citoesqueleto membranal, se cuantificó la hidrólisis de ATP en las

ACTIVIDAD DE ATPasa SEMEJANTE A MIOSINA		Ca <sup>2+</sup> ATPasa	
MEDIO DE INCUBACIÓN	ACTIVIDAD (μmoles Pi/mg prot/ 2 min)	MEDIO DE INCUBACIÓN	ACTIVIDAD (μmoles de Pi/ mg prot/ 2 min)
K <sup>+</sup> -EDTA	0.05	K <sup>+</sup> EGTA	0.12
CaCl <sub>2</sub> 1 mM + MgCl <sub>2</sub> 0.1 mM	1.68	Ca <sup>2+</sup> 10 <sup>-5</sup> M	1.24
MgCl <sub>2</sub> 5 mM EGTA 5 mM	1.56	Ca <sup>2+</sup> 10 <sup>-5</sup> M + MgCl <sub>2</sub> 1 mM	2.23

**TABLA 1.**

La actividad del ATPasa semejante a miosina de la fracción microsomal fue determinada empleando los medios de Conzelman Mooseker (1987). La actividad de la Ca<sup>2+</sup>-ATPasa fue determinada utilizando los medios de incubación de Fabiato & Fabiato, ambos descritos en material y métodos.

condiciones experimentales descritas para determinar la actividad de la ATPasa ligada a miosina (Conzelman & Mooseker, 1987). La tabla 1 muestra la actividad de ATPasa semejante a miosina y de la actividad asociada a la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa, en la fracción microsomal de testículo de rata de 38 días de edad que sedimentó a 164,000 x g. Como puede verse, existe una ATPasa que es estimulada por  $\text{Ca}^{2+}$  o  $\text{Mg}^{2+}$  a nivel milimolar ( $\text{CaCl}_2$  1 mM o  $\text{MgCl}_2$  5 mM), y otra ATPasa que requiere  $\text{Ca}^{2+}$  pero sólo a nivel micromolar ( $\text{Ca}$   $10^{-5}$  M). Se observa que la actividad de ( $\text{Ca}^{2+}$  y/o  $\text{Mg}^{2+}$ )-ATPasa, alcanza un nivel similar a la actividad de  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa. Se ha demostrado que la ATPasa semejante a miosina expresa su actividad en diferentes condiciones iónicas que dan lugar a diferentes actividades: ( $\text{K}^+$ ,EDTA)-ATPasa,  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa y  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPasa (Korn, & Hammer, 1988). Sin embargo, la única que puede ser estimulada por la F-actina es la  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPasa. La actividad de ( $\text{K}^+$ ,EDTA)-ATPasa determinada a altas concentraciones de KCl (0.575 M) y en ausencia de cationes divalentes (EDTA 2 mM) se ha considerado como uno de los criterios para identificar la presencia de miosina, ya que la adición de  $\text{Ca}^{2+}$  a nivel milimolar, puede en algunos casos incrementar su actividad y el  $\text{MgCl}_2$  llega a producir diferentes efectos dependiendo de la presencia de L-actina y del grado de fosforilación de la miosina (Korn. & Hammer, 1988; Cheney & Mooseker, 1992; Warrick & Spudich, 1987).

Como puede verse en la tabla 1, la actividad en presencia de altas concentraciones de KCl (0.575 M) y en ausencia de cationes divalentes, la  $\text{K}^+$ -EDTA-ATPasa (semejante a miosina), alcanza valores muy bajos comparados con los que se ven con  $\text{CaCl}_2$  1 mM +  $\text{MgCl}_2$  0.1 mM o solamente con  $\text{MgCl}_2$  5 mM sin haber calcio presente.

Por otra parte, la actividad de ATPasa que se da cuando existen bajas concentraciones de KCl, 80 mM y ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\text{K}^+$ -EGTA-ATPasa), es similar a la observada en presencia de  $\text{K}^+$ -EDTA. La adición de  $\text{Ca}^{2+}$   $10^{-5}$  M incrementó en 10 veces la actividad basal y si además se incluye  $\text{MgCl}_2$  1 mM la actividad vuelve a incrementarse.

Estos resultados sugieren la presencia de por lo menos dos ATPasas: una activada por niveles micromolares de  $\text{Ca}^{2+}$  y otra activada por niveles milimolares de  $\text{Ca}^{2+}$  y/o  $\text{MgCl}_2$ .

Con el objeto de diferenciar entre la actividad de ATPasa semejante a miosina de la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa de la membrana plasmática, se realizaron los siguientes experimentos:

Sensibilidad de la ATPasa a concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  desde  $10^{-8}$  a  $10^{-4}$  M.

Sensibilidad de la ATPasa a  $\text{Mg}^{2+}$  desde 0 a 10 mM.

Efecto de  $Mg^{2+}$  /  $Ca^{2+}$  sobre la ATPasa

### **EFFECTO DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE $Ca^{2+}$ LIBRE SOBRE LA $Ca^{2+}$ -ATPasa.**

La actividad hidrolítica de ATP estimulada por  $K^+$ , fue considerada como la actividad basal de la  $Ca^{2+}$ -ATPasa de la membrana plasmática, ya que como se mencionó, esta enzima puede ser estimulada por cationes monovalentes.

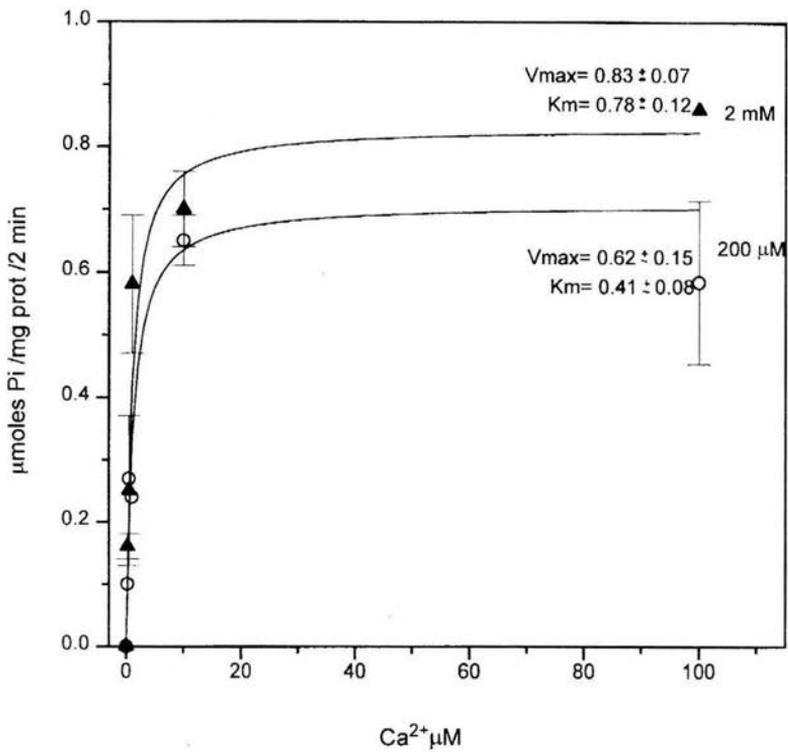
En la gráfica 5 se muestran los resultados obtenidos después de la adición de diferentes concentraciones de  $Ca^{2+}$  libre (de 0.2 a 100  $\mu M$ ) y con dos diferentes concentraciones de ATP (0.2 y 2.0 mM). A las concentraciones de ATP ensayadas, las actividades se incrementaron por la adición de  $Ca^{2+}$ , alcanzando en ambos casos la velocidad máxima entre 0.5 y 0.8  $\mu M$  de  $Ca^{2+}$ , mientras que los niveles de saturación de la enzima se presentó a concentraciones de 10  $\mu M$  de  $Ca^{2+}$  libre; en los dos casos, la actividad basal se estimuló 10 veces

Al determinar la constante aparente de afinidad para  $Ca^{2+}$  a las 2 concentraciones de ATP utilizadas, por medio de graficar los datos según Lineweaver-Burk (gráfica no presentada), la  $K_m$  para  $Ca^{2+}$ , en presencia de ATP 0.2 mM, fue de 0.41  $\mu M$ , y de 0.78  $\mu M$  cuando el ATP fue de 2.0 mM. Se considera que en ambos casos, las actividades son similares tomando en cuenta las desviaciones estandar que tienen los resultados (gráfica 5).

### **EFFECTO DEL MAGNESIO SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA ATPasa DE 38 DIAS DE EDAD.**

Se ha sugerido que al igual que otras ATPasas que transportan cationes, la ATPasa- $Ca^{2+}$  podría requerir de  $Mg^{2+}$  para su actividad óptima (Rega, 1986).

La gráfica 6 muestra el efecto de  $MgCl_2$  a diferentes concentraciones, sobre la hidrólisis de ATP de la fracción microsomal de testículo de rata de 38 días de edad, utilizando una concentración de ATP de 200  $\mu M$ . Se observó que el  $MgCl_2$  produjo un efecto estimulante de la hidrólisis de ATP hasta en 9 veces, alcanzando valores máximos cuando la concentración de  $MgCl_2$  fue de 0.25 mM. Al momento de determinar la constante aparente de afinidad para  $Mg^{2+}$ , esta fue de 0.31  $\mu M$  cuando la concentración de ATP fue de 0.2 mM.



Gráfica 5. Efecto de diferentes concentraciones de  $Ca^{2+}$  sobre la actividad de la ATPasa utilizando 2 concentraciones de ATP (2 mM y 200  $\mu$ M)

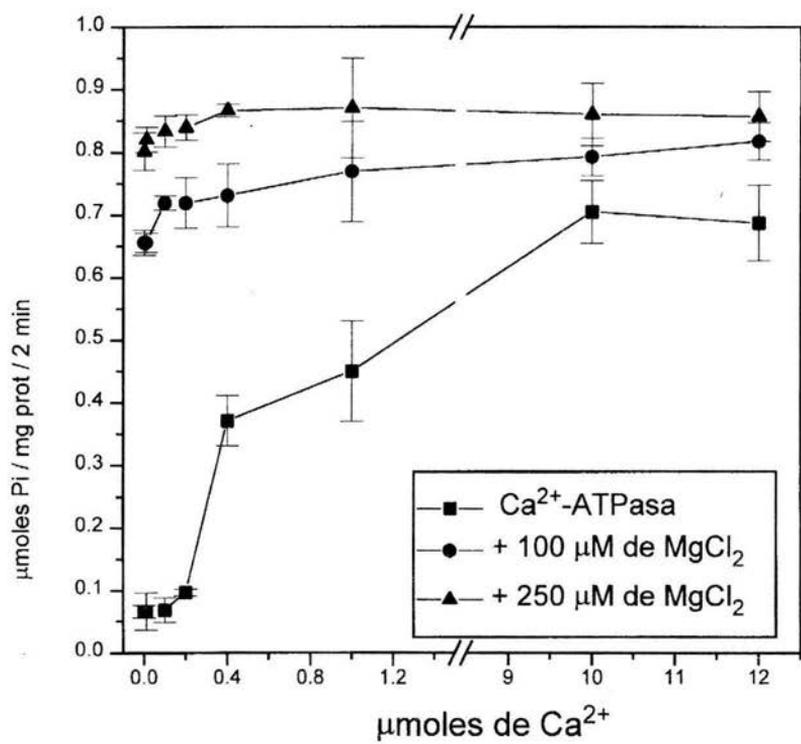
En la gráfica 7 se muestra el efecto de  $MgCl_2$  (100 y 250  $\mu M$ ) sobre la actividad de la hidrólisis de ATP estimulada por diferentes concentraciones de  $Ca^{2+}$ . En este ensayo se observó que la actividad a las dos concentraciones de  $MgCl_2$  produce una insensibilidad a la actividad medida con diferentes concentraciones de  $Ca^{2+}$ . Al parecer lo que ocurre, es que las concentraciones utilizadas del  $MgCl_2$ , produce que la enzima sea estimulada a su actividad máxima y por lo mismo, es imposible observar un nuevo incremento de la actividad por la acción de  $Ca^{2+}$ , o bien, que por la presencia de  $Mg^{2+}$ , sólo se vea la actividad de ATPasa ligada a miosina.

### **EFFECTO DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ATP SOBRE LA $Ca^{2+}$ -ATPasa DE 38 DIAS DE EDAD.**

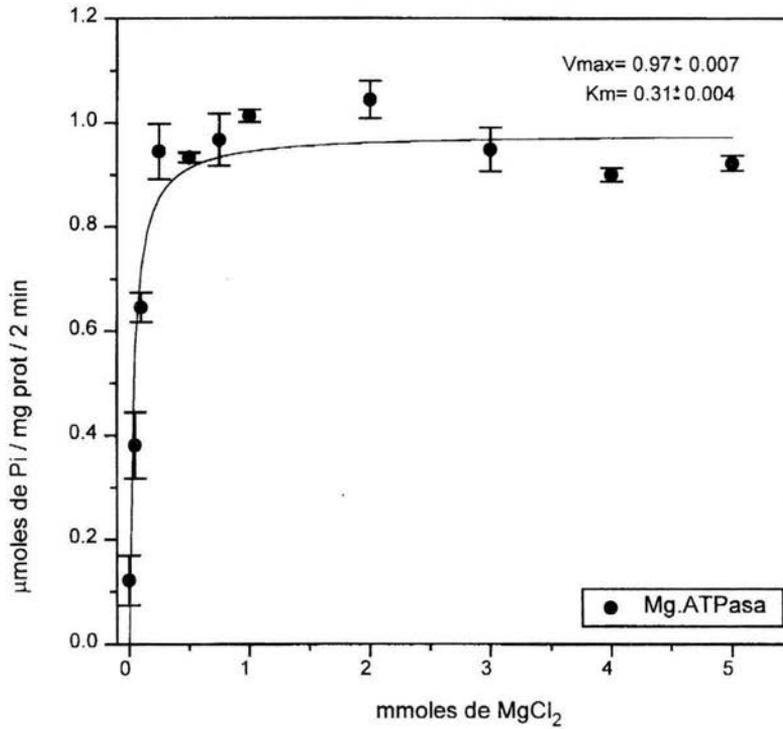
La afinidad por ATP es un criterio muy importante para definir el tipo de ATPasa presente en la fracción microsomal de testículo de rata; la  $Ca^{2+}$ -ATPasa de la membrana plasmática posee dos sitios para unir ATP con diferente afinidad (Richards, Rega & Garrahan 1978), mientras que otras ATPasas, como la miosina, no presentan esta característica. Para caracterizar a la ATPasa estimulada por niveles micromolares de  $Ca^{2+}$  y a la observada con  $Ca^{2+}$  más 1 mM de  $MgCl_2$  de la fracción microsomal de testículo de rata de 38 días de edad, se determinó su actividad a diferentes concentraciones de ATP (1  $\mu M$  a 3 mM), obteniendo los resultados que se presentan en las graficas 8 a 10. En la gráfica 8 se observa que la hidrólisis de ATP estimulada por  $Ca^{2+}$  más 1 mM de  $MgCl_2$ , es bifásica, es decir, existe una primera parte que se estimula a concentraciones micromolares, saturándose desde 20 a 80  $\mu M$  de ATP y una segunda parte que se estimula de 250  $\mu M$  a 2 mM saturándose alrededor de 0.5 mM de ATP.

La actividad de estas dos etapas fue analizada por separado, encontrándose que con  $Ca^{2+}$   $10^{-5}$  M, el nivel de actividad es menor que el que se observa con  $Ca^{2+}$   $10^{-5}$

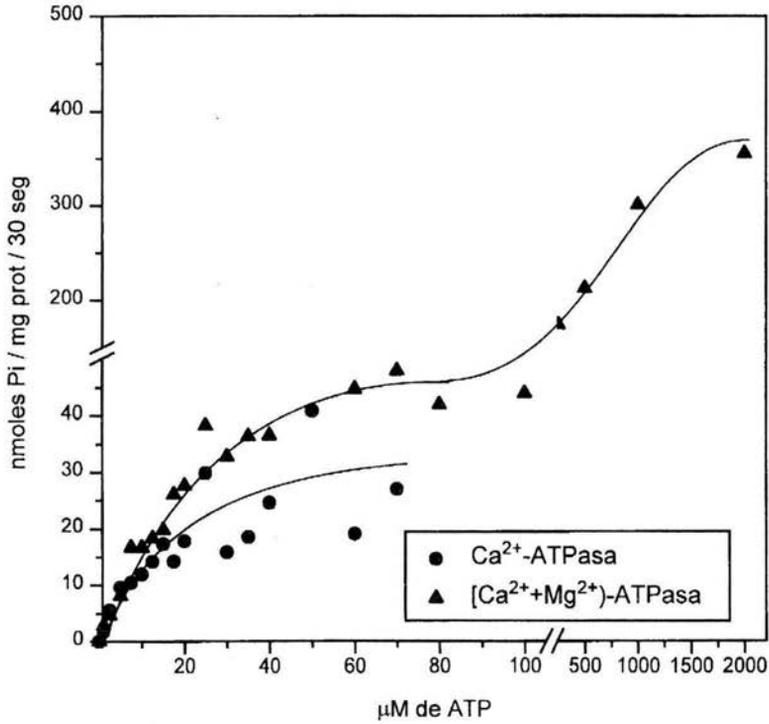
M + 1 mM de  $MgCl_2$ , pero en ambos casos, la  $V_{max}$  se alcanza a una concentración de ATP entre 20 y 40 nM, manteniéndose constante hasta 100 nM (Gráfica 9). Cuando la actividad de la primera etapa, de 1 a 100  $\mu M$  de ATP, se determinó sólo en presencia de  $Ca^{2+}$   $10^{-5}$  M se observa que a bajas concentraciones de ATP, es decir, desde 33  $\mu M$  alcanza su velocidad máxima. En presencia de  $Ca^{2+}$   $10^{-5}$  M + 1 mM de  $MgCl_2$ , se observa que la  $V_{max}$  de la primera etapa, es ligeramente mayor que la observada con  $10^{-5}$  M de  $Ca^{2+}$ , aunque el comportamiento es semejante.



Gráfica 7. Efecto de diferentes concentraciones de MgCl<sub>2</sub> sobre la actividad de la Ca<sup>2+</sup>-ATPasa de 38 días de edad. Se utilizaron 140 µg de proteína y 0.2 mM de ATP.



Gráfica 6. Efecto de diferentes concentraciones de  $\text{MgCl}_2$  en la hidrólisis de ATP por la ATPasa de una fracción microsomal lavada con EDTA de 38 días de edad.



Gráfica 8. Efecto de diferentes concentraciones de ATP sobre la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa y la  $[\text{Ca}^{2+}+\text{Mg}^{2+}]$ -ATPasa de la fracción microsomal lavada con EDTA de 38 días de edad.

Cuando estos datos fueron graficados según Lineweaver-Burk (gráfica no presentada), se observó que la afinidad por ATP en presencia de  $\text{Ca}^{2+} 10^{-5} \text{ M}$  o en presencia de  $\text{Ca}^{2+} 10^{-5} \text{ M} + 1 \text{ mM}$  de  $\text{MgCl}_2$  fue semejante; la  $K_m$  aparente, alcanzó un valor de  $13.98 \mu\text{M}$  en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  solamente, y de  $19.06 \mu\text{M}$  con  $\text{Ca}^{2+} + 1 \text{ mM}$  de  $\text{MgCl}_2$ , en esta última, la primera parte de la actividad, se satura también a bajas concentraciones de ATP:  $45 \mu\text{M}$  y se mantiene constante hasta  $100 \text{ nM}$ . La gráfica 9 muestra los resultados obtenidos utilizando  $\text{Ca}^{2+}$  a nivel  $\mu\text{molar}$ , así como la actividad en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  más  $1 \text{ mM}$  de  $\text{MgCl}_2$ .

En la gráfica 10, se muestran los resultados de la actividad de la hidrólisis de ATP, con las concentraciones entre  $100$  y  $2000 \mu\text{M}$  de ATP sobre de la  $(\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+})$ -ATPasa en la fracción microsomal de testículo de rata de 38 días de edad, la cual mostró un valor de  $K_m$  de  $303.26 \mu\text{M}$  (gráfica 10) bajo las mismas condiciones experimentales que se utilizaron para la primera etapa.

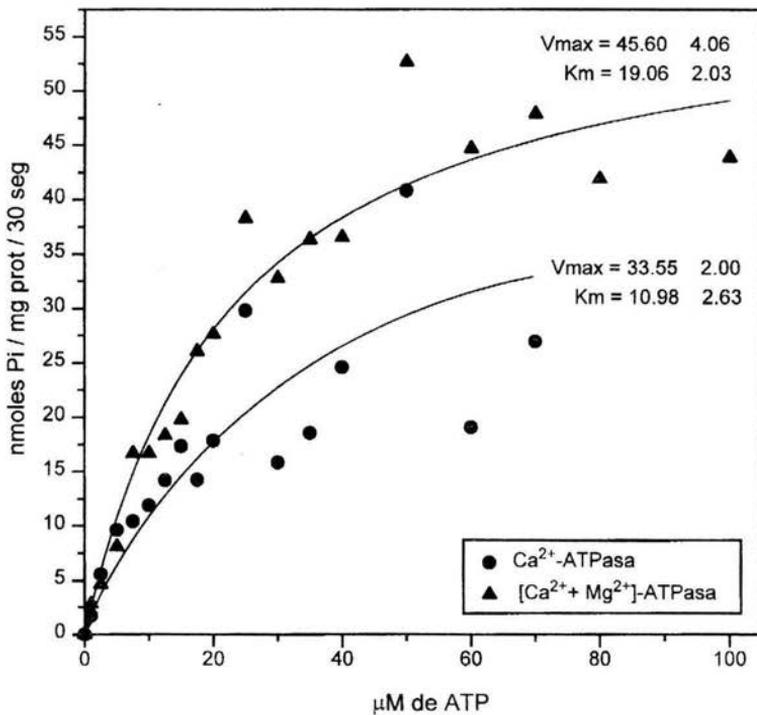
#### **EFFECTO DEL pH SOBRE LA $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa DE 38 DIAS DE EDAD.**

En la gráfica 11 se observa el efecto que producen cuatro diferentes valores de pH ( $6.6$ ,  $7.0$ ,  $7.5$  y  $8.0$ ) sobre la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa y sobre la  $(\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+})$ -ATPasa, de la fracción microsomal de testículo de rata de 38 días de edad utilizando para ello una concentración de  $10^{-5} \text{ M}$  de  $\text{Ca}^{2+}$  y dos concentraciones diferentes de  $\text{MgCl}_2$  ( $100$  y  $500 \mu\text{M}$ ).

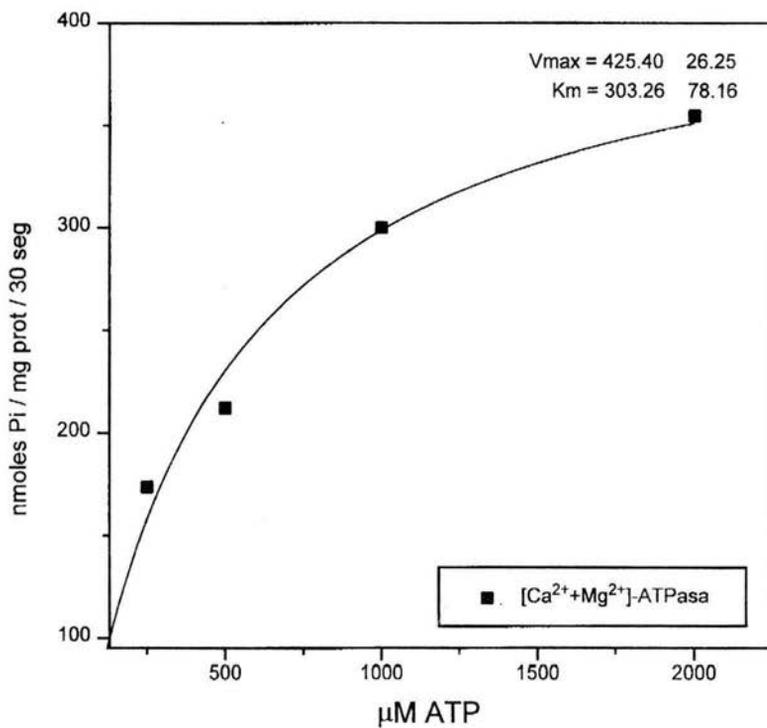
Como puede apreciarse, la actividad de la ATPasa estimulada por  $10^{-5} \text{ M}$  de  $\text{Ca}^{2+}$ , mostró velocidades similares cuando se emplearon valores de pH de  $6.6$  a  $7.5$ ; pero, cuando se incrementó el pH a  $8.0$ , se presentó una ligera disminución de su actividad.

La adición de  $100 \mu\text{M}$  de  $\text{MgCl}_2$  no modificó significativamente el patrón de actividad contra pH observado con  $\text{Ca}^{2+}$ , sin embargo, con  $500 \mu\text{M}$  de  $\text{MgCl}_2$  se pueden apreciar cambios significativos a los diferentes pH empleados. La actividad se incrementó un  $30\%$  a  $75\%$  en comparación de lo que se presenta a  $6.6$ , y se mantiene constante hasta un pH  $8.0$ .

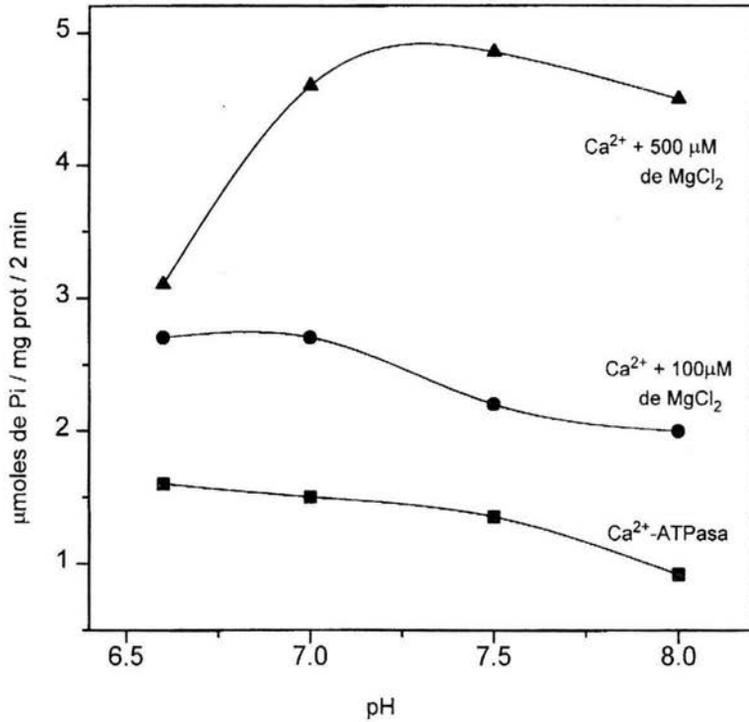
El efecto estimulador de  $\text{MgCl}_2$  sobre la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa ya se había observado (gráfica 7); la adición de  $\text{MgCl}_2$  a  $500 \mu\text{M}$ , pone de manifiesto la presencia de dos sistemas enzimáticos que hidrolizan ATP, uno es poco sensible a cambios de pH de  $6.6$  a  $7.5$  y que se inhibió a pH de  $8.0$ ; mientras que el otro sistema se incrementó a pH alcalinos.



Gráfica 9. Se presentan los resultados de la gráfica 8 que tienen valores inferiores a 100  $\mu\text{M}$  de ATP.



Gráfica 10. Efecto de elevadas concentraciones de ATP sobre la  $[Ca^{2+}+Mg^{2+}]$ -ATPasa de 38 días de edad. Para esta gráfica, se tomaron los datos de la gráfica 8.



Gráfica 11. Efecto del pH sobre la Ca<sup>2+</sup>-ATPasa y la [Ca<sup>2+</sup>+ Mg<sup>2+</sup>]-ATPasa de 38 días de edad. Se consideraron los cambios de afinidad para Ca<sup>2+</sup> del EGTA a diferentes pH.

Se aplicó el programa de Fabiato y Fabiato para calcular la cantidad de  $\text{CaCl}_2$  que debería adicionarse con el fin de obtener la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  libre deseada a 4 diferentes valores de pH, lo que es importante puesto que el EGTA cambia la afinidad que tiene por  $\text{Ca}^{2+}$  según el pH que exista en el medio.

En este punto es posible hablar de la caracterización de la actividad que tiene la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa, en la que se ha encontrado que posiblemente existen dos diferentes ATPasas que son:

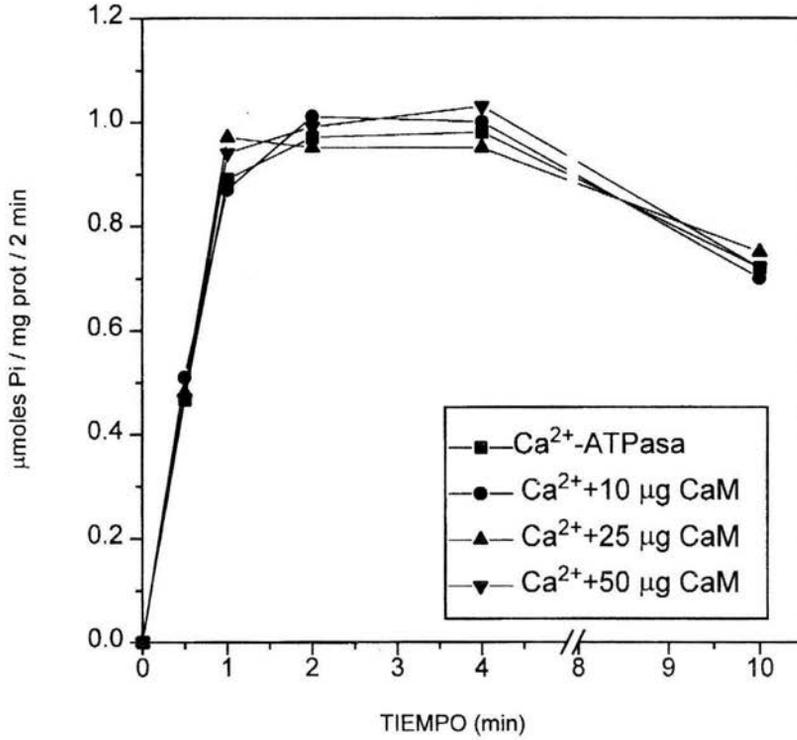
- Una estimulada por  $\text{Ca}^{2+}$   $10^{-5}\text{M}$
- Otra estimulada por  $\text{MgCl}_2$ , que evita la sensibilidad a  $\text{Ca}^{2+}$ .

O bien, posiblemente se trata de una enzima que es estimulada por  $\text{Ca}^{2+}$ , pero, cuando se adiciona  $\text{MgCl}_2$ , lo reconoce como catión divalente y entonces muestra actividad.

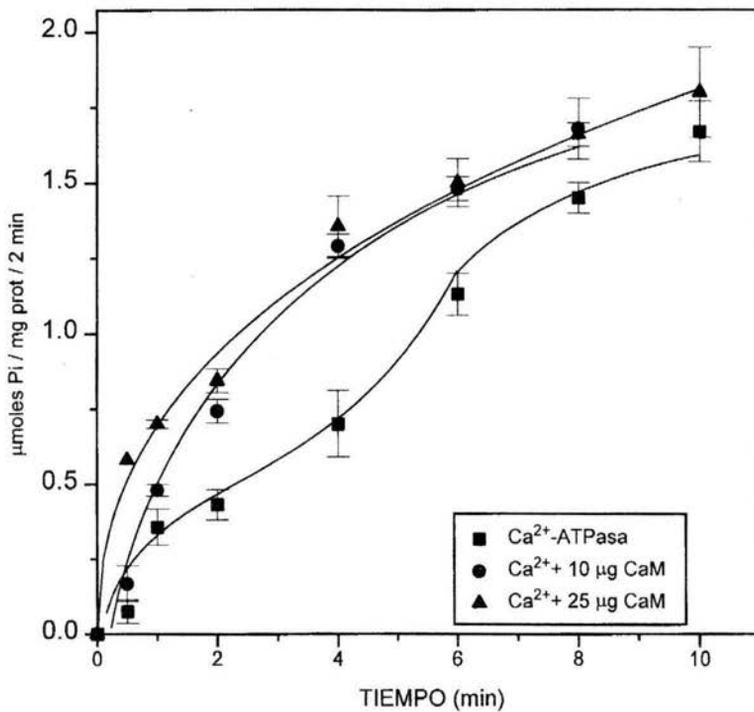
Por otro lado, se observó que la  $(\text{Ca}^{2+}+\text{Mg}^{2+})$ -ATPasa presenta dos sitios de unión con ATP, el primer componente tiene una  $V_{\text{max}}$  de  $45 \mu\text{M}$ , mientras que su  $K_m$  fue de  $19.06 \mu\text{M}$  de ATP. En el segundo componente se encontró una  $V_{\text{max}}$  de  $351 \mu\text{M}$  y una  $K_m$  de  $303.26 \mu\text{M}$  de ATP. En cuanto a la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa, sólo fue estudiado el sitio de alta afinidad para ATP, detectando que esta ATPasa tuvo una  $V_{\text{max}}$  de  $23 \mu\text{M}$  y una  $K_m$  de  $13.98 \mu\text{M}$ . Por lo que a continuación se procedió a determinar el efecto que tienen diferentes compuestos que pueden ser divididos en dos grupos, el primero, de activadores de la ATPasa, como la calmodulina, y el segundo de inhibidores de la ATPasa.

### **ACTIVACION POR CALMODULINA EN LA FRACCION MICROSOMAL DE 15 y 38 DIAS DE EDAD.**

Debido a que se ha observado que el contenido testicular de calmodulina aumenta durante la proliferación y la diferenciación del epitelio germinal, se procedió a examinar la actividad de la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa de la fracción microsomal de testículo de rata tanto de 15 como de 38 días de edad, en presencia de diferentes concentraciones de calmodulina. En la gráfica 12, se presentan los resultados obtenidos a 15 días de edad, en donde la actividad de la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa no fue estimulada por ninguna de las concentraciones de calmodulina que se utilizaron (10, 25 y 50  $\mu\text{g}$ ), además, se aprecia una disminución de la actividad cuando el tiempo de la reacción se realiza por tiempos prolongados, lo cual, puede relacionarse con el agotamiento del sustrato. En la gráfica 13, se observan los resultados obtenidos a 38 días de edad; durante los primeros 4 minutos, la adición



Gráfica 12. Efecto de diferentes concentraciones de calmodulina sobre la Ca<sup>2+</sup>-ATPasa de 15 días de edad.



Gráfica 13. Efecto de diferentes concentraciones de calmodulina sobre la Ca<sup>2+</sup>-ATPasa de 38 días de edad.

de la calmodulina incrementó en 2 veces la actividad de la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa. Sin embargo, a tiempos mayores, tanto las actividades en presencia y en ausencia de calmodulina son similares. al parecer, la adición de calmodulina acortó el tiempo que necesita la enzima para alcanzar su velocidad máxima. Las concentraciones de calmodulina utilizadas fueron de 10 y 25  $\mu\text{g}$ , ambas ocasionaron un efecto similar en la actividad de la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa.

Cabe mencionar que en los experimentos hechos para 15 días de edad, los resultados algunas veces mostraron actividad de la enzima a la calmodulina (datos no mostrados), mientras que en otras ocasiones, la misma enzima no respondió a este activador, ignorándose el motivo de este comportamiento.

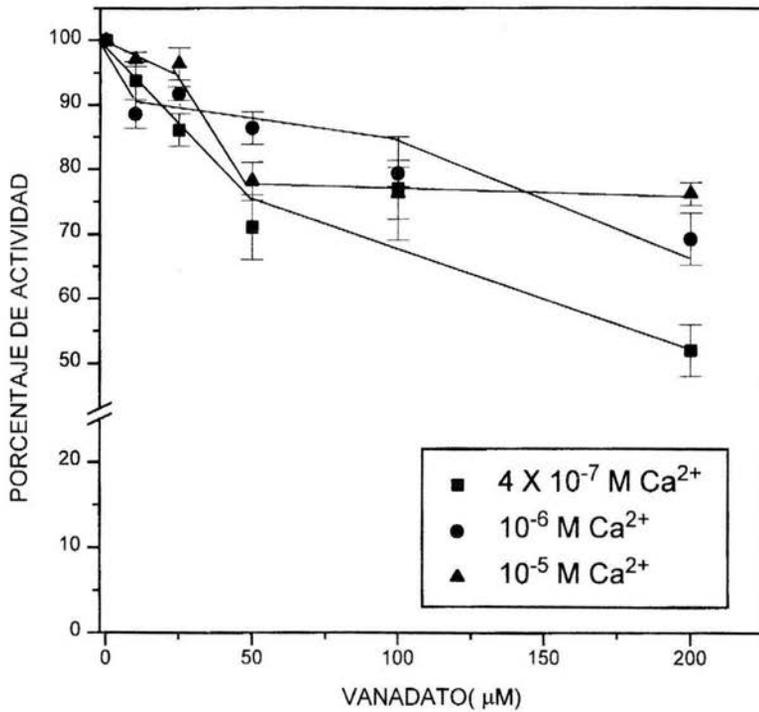
## EFFECTO DE INHIBIDORES

### EFFECTO DEL VANADATO SOBRE LA $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa MEDIDA EN DOS DIFERENTES ETAPAS DE LA ESPERMATOGENESIS.

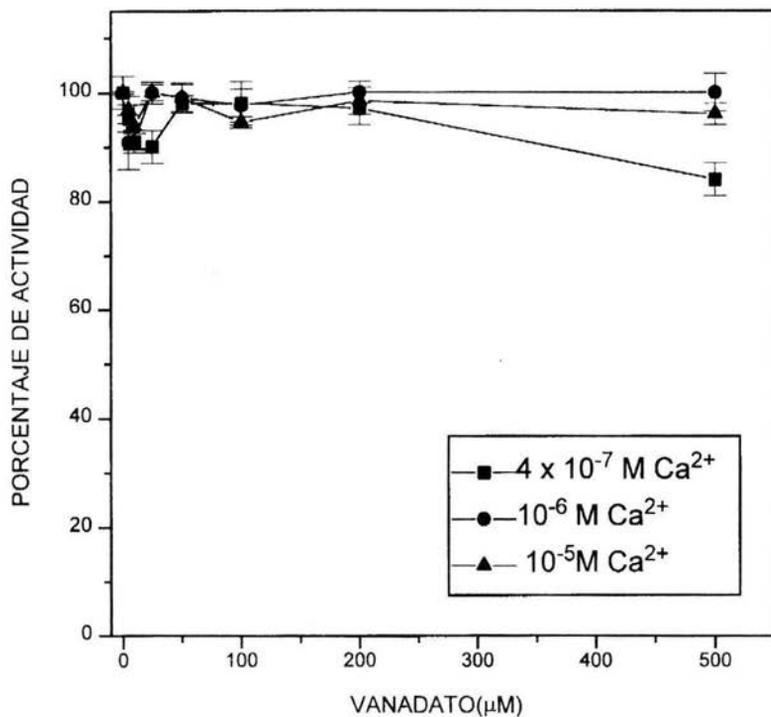
La sensibilidad a vanadato es una herramienta para definir y caracterizar la presencia de las ATPasas ligadas al transporte de iones y de las ATPasas con funciones motoras (Vale, 1987). Esta herramienta fue empleada para caracterizar la actividad de la ATPasa presente en la fracción microsomal lavada de testículos de rata de 15 y 38 días de edad, empleando una concentración de ATP igual a 2 mM, para tener saturados los dos sitios que unen ATP en la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa.

En la gráfica 14 se muestran los resultados obtenidos con diferentes concentraciones de vanadato sobre la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa de 15 días de edad, en la que se aprecia una inhibición hasta de un 47 % de su actividad por la adición de 200  $\mu\text{M}$  de vanadato; se observó que la inhibición depende de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  libre en el medio, a  $4 \times 10^{-7}$  M se observa la mayor inhibición mientras que a una concentración de  $10^{-6}$  M de  $\text{Ca}^{2+}$  la inhibición fue de sólo del 31 % y por último, a una concentración de  $\text{Ca}^{2+}$   $10^{-5}$  M, la inhibición fue únicamente del 24 %.

En la gráfica 15 se tiene el resultado que se obtuvo bajo las mismas condiciones experimentales con la fracción microsomal de 38 días de edad. A diferencia de lo que se observó a 15 días de edad, la actividad de la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa no se inhibió por ninguna de las concentraciones de vanadato desde 5 hasta 500  $\mu\text{M}$ . Este efecto se observó a todas las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  empleadas ( $4 \times 10^{-7}$ ,  $10^{-6}$  y  $10^{-5}$  M).



Gráfica 14. Efecto de diferentes concentraciones de vanadato sobre la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa de 15 días de edad



Gráfica 15. Efecto de diferentes concentraciones de vanadato sobre la Ca<sup>2+</sup>-ATPasa de 38 días de edad.

## EFFECTO DE LANTANO SOBRE LA $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa.

El lantano ( $\text{La}^{3+}$ ) ha sido usado como un potente inhibidor de la actividad de la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa, de la membrana de eritrocitos (Quist & Rafougalis, 1975; Szász *et al.*, 1978; Lasern *et al.*, 1978), de vesículas sinápticas (Rahamimoff & Spannier, 1984), de adipocitos (de Smedt *et al.*, 1982) y se ha podido demostrar que inhibe la desfosforilación del intermediario fosforilado en la reacción de la ATPasa.

La gráfica 16 muestra el efecto del lantano sobre la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa obtenida de la fracción microsomal de testículo de rata de 38 días de edad, en este caso, se eliminó EGTA del medio de incubación, la concentración de  $\text{CaCl}_2$  fue de 1 mM y se utilizó ATP 2 mM como sustrato. Como puede observarse la adición de  $\text{La}^{3+}$  menor a 1 mM no tuvo efecto, pero se observa una disminución gradual a concentraciones mayores de lantano, presentándose la inhibición de 100 % de la actividad de la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa con 3 mM de lantano.

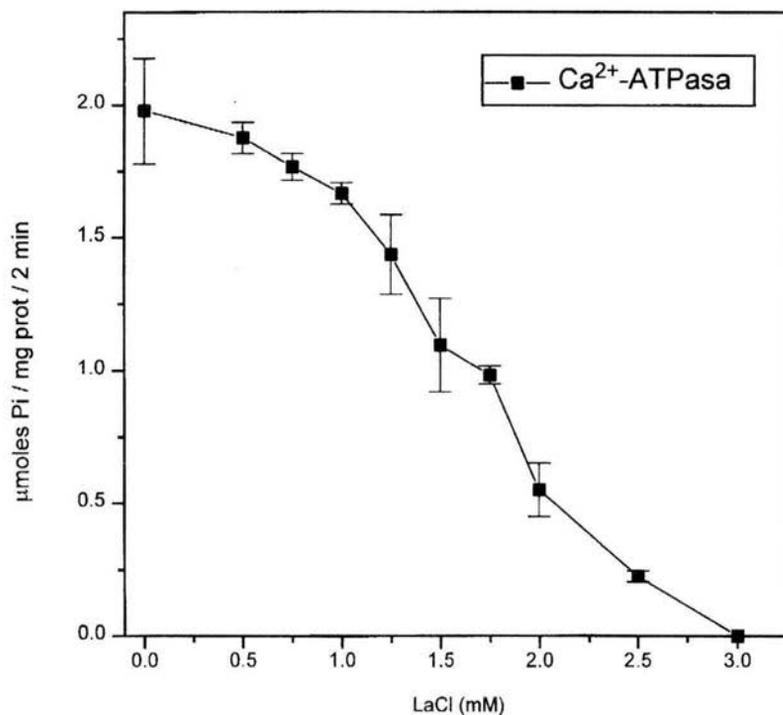
## EFFECTO DE COMPUESTOS QUE ACTUAN SOBRE GRUPOS SH

Se ha reportado que tanto NEM y L-cisteína actúan sobre grupos SH. La inhibición por NEM de la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa es reconocida, pero no se ha estudiado el efecto de la L-cisteína sobre esta enzima, por lo que se decidió estudiar su efecto sobre la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa de la fracción microsomal lavada de 38 días de edad.

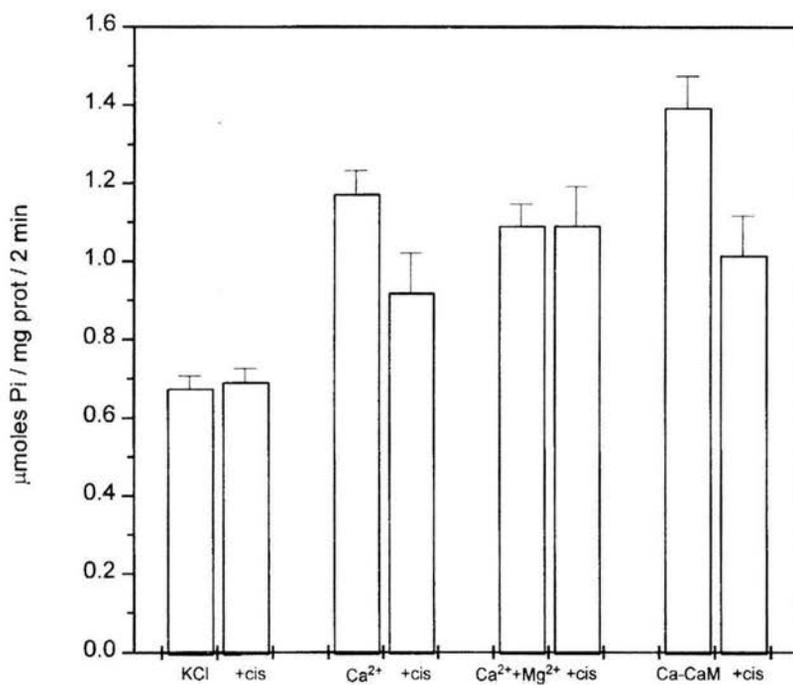
## EFFECTO DE L-CISTEINA.

La L-cisteína actúa sobre grupos SH. Además de que se utiliza para inhibir la actividad de la fosfatasa alcalina (Van Belle, 1972).

En la gráfica 17 se observa que cuando se adiciona L-cisteína 100  $\mu\text{M}$  sobre la actividad de la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa de la fracción microsomal de testículo de rata de 38 días de edad, se presenta una disminución de aproximadamente 25 %. Así mismo, la hidrólisis de ATP estimulada por ( $\text{Ca}^{2+}+\text{Mg}^{2+}$ ), tiene una disminución del 30 %. La presencia o ausencia de L-cisteína de la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa en presencia de calmodulina no afectó el nivel de actividad.



Gráfica 16. Efecto de diferentes concentraciones de lantano sobre la Ca<sup>2+</sup>-ATPasa de 38 días de edad.



Gráfica 17. Efecto de L-cisteína sobre la K<sup>+</sup>-ATPasa, Ca<sup>2+</sup>-ATPasa y (Ca<sup>2+</sup> + Mg<sup>2+</sup>)-ATPasa de 38 días de edad.

## EFFECTO DE N-ETILMALEIMIDA SOBRE LA $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa

En la gráfica 18 se aprecia que la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa de la fracción microsomal lavada de 38 días de edad, sufre una ligera inhibición de la actividad de apenas el 18 % desde 1 mM de NEM manteniendo este efecto hasta 5 mM y sólo se vuelve a incrementar esta inhibición (al 27 %) cuando se adicionan 10 mM de NEM

## EFFECTO DE CONCAVALINA-A SOBRE LA $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa Y LA $(\text{Ca}^{2+}+\text{Mg}^{2+})$ -ATPasa DE 38 DIAS DE EDAD.

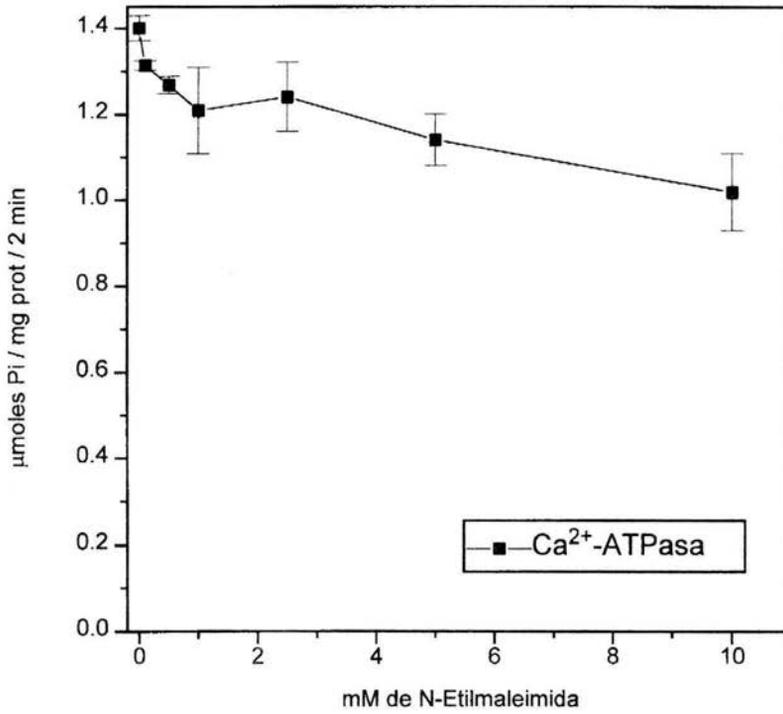
La concanavalina-A es un proteína extraída de *Concavalia ensiformis*, la cual tiene la propiedad de reconocer específicamente las glicoproteínas tanto en la cadena de los residuos  $\alpha$ -d-glucopiranosidos,  $\alpha$ -d-manopiranosidos y  $\alpha$ -d-fructopiranosidos y además es capaz de servir como marcadora de ecto-enzimas, ya que cuando se adiciona, produce un incremento de la actividad de la enzima presente en la superficie externa.

La actividad fue determinada con  $\text{Ca}^{2+}$   $10^{-5}$  M y con  $\text{Ca}^{2+}$ - $10^{-5}$  M más 1 mM de  $\text{MgCl}_2$ , se preincubó durante 30 minutos a  $37^\circ\text{C}$ . y se emplearon diferentes concentraciones de concanavalina A (200 y 500  $\mu\text{g/ml}$ ), posteriormente la reacción se inició con ATP 2.5 o 5.0 mM .

La tabla 2 muestra el efecto producido por la concanavalina A en la actividad de la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa, las 2 concentraciones de concanavalina-A que se adicionaron (200 y 500  $\mu\text{g/ml}$ ), no tuvieron ningún efecto sobre la actividad de la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa, ya sea a 2.5 o 5.0 mM de ATP, aunque la adición de 5.0 mM de ATP produjo el incremento de la actividad en casi el 100 % con respecto a 2.5 mM de ATP,

Los resultados de la tabla 3 muestran el efecto de la concanavalina A sobre la  $(\text{Ca}^{2+}+\text{Mg}^{2+})$ -ATPasa a 38 días edad, en donde tampoco no se presentó ningún cambio en la hidrólisis de ATP.

Los resultados muestran que la concanavalina A no afectó la actividad de la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa ni de la  $(\text{Ca}^{2+}+\text{Mg}^{2+})$ -ATPasa a las dos concentraciones usadas y sugieren que la actividad determinada en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$   $10^{-5}$  M o de  $\text{Ca}^{2+}$  más  $\text{MgCl}_2$  no se debe a la participación de una ectoenzima.



Gráfica 18. Efecto de diferentes concentraciones de N-Etilmaleimida, sobre la actividad de la Ca<sup>2+</sup>-ATPasa de 38 días de edad

<b>Concanavalina A (mg/ml)</b>	<b>ATP 2.5 mM</b>	<b>ATP 5.0 mM</b>
0	1.167 ± 0.025	2.149 ± 0.029
0.2	0.0818 ± 0.022	2.028 ± 0.15
0.5	0.9345 ± 0.36	2.235 ± 0.36

TABLA 2. Efecto de Concanavalina A sobre la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa de 38 días de edad.

<b>Concanavalina A (mg/ml)</b>	<b>ATP 2.5 mM</b>	<b>ATP 5.0 mM</b>
0	2.505 ± 0.21	3.104 ± 0.136
0.2	2.26 ± 0.15	3.066 ± 0.076
0.5	2.76 ± 0.005	3.505 ± 0.115

TABLA 3. Efecto de Concanavalina A sobre la  $(\text{Ca}^{2+} - \text{Mg}^{2+})$ -ATPasa de 38 días de edad

## DISCUSIÓN

Por medio de la utilización de las enzimas marcadoras de organelos, se determinó la composición de cada una de las fracciones subcelulares del testículo de rata a dos diferentes edades, 15 y 38 días de edad, encontrando que la P2 es rica en mitocondria y lisosomas, que la P3, P4 y P'4 son ricas en retículo endoplásmico. Se observó solo un ligero enriquecimiento de vesículas derivadas de membrana plasmática, ya que las dos enzimas marcadoras de esta fracción, no tuvieron una distribución a donde se mostrara un pico máximo de actividad, sino que se distribuían en todas las fracciones; a 38 días de edad, se vió la mayor actividad en P5, pero todas las fracciones obtenidas a 15 días de edad mostraron niveles semejantes de fosfatasa alcalina y 5'AMPasa. A pesar de esto, se decidió utilizar la fracción P5 como fuente enzimática de membrana plasmática porque fue la fracción con menor actividad en las enzimas marcadoras de los otros organelos. La distribución subcelular de las enzimas que hidrolizan ATP en presencia de  $K^+$ , ó de  $Ca^{2+}$ , ó de  $Ca^{2+} + Mg^{2+}$  puede ser explicada si consideramos que la actividad de la pastilla 2 podría ser el resultado de la participación de la ATPasa mitocondrial, tomando en cuenta el resultado de la medición de la deshidrogenasa succínica (gráfica 1 y 2). La hidrólisis de ATP en las fracciones P3, P4 y P4' puede deberse a la intervención de la ATPasa del retículo endoplásmico y de la membrana plasmática, ya que estas fracciones mostraron un enriquecimiento en G6Pasa y en 5'AMPasa. Aunque en la fracción 5 se obtuvo un menor nivel de  $Ca^{2+}$ -ATPasa y de  $Mg^{2+}$ -ATPasa, se decidió trabajar con dicha fracción por su baja contaminación con otros organelos.

La actividad de ATPasa de la fracción microsomal de testículo de rata de 38 días de edad lavada con EDTA, mostró sensibilidad a la concentración de  $Ca^{2+}$  libre en el medio, constatando que la cantidad de  $Ca^{2+}$  necesaria para estimular la mitad de la velocidad máxima ( $K_m$ ), fue de  $0.43 \mu M$  cuando se adicionó una cantidad de  $0.2 \text{ mM}$  de ATP y de  $0.78$  cuando la concentración de ATP fue de  $2.0 \text{ mM}$ . Comparando estas cantidades de  $Ca^{2+}$  que son necesarias para la estimulación de la enzima, con lo que se ha reportado en otros modelos celulares (Carafoli, 1992), en donde el rango de valores de  $K_m$  para el  $Ca^{2+}$ , se encuentra alrededor de  $0.5 \mu M$  en un estado óptimamente activado, se observa que están dentro de los niveles reportados, aún y cuando los resultados presentan 2 concentraciones diferentes de ATP.

Para analizar el efecto del  $Mg^{2+}$  sobre la actividad de la ATPasa presente en la fracción microsomal de testículo de rata, se debe de considerar por un lado la posibilidad de que en esta ATPasa el sustrato real sea MgATP, y por otro, que el  $Mg^{2+}$  forme unicamente parte del ciclo de reacción de la  $Ca^{2+}$ -ATPasa. Para definir este punto se realizó primero el experimento del efecto de diferentes concentraciones de  $MgCl_2$  sobre la ATPasa, utilizando una concentración de  $200 \mu M$  de ATP, en donde se encontró que el  $Mg^{2+}$  estimula hasta en 9 veces a la actividad de la enzima en comparación con su actividad basal, además, la  $K_m$  aparente para  $MgCl_2$  fue de  $0.3 mM$ . Por otro lado, el experimento que se encuentra representado en la gráfica 7, muestra claramente que tanto  $100$  como  $250 \mu M$  de  $MgCl_2$  llevan a valores mayores de actividad, pero anulan la sensibilidad a  $Ca^{2+}$ .

En esta preparación enzimática no se observó el efecto bifásico de  $Mg^{2+}$  sobre la actividad de ATPasa,  $MgCl_2$  sólo incrementó la actividad y no presentó la segunda fase inhibitoria reportada para la membrana de los eritrocitos humanos (Rega & Garrahan, 1986) en donde concentraciones superiores a los  $2 mM$  de  $Mg^{2+}$  ocasionan un efecto inhibitorio a la actividad de la enzima. Se ha reportado que el  $Mg^{2+}$  es un cofactor importante en el transporte de  $Ca^{2+}$ , participa en la transición de  $E_2 \rightarrow E_1$  de la  $Ca^{2+}$ -ATPasa de la membrana plasmática de eritrocitos (Adamo, Rega & Garrahan, 1990), demás, probablemente el componente de baja afinidad por ATP, pero con velocidad mayor, es completamente dependiente de  $Mg^{2+}$  (Richards, Rega & Garrahan, 1978). El  $Mg^{2+}$  incrementa la velocidad de la fosforilación por ATP en presencia de  $Ca^{2+}$  a nivel micromolar del ciclo catalítico de la  $Ca^{2+}$ -ATPasa. (Luterbacher & Schatzmann, 1983). Se piensa que al igual que otras ATPasas que transportan cationes, el sustrato real de la  $Ca^{2+}$ -ATPasa en el sitio catalítico de alta afinidad, no discrimina entre CaATP, MgATP o incluso ATP libre (Muallem & Karlsh, 1981), por lo que, considerando nuestros resultados, es posible que los valores semejantes de  $K_m$  entre la  $Ca^{2+}$ -ATPasa y  $(Ca + Mg)$ -ATPasa de la gráfica 9, esté reflejando una condición semejante a la antes mencionada; mientras que cuando se agregan valores de  $100$  y  $250 \mu M$  de  $MgCl_2$  a la enzima, sin existir aún  $Ca^{2+}$  presente, como en la gráfica 7, se está ocupando completamente el sitio de baja afinidad, pero alta velocidad de activación.

Al igual que en otros sistemas experimentales de  $Ca^{2+}$ -ATPasa testicular, esta enzima presentó 2 fases en su actividad; una que se estimula con concentraciones del sustrato saturandose de  $20$  a  $80 \mu M$  y otra que es estimulada nuevamente a concentraciones de  $250$  a  $2000 \mu M$  de ATP, ya sea con  $Ca^{2+} 10^{-5} M$  sólo o con  $Ca^{2+} + MgCl_2 1 mM$ . En la primera fase de activación, los valores de

Km de la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa y de la  $(\text{Ca}^{2+}+\text{Mg}^{2+})$ -ATPasa, son muy semejantes (10.98 y 19.06  $\mu\text{M}$  respectivamente), esto sugiere que Ca-ATP ó Mg-ATP pueden ser el sustrato del sitio de alta afinidad. Los valores de la afinidad para ATP de la ATPasa testicular son mayores a los reportados para otras  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasas de 1 a 2.5 $\mu\text{M}$  de ATP para el sitio de alta afinidad. (Carafoli, 1992) aunque se encuentran en el mismo rango.

Con respecto a la segunda fase que presenta la curva de actividad de la  $(\text{Ca}^{2+}+\text{Mg}^{2+})$ -ATPasa testicular, en presencia de altas concentraciones de sustrato, de 250 a 2000  $\mu\text{M}$ , la Km aparente para ATP fue de 303  $\mu\text{M}$ , este valor es dos veces más alto que el reportado en otros sistemas para esta segunda fase. Este comportamiento se ha observado en numerosos tipos celulares y con la enzima purificada (Richards, *et al* 1978) Esto apoya la idea que se presenta una  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa de la fracción microsomal de testículo de rata semejante a las de otros tipos celulares en la fracción microsomal de testículo de rata de 38 días de edad.

Cuando se midió la actividad de  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa contra pH se observó que la enzima de testículo de rata no muestra gran sensibilidad a cambios de pH entre 6.6 y 7.5, ya que la actividad es prácticamente constante, sólo a pH 8.0 se observó una inhibición del 17%. La velocidad máxima del transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  medido *in vitro* en eritrocitos humanos cargados con  $\text{Ca}^{2+}$  tiene un valor de pH que varía entre 7.5 y 8 (Sarkadi, Szász, Gerlóczy & Gárdos, 1977) por lo que el efecto observado en nuestro modelo celular es sensiblemente diferente con lo que se ha reportado en otras células.

La adición de 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{MgCl}_2$  no modificó el patrón de respuesta a pH pero sí cuando el  $\text{MgCl}_2$  alcanzó 500  $\mu\text{M}$  donde se observó un pH óptimo entre 7.0 y 7.5. Nuevamente los cambios en la actividad por la adición de  $\text{MgCl}_2$  podrían deberse a la activación de otros sistemas enzimáticos. Algo parecido se presenta con la  $(\text{Ca}^{2+}+\text{Mg}^{2+})$ -ATPasa, que, con bajas concentraciones de  $\text{MgCl}_2$  (100 $\mu\text{M}$ ) guarda un comportamiento similar a la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa, disminuyendo su actividad cuando el pH es aumentado a 8.0. Contrariamente, cuando la concentración de  $\text{MgCl}_2$  se incrementa a 500  $\mu\text{M}$ , existe una preferencia de la enzima por un pH de entre 7.0 y 8.0.

En cuanto a la regulación que tiene la calmodulina sobre la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa de la fracción membranal de testículo de rata empleada, se obtuvieron los resultados presentados en la gráfica 15, en la que se observa que este activador logró acortar el tiempo que necesita la enzima para alcanzar su máxima actividad, lo cual ha sido

encontrado en otros tipos celulares (Scharff, 1981; Jeffery, Roufogalis & Katz, 1981; Larsen & Vincenzi, 1979), calmodulina incrementa a la afinidad aparente de  $\text{Ca}^{2+}$  de la enzima y por tanto reduce el valor de  $K_m$  del  $\text{Ca}^{2+}$  de la ATPasa. Pero este efecto sólo se presentó en la enzima a 38 días de edad, mientras que a 15 días de edad no hubo ninguna activación, o mejor dicho, no fueron constantes. Estas consideraciones llevaron a incluir el uso de inhibidores para caracterizar la actividad de la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa testicular. Es posible emplear el vanadato como una herramienta para diferenciar entre ATPasas ligadas a transporte de iones y las ATPasas con funciones motoras (Vale, 1987) Sin embargo, se debe de entender primero que el vanadio es un elemento metálico que se encuentra presente en todos los tejidos animales (en cantidades muy reducidas), además de localizarse también en el suelo, agua, aire y plantas, es decir, el vanadio es un oligoelemento de las células en todos los tejidos por lo que se ha llegado a sugerir que puede estar relacionado con una función de regulación enzimática (Phillips, Nechay & Heidelbaugh, 1983). Debido a que el vanadio pertenece al grupo Vb de metales de transición, es potencialmente oxidable, encontrándose asociado frecuentemente con el oxígeno como es el caso del vanadato ( $\text{VO}_4^{3-}$ ). Este elemento, que es la forma oxidada del vanadio, se ha estudiado como un regulador enzimático de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa *in vivo*, ya que concentraciones de  $0.5 \mu\text{M}$  de vanadato pueden llegar a inhibir hasta un 84 % de la actividad de esta enzima (Bond & Hudgins, 1979), el  $\text{VO}_3^-$  puede inhibir muchos, sino es que todos los transportadores de cationes dependientes de ATP, siendo uno de los inhibidores más comunmente usados para la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa de la membrana plasmática, siendo así que varios autores han demostrado la presencia de una inhibición de la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa causada por vanadato en diferentes tipos celulares como en la membrana de eritrocitos (Barrabin *et al.* 1980, Rossi *et al.* 1981), en el axón dializado de calamar (DiPolo & Beauge, 1981), en vesículas enriquecidas con membrana de retículo sarcoplásmico de músculo de conejo (O'Neal *et al.* 1979) en el retículo sarcoplásmico de músculo cardíaco de perro y músculo esquelético de conejo (Wang *et al.* 1979) y en la ( $\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+}$ )-ATPasa de la membrana plasmática del nervio óptico de calamar (Condrescu *et al.* 1984) entre otros.

La  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa testicular fue inhibida por vanadato pero sólo a 15 días de edad (gráfica 14), en donde  $200 \mu\text{M}$  de vanadato lograron disminuir en un 47 % la actividad de la enzima, cuando se encontraba presente una concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  de  $4 \times 10^{-7} \text{ M}$ ; por el contrario, la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa de 38 días no tuvo ninguna respuesta a vanadato, aún y cuando las concentraciones del inhibidor se llevaron hasta  $500 \mu\text{M}$ . Shull & Greeb (1988) demostraron la presencia de dos DNA complementarios que son capaces de codificar para dos isoformas de  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa de la membrana

plasmática de cerebro de rata, llegando a esta conclusión, a partir de la diferencia de sensibilidad a vanadato que cada una de las isoformas mostró.

La sensibilidad a este compuesto de la fracción microsomal lavada de 15 días y de 38 días de edad podría deberse a dos formas diferentes de  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasas, las cuales posiblemente se manifiestan según el estado de desarrollo del testículo de rata.

El vanadato ha sido usado también para distinguir entre diferentes tipos de ATPasas motoras como la dineína, miosina, kinesina (Vale, 1987). En este trabajo se detectó la actividad de la ATPasa estimulada por  $\text{Ca}^{2+}$  o por  $\text{Mg}^{2+}$  exclusivamente, utilizando las condiciones descritas para determinar la ATPasa ligada a miosina. Esto indica su participación en la hidrólisis de ATP cuando se utilizó  $\text{MgCl}_2$  en el medio de incubación aún a concentraciones tan bajas como  $250\ \mu\text{M}$ . Al analizar el nivel que alcanzó la actividad tanto de  $(\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+})$ -ATPasa y de  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPasa, ambas ligadas a miosina, se encontró que el nivel que alcanzaron estas actividades, son mayores de las que se reportan en diferentes tipos celulares y que se presentan en la tabla 4 (Trejo, Raquel; datos no publicados)

Con respecto a otro de los inhibidores empleados durante este trabajo como es el lantano, se sabe que este es un inhibidor que puede tener efectos tanto en el lado interno como en el lado externo de la membrana de los eritrocitos, como fue reportado por Quist y Roufogalis (1975), quienes demostraron que  $100\ \mu\text{M}$  de  $\text{La}^{3+}$  adicionados del lado externo de fantasmas de eritrocitos humanos, que se encontraban en un medio de  $4\ \text{mM}$  de  $\text{MgCl}_2$ ,  $10\ \text{mM}$  de Tris-Malato,  $3\ \text{mM}$  de  $\text{CaCl}_2$  a un pH 7.1 bloquearon completamente el flujo de  $\text{Ca}^{2+}$ , inhibiendo en un 50 % la actividad de  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa, utilizando una concentración de  $4\ \text{mM}$  de ATP, preincubando las muestras durante 10 minutos a temperatura ambiente, esto indicó que había un 50 % de actividad de ATPasa que no está asociada con el transporte de  $\text{Ca}^{2+}$ , tratándose probablemente de una  $\text{Mg}$ -ATPasa. la cual no es sensible a concentraciones de lantano.

El lantano es un inhibidor empleado frecuentemente para determinar si la bomba de  $\text{Ca}^{2+}$  de diversas células tienen un ciclo de reacción semejante al que propuso Rega y Garrahan en 1975, para eritrocitos humanos ya que por las investigaciones realizadas por Luterbacher y Schatzmann (1983) quienes utilizaron un medio de  $120\ \text{mM}$  de KCl,  $30\ \text{mM}$  de Imidazol (pH 7.0 a  $0^\circ\text{C}$ )  $\text{CaCl}_2$   $50\ \mu\text{M}$  (o  $2\ \text{mM}$  de Tris-EGTA), concentraciones de lantano de 0 a  $200\ \mu\text{M}$  y ATP  $0.3\ \mu\text{M}$  (con aproximadamente  $500,000\ \text{cpm}$  ( $\gamma^{32}\text{P}$ ), se llegó a comprender que el lantano es un inhibidor que impide el cambio conformacional de la enzima de  $E_1$  a  $E_2$  en esos

TABLA 4

## CARACTERISTICAS DE MIOSINA AISLADA DE VARIOS ESPECIES

FUENTE	SUBUNIDADES	ATPasa ( $\mu\text{mol}/\text{min. mg. Prot.}$ )				OBSERVACIONES
		K <sup>+</sup> EDIA	Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	ACTINA-Mg <sup>++</sup>	
Plaqueta humana (1-3)	200 000 (2)	0.9	0.38	0.002	0.029	No fosforilada Fosforilada
	19 000 (2)	1.0	0.41	0.006	0.170	
	16 000 (2)					
Leucocito de <u>cu</u> yo (4)	200 000	0.19	0.10	0.012	0.006	
Macrófago de <u>co</u> nejo (5)	200 000	0.56	0.57	0.045	0.045	Menos cofactor + cofactor proteico
	20 000				0.40	
	15 000					
Médula bovina (6)	200 000 (2)	0.35	0.64	0	0.017	
	20 000 (2)					
	17 000 (2)					
Fibroblasto de ratón (7)	200 000	0.43		0.01	0.09	
Cerebro de ga- to (8)			0.34	0.071	0.55	
Glia (9)	200 000	0.01	0.0002	0.001	0.0004	
	19 000					
	17 000					
Hepatocito de rata (10)	215 000	0.12		0.01	0.014	
	20 000					
Cerebro de <u>po</u> llo (11)	200 000	0.49	0.49	0.015	0.04	
	23 000 (1)					
	20 000 (2.8)					
	17 000 (1.2)					
Cerebro de ca- lamar (12)		0.17	0.075	0.003	0.025	
Ovulo de estre- lla de mar (13)	210 000	0.3	0.4	0.01	0.045	
	20 000					
	17 000					
Physarum polycephalum (14,15)	225 000 (2)	0	2.0	0	0.44	
	21 000 (2)					
	17 000 (2)					
Dictyostellium discoideum (16,17)	210 000	0.02	0.08	0.005	0.2	
	18 000					
16 000						
Amoeba proteus (18)	225 000	0.01	0.14	0.02	0.12	
Chaos carolinensis (18)	225 000	0.01	0.1	0.03	0.18	
Acanthamoeba castellanii (19-23)	140 000	3.2	0.38	0.04	0.08	No fosforilada Fosforilada
	16 000			0.08	1.23	
	14 000					
11	170 000	0.12	0.83	0.036	0.060	‡ Cofactor Proteico
	17 500					
	17 000					

experimentos, La reacción fue iniciada por la adición de 50  $\mu$ l de ATP para un volumen final de 0.5 ml durante 45 segundos a 0  $^{\circ}$ C y detenida por una rápida inyección de 1 ml de TCA al 6 % con 50 mM de  $H_3PO_4$ . En los resultados que se obtuvieron al emplear la fracción enriquecida con vesículas de origen membranal del testículo de rata de 38 días de edad, se observa la inhibición del 100 % de la actividad de la  $Ca^{2+}$ -ATPasa cuando se adicionaron 3 mM de lantano, al comparar la concentración del inhibidor necesaria para alcanzar el bloqueo total de la actividad enzimática, es claro que la concentración de enzima empleada para este trabajo es mayor a la que comunmente se utiliza, ya que normalmente estas cantidades oscilan de 6.5  $\mu$ M a 0.25 mM (Segal, 1986; Szász y col. 1978). También hay que considerar que, en el caso de los experimentos de Luterbacher y Schatzmann, en donde se alcanzó una  $K_i$  con 6  $\mu$ M de  $La^{3+}$  y una inhibición total con 200  $\mu$ M, se utilizaron bajas concentraciones de ATP (0.3  $\mu$ M) debido que se midió ATP radioactivo, mientras que en nuestro caso, las concentraciones fueron de 2 mM durante 2 minutos a 37  $^{\circ}$ C. A pesar de existir esta diferencia, esta prueba permite comprobar una vez más que la  $Ca^{2+}$ -ATPasa de testículo de rata de 38 días de edad posiblemente posee un mecanismo de reacción semejante al planteado por Rega y Garrahan (1975).

En las membranas de eritrocitos humanos, el NEM resulta ser un inhibidor irreversible de la actividad de la fosfatasa dependiente de  $Ca^{2+}$ , además se le reconoce que es capaz de inhibir la actividad de la  $Ca^{2+}$ -ATPasa (Richards, Rega & Garrahan, 1977). En comparación con la  $(Na^+,K^+)$ -ATPasa que también a sido reportada como sensible al NEM (Skou & Hilberg, 1965; Skou, 1974), la concentración de NEM que se requiere para inhibir a la  $Ca^{2+}$ -ATPasa es de diez veces menor que la necesaria para inhibir a la  $(Na^+,K^+)$ -ATPasa, ya que la  $K_i$  en el caso de la  $Ca^{2+}$ -ATPasa fue de aproximadamente 0.3 mM, mientras que en la  $(Na^+,K^+)$ -ATPasa se requiere de 2.5 mM para alcanzar la  $K_i$  (Richards, Rega & Garrahan, 1977). Además se ha estudiado el efecto que tiene el NEM sobre la actividad de la miosina del músculo esquelético (Vale, 1987), encontrando que es sensible a este componente del citoesqueleto a concentraciones aproximadas a 1 mM. Con respecto al efecto que produjo este compuesto, en la fracción microsomal de testículo de rata, se observó un ligera disminución de apenas un 27 % la actividad de la  $Ca^{2+}$ -ATPasa a 38 días de edad con una concentración del NEM de 10 mM (gráfica 18), se sabe que la N-Etilmaleimida puede afectar los grupos SH por alquilación.

En estudios realizados en cloroplastos por McCarty y Fagan (1973), se estudió la incorporación de este compuesto y además la inhibición que produce sobre la fosforilación, observando que en ambos procesos existe una cinética similar, ya que se incorpora a la subunidad  $\gamma$  y una concentración de 1 mM de NEM, que inhibió parcialmente la fosforilación pero únicamente cuando los cloroplastos fueron iluminados en presencia de este reactivo. La  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa del factor de acoplamiento 1 (FA 1) fue inhibida por NEM de un 20 a un 40 %. Al parecer el FA 1 atraviesa por un cambio conformacional dependiente de la luz, el cual expone grupos que reaccionan con NEM en la subunidad  $\gamma$ , permitiendo la reacción que tiene NEM y la inhibición subsecuente.

Cuando se probó el efecto de otro inhibidor de grupos SH como es la L-cisteína, se encontró que a una concentración de  $100\mu\text{M}$ , ocasionó una disminución del 25 % de la actividad  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa y de un 30 % de la  $(\text{Ca}^{2+}+\text{Mg}^{2+})$ -ATPasa (gráfica 17), semejante a la disminución ocasionada por la N-Etilmaleimida, lo cual sugiere que la actividad de la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa posee grupos SH poco expuestos o bien, que los grupos SH que puedan ser modificados por NEM y por L-cisteína, no participan directamente en la hidrólisis de ATP. Una explicación alternativa, sería explicar el efecto de inhibitorio de L-cisteína considerando su efecto sobre la fosfatasa alcalina. La disminución de la actividad pudiera deberse también a la eliminación de la fosfatasa alcalina en la hidrólisis de ATP, aunque como puede observarse, la fosfatasa alcalina en esta fracción tiene un nivel de 25 veces menor a la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa.

El uso de la N-Etilmaleimida o de la L-cisteína en la modificación de los grupos SH en el sitio donde se une en la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa, puede tener efectos diferentes, ya que en primera es un agente alquilante y la segunda es que puede formar puentes disulfuro. Al parecer, ambas actúan sobre grupos SH que no se encuentran formando parte del sitio activo y sólo ocasionan una inhibición parcial en la actividad de la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa.

Por último, la utilización de la concanavalina A para detectar la presencia de ecto-ATPasas, no produjo ningún efecto sobre la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa ni sobre la  $(\text{Ca}^{2+}+\text{Mg}^{2+})$ -ATPasa de 38 días de edad, lo que sugiere que no existe la participación de ecto-ATPasas en la hidrólisis del ATP en la fracción empleada durante este trabajo de tesis.

Al analizar las características de la hidrólisis de ATP en la fracción microsomal de testículo de rata a 15 y 38 días de edad, encontramos factores que identifican la

presencia de una  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa membranal semejante a la de eritrocitos y otros sistemas celulares

En favor de que se trata de una  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa de membrana plasmática:

- Se activa a concentraciones  $\mu\text{M}$  de  $\text{Ca}^{2+}$ .
- Presenta una curva de actividad bifásica por la adición de diferentes concentraciones de ATP.
- Se observa que es activada por Calmodulina.
- Su actividad es inhibida por Lantano.
- Es inhibida por Trifluoroperazina (Trejo 1982).

Sin embargo, esta actividad de  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa mostró diferencias respecto a su sensibilidad a vanadato, lantano y N-Etilmaleimida consideradas como herramientas para la caracterización de este sistema enzimático.

Esto nos sugiere que la hidrólisis de ATP estimulada por niveles micromolares de  $\text{Ca}^{2+}$ , que se presenta en la fracción microsomal del testículo de rata, tanto a 15 como a 38 días de edad, se debe a una  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa, y las diferencias en cuanto a la sensibilidad a vanadato, o pudieran reflejar la existencia de isoformas en la enzima que se expresan dependiendo del grado de desarrollo alcanzado por el epitelio germinal.

También se demostró que la fracción microsomal de testículo de rata de 38 días de edad, presenta una actividad semejante a miosina, que no había sido descrita hasta este momento y que plantea la necesidad de realizar investigaciones futuras para caracterizar su actividad.

## BIBLIOGRAFIA

- Adamo, H.P.; Rega, A.F. & Garrahan P.J. (1990). Magnesium-ion accelerate the formation of the phosphoenzyme of the (Ca + Mg)-activated ATPase from plasma membranes by acting on the phosphorylation reaction. *Bioch. Biophys. Res. Comm.* 169. 700-705
- Alberts, B.; Bray, D.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K. & Watson, J.D. (1983). *Meiosis. Molecular Biology of the cell.* Ed. Garland. N.Y. 766-783.
- Andunyah, E.S. Niggli, V. & Carafoli, E. (1982). The anticalmodulin drugs trifluoroperazine and R 24571 remove the activation of the purified erythrocyte Ca<sup>2+</sup>-ATPase by acid phospholipids and by controlled proteolysis. *FEBS Lett.*, 143. 65-68.
- Aronson, N.N. & Tawter, D. (1974). Isolation of rat liver plasma membrane fragments in isotonic sucrose. *Methods in Enzymology*. Vol. XXI A. Academic press. pp. 90.
- Atkinson D. E. & Waltson, G. M. (1967). Adenosine triphosphate conservation in metabolic regulation. *J. Biol. Chem.* 242. 3239-3241.
- Baker, P.F. (1970). The regulation of intracellular calcium in giant axons of *Liligo* and *Myxicola*. *Ann N.Y. Acad. Sci.* 307, 250-263.
- Barrabin, H., Garrahan, P.J. & Rega, A.F. (1980). Vanadate inhibition of the Ca<sup>2+</sup> ATPase from human red cell membranes, *Biochim. Biophys. Acta*, 600. 796-804.
- Barritt, G.J. (1981). Calcium transport across cell membrane; progress toward molecular mechanisms. *TIBS.* 6. 322-325.
- Benaim, G.; Clark, A. & Carafoli, E. (1986). ATPase activity and transport by reconstituted triptic fragments of the Ca pump of the erythrocyte plasma membrane. *Cell Calcium.* 7; 175-186.
- Berridge. M.J. (1990). Temporal aspects of calcium signalling. En "The biology and medicine of signal traduction" Nishizuka et al. Raven Press, New York. 108-114.
- Bishop, M.W.H. & Walton, A. (1960). Spermatogenesis and structure of mammalian spermatozoa. *Marshall's physiology of reproduction.* Ed. A.S. Parkes. Vol. I; Londres.
- Bond, G. H. & Clough, D.L. (1973). A soluble protein activator of (Mg - Ca)-dependent ATPase in human red cell membranes. *Biochem. Biophys. Acta.* 323. 372- 384.

Bond, G.H. & Hudings, P. (1980). Inhibition of Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase by Mg<sup>2+</sup>, K<sup>+</sup>, and vanadate. *Biochemistry*, 18. 325-331.

Donting, S.L., Simon, K.A. & Hawkins, N.M. (1961). Studies on sodium-potassium-activated adenosine triphosphatase I. Quantitative distribution in several tissues of the cat. *Arch. Biochem. Biophys.* 95. 416-423.

Brody, T.M., Akera, T., Baskin, S.I., Gubits, R. & Lee, C.Y. (1974). Interaction of Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase with chlorpromazine free radical and related compounds, *Acad. Sci.* 242. 527-531.

Brostrom, C.O., Brostrom, M.A. & Wolff, D.J. (1977). Calcium-dependent adenylate cyclase from rat cerebral cortex. *J. Biol. Chem.* 252. 5677-5685.

Bryan, A.C., Ackel, E.D. & Singer, T. (1976). Mammalian succinate dehydrogenase. *Methods in Enzymology*. Vol. LIII. Acad. Press. N.Y. 466-481

Cambell, A.K. (1983). The investigation of intracellular Ca as a regulator. En. "Intracellular calcium. Its universal role as a regulator". John Wiley & Sons Lim. Cap 2. pp 22-24

Campbell, A. K. (1983 (B)). The four main biological roles of calcium. En "Intracellular calcium. Its universal role as a regulator". John Wiley & Sons Lim. Cap 1. 13-17.

Carafoli, E. (1972). The Ca pump of the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* 247. 2115-2118.

Carafoli, E. & Zurini, M. (1982). The Ca<sup>2+</sup>-pumping ATPase of plasma membranes. Purification reconstitution and properties. *Biochim. Biophys. Acta*, 683. 279- 298.

Caride, A.J., Rega, A.F. & Garrahan, P.J. (1983). Effects of p-nitrophenolphosphatase on Ca transport in inside out vesicles from human red cell membranes. *Biochim. Biophys. Acta*. 734. 363-371.

Cardie A.J.; Rossi J.P.; Garrahan, P.J. & Rega A.F. (1990). Does calmodulin regulate the affinity of the human red cell Ca pump for ATP : *Biochem. Biophys. Acta*. 1027. 21-24

Chaney R. & Mooseker, M. (1972). Unconventional Miosins. *Current opinion in Cell Biology*. 4. 27-35.

Cheung, W.Y. (1980). Calmodulin plays a pivotal role in cellular regulation. *Science*. 207; 19-24.

Clermont, Yves & Percy B. (1957). Quantitative study of the cell population of the seminiferous tubules in immature rats. *Amer. J. Anat.* 100, 241-267.

- Condrescu, M.; Olses, L. & DiPolo, R. (1984). Partial purification and characterization of the (Ca + Mg)-ATPase from squid optic nerve plasma membrane. *Biochem. Biophys. Acta.* 769. 261-269.
- Conzelman, K.A. & Mooseker, M.S. (1987). The 110-kD protein-calmodulin complex of the intestinal microvillus is an Actin-activated MgATPase. *J. Cell. Biol.* 105. 313-324.
- Dame, J.B. & Scarborough S.A. (1981). Identification of the phosphorylated intermediate of *Neurospora* plasma membrane. *J. Biol. Chem.* 256. 10724-10730.
- Delhumeau-Ongay, G.; Trejo-Dayona, R. & Lara-Vivas, L. (1973). Changes of (Ca + Mg) Adenosine triphosphatase activity in rat testis throughout maturation. *J. Reprod. Fert.* 33. S13-S17.
- deSmedt, H., Parys, J.B. Borghgraef, R. & Wuytack, F. (1982). Phosphorylated intermediates of (Ca + Mg)-ATPase and alkaline phosphatase in renal plasma membranes. *Biochim. Biophys. Acta.* 720. 407-418.
- DiPolo, R. & Beaugé, L. (1981). The effects of vanadate on calcium transport in dialyzed squid axons. Sidedness of vanadate-cation interaction, *Biochim. Biophys. Acta.* 645. 229-236.
- Dunham, E.T. & Glynn I.M. (1961). Adenosinetriphosphatase activity and the active movements of alkali metal ions. *J. Physiol.* 136. 274-279.
- Eyzaguirre, J. (1987). Modification Chemical of enzymes. an overview. The use of group-specific reagents. En "Chemical Modification of enzymes". Active site studies. John Wiley & Sons Haistad Press. Cap 3. pag 47-61
- Fabiato & Fabiato. (1972). Excitation contraction coupling of isolated cardiac fiber with disrupted or closed sarcolemmas Calcium-dependent cyclic and tonic contractions. *Circ. Res.* 31; 293-307.
- Fabiato & Fabiato. (1979). Calculator programs for computing the competition of the solutions containing multiple ligands & metals used for experiments in skinned muscle cell. *J. Physiol.* 75; 463-505.
- Fawcett D.W. (1974). Interaction between Sertoli cells and germ cells. En: Male fertility and sterility Eds. R.E. Mancini y L. Martini. Academic Press. Londres. 13-36.
- Fewtrell, C.M.S. & Comperts, B.D. (1977). Effects of flavone inhibitor of transport ATPase on histamine secretion from rat mast cells. *Nature*, 265. 635-644.

Reed, R.E. (1976). Carbohydrate metabolism in the testis. En: The Testis. Eds. A.D. Johnson, W.R. Gomes & N.L. VanDemark. Academic Press. vol. II Cap 3. 125-192.

Garrahan. P.F. (1983). From the discovery of the Ca pump in plasma membrane to demonstrations of its ubiquity. En "The calcium pump of plasma membrane". A. Rega y P.F. Garrahan. Vol. 4. pp. 45-58. CRC. Press Inc. Boca Ratón Florida.

Garrahan. P.F. (1986). Inhibitors of the calcium pump. En "The calcium pump of plasma membranes". - A. Rega y P.F. Garrahan. cap. 11 pp. 153-164. CRC. Press Inc. Boca Ratón Florida.

Gietzen. K., Adamcsyk-Engelmann, P., Wuthrich, A., Konstantinova, A. & Bader, H. (1983). Compound 48/80 a selective and powerful inhibitor of calmodulin-regulated functions. Biochem. Biophys. Acta, 736. 109-118.

Sopaiakrishna, R. & Anderson, W.D. (1982). Ca induced hydrophobic site on calmodulin: Application for purification of calmodulin by phenyl-sepharose affinity chromatography. Biochem. Biophys. Res. Commun. 77; 1203-1210.

Gopinath, R.M. & Vincenzi, F.F. (1977). Phosphodiesterase protein activator mimics red blood cell cytoplasmic activator of (Ca + Mg)-ATPase. Biochem. Biophys. Res. Commun. 77.1203-1239.

Hall, P.F. (1970). Endocrinology of the testis. En: The testis. Vol II. p.2-71. Eds. A.D. Johnson, W.R. Gomes y N.L. Van Demark Academic, Press, Londres.

Hartree, E.F. (1972). Determination of protein. A modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. Analyt. Biochem. 48. 422-426.

Hashimoto, S., Bruno, B., Lew, D.P., Pozzan, T., Volpe, P. & Meldolesi, J. (1983). Immunocytochemistry of calcisomes in liver and pancreas. J. Cell. Biol. 107. 2423-2531.

Hernández-Montes, H., Trejo de Bayona, R., Alonso, U.R. & Delhumeau-Ongay, G. (1974). Distribución celular durante el desarrollo testicular en la rata de algunas enzimas del ciclo de los ácidos tricarboxílicos. X Reunión anual de la Sociedad Mexicana de Bioquímica, Mérida, Yucatán. pag. 108.

Hollinger, M.A. (1971). Metabolism of ATP by testis mitochondria of 25 day old rats. Reprod. Fert. 25. 443-449.

Pesi, G. & Scarpa, A. (1972). Fast kinetics of adenosine triphosphate dependent Ca uptake by fragmented sarcoplasmic reticulum. Biochemistry. 11. 356-362.

- Jarret, H.M. & Founniston, J.T. (1977). Partial purification of the (Ca + Mg)-ATPase activator from human erythrocytes: its similyary to the activator of 3': 5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase, *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 77. 1210-1242.
- Jeffery, D.; Roufogalis, B. & Katz, S. (1981). The effect of calmodulin on the phosphoprotein intermediate of Mg-dependent Ca-stimulated adenosine triphosphatase in human erythrocyte membrane. *Biochem. J.* 194. 421-502.
- Karlish, S.J.D. (1980). Characterization of conformational changes in (Na K)-ATPase labelled with fluorescein at the active site, *J. Bioenerg. Biomember.* 12. 111-134.
- Kim, I. Ch. (1980). Isolation and properties of somatic and testicular cytochromes from rat tissues. *Arch. Biochem. Biophys.* 203. 519-526.
- Korn, E.D. & Hammer, J.A. (1988). Miosins of nonmuscle cells. *Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 17. 23-45
- Lagacè, L.; Chafouleas, J.G.; Trejo, R.; Delhumeau-Ongay, G. & Dedman, J.R. (1980). Calmodulin levels during rat testis development and intracellular localization in isolated cells. *Biol. Reprod.* 22. (Suppl. 1). 53 A.
- Larsen, F.L. Hinds, T.R. & Vincenzi, F.F. (1979). On the red cells Ca pump an estimate of stoichiometry. *J. Membrane. Biol.* 41. 361-375.
- Lenhinger, A. (1985). transporte activo a través de membrana. En "Bioquímica". Lenhinger, A. Ed Omega S.A. cap. 26. 790-838.
- Lichtman, A.H.; Segel, G.B. & Litchman, M.A. (1981). Calcium transport and calcium-ATPase activity in human lymphocyte plasma membrane vesicles, *J. Biol. Chem.* 256. 12-24
- Luterbacher, S. & Schatzmann, H.J. (1983). The site of action of La in the reaction cycle of the human red cell membrane Ca-pump ATPase. *Experimenta.* 39. 311-312.
- Luthra, M. (1982). Trifluoroperazine inhibition of calmodulin sensitive (Na + K) and Mg -ATPase activities of human red cells, *Biochim. Biophys. Acta.* 692. 271-277.
- McCartey R.E. & Fagan, J. (1973). Light stimulated incorporation of N-Ethylmaleimide into coupling factor in Spinach chloroplasts. *Biochemistry.* 12. 1503-1507
- McNamee, M.G. (1987). Isolation and characterization of cell membranes. *Biotechniques*, 7; 534-544.

- Means, A.R. & Hall, P.F. (1968). Protein biosynthesis in the testis II: Role of adenosine triphosphate (ATP) in stimulate by glucose. *Endocrinology* 63. 597-602.
- Meistrich, M.L. Trostle, P.L., Frapart, M. & Erichson. R.P. (1971). Biosynthesis and localitation of lactate dehydrogenase X in pachytene spermatocytes and spermatids of mause testis, *Dev. Biol.* 60. 428-441.
- Michaelis, E.K., Michaelis, M.L. Chang, H.H. & Kitos, T. (1983). High-affinity Ca<sup>2+</sup>-stimulated and microsomes, *J. Biol. Chem.* 258. 6101-6108
- Mills, N.C. & Means, A.R. (1972). Sorbitol dehydrogenase of rat testis: change of activity during development, after hipophysectomy and following gonadotropic hormone administration. *Endocrinology* 91. 147-156.
- Mollman, J.E. & Plesure, D.E. (1980). Calcium transportinghuman inside out erythrocyte vesicles. *J. Biol. Chem.* 255. 549-573
- Muallem, S. & Karlsh, S.D. (1979). Is the red calcium pump regulated by ATP?. *Nature.* 277. 238-245.
- Nichols. D. (1981). *TIBS.* 6. 36-43.
- Niggli, V. Adunyah, E.S., Penniston J.T. & Carafoli, E. (1981). Purified (Ca + Mg)-ATPase of the erythrocyte membrane. Reconstitution and efect of calmodulin and phospholipids. *J. Biol Chem.* 256. 395-415.
- Niggli, V.; Penniston, J.Y. & Carafoli, E. (1979). Purification of (Ca + Mg)-ATPase from human erythrocyte membrane using a calmodulin affinity column, *J. Biol. Chem.* 254. 9955-9983.
- Nishigaki, I., Chen, F.T. & Hokin, L.E. (1974). Studies on the characterization of the sodium-potassium transport adenosine triphosphatase. *J. Biol. Chem.* 249. 4911-4916.
- O'Neal, S.; Rhoads, D. & Racker, E. (1979). Vanadate inhibition of sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase and other ATPases. *Biochem. and Biophys. Research Commun.* 89. 845-850.
- Okumura, K. Lee, P.P. & Dixon, R.L. (1975). Permeability of selected drugs and chemical across the blood-testis barrier of the rat. *J. Pharmacol.* 37. 135-154
- Pederson, P.L. & Carafoli E.E. (1987). Ion motive ATPases. 11. Ubiquity properties and significanceto cell function. *TIBS.* 12. 146-150.

Pershad Singh, H.J.; McDaniel, M.L.; Landt, M.; Dry, C.G. Lacy, D.E. & McDonald, J.M. (1980). Ca-activated ATPase and ATP dependent calmodulin-stimulated Ca transport in islet cell plasma membrane, *Nature*. 288. 492-499.

Pershad Singh, H.J. & McDonald, J.M. (1980). A High-affinity calcium-stimulated magnesium-dependent adenosine triphosphatase in rat adipocyte membranes, *J. Biol. Chem.* 255. 4087-4093.

Putney, J.W. & Bird, G. (1973). The signal for capacitative calcium entry. *Cell*. 75. 197-201.

Quist, E.E. & Roufogalis B.D. (1977). Association of (Ca+Mg)ATPase activity with ATP-dependent Ca uptake in vesicles prepared from human erythrocytes. *J. Supramol. Struct.* 6. 375-387.

Quist, E.E. & Roufogalis, B.D. (1975). Determination of the stoichiometry of the calcium pump in human erythrocytes using lanthanum as selective inhibitor. *FEBS Lett.*, 50. 135-139.

Roufogalis, B.D. (1982). Specificity of trifluoroperazine and related phenothiazines for calcium-binding proteins. *Calcium and Cell Function*, 3. 127-132.

Roufogalis B.D.; Akyempson, Ch. K.; Al Jobore, A. & Minocherhomjee, A. M. (1986). Regulation of the Ca pump of the erythrocyte membrane. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 402. 349-361.

Rega, A. F. (1986). Activation by magnesium and by alkali metal ions. En "The calcium pump of plasma membranes". A. Rega y P.F. Garrahan. CRC Press Inc. Boca Ratón Florida. Cap. 9 pp 127-136.

Rega, A. & Garrahan, P. (1986). Calmodulin and other physiological regulators of the Ca pump. The calcium pump of plasma membranes. A. Rega y P.F. Garrahan Cap CRC Press, Inc. Boca Ratón, Florida. Cap. 10. 137-151.

Rega, A. & Garrahan, P. (1986). Partial reactions of the Ca-ATPase. En "The calcium pump of plasma membrane. A. Rega y P.F. Garrahan. CRC Press Inc. Boca Ratón Florida. Cap. 6. pp. 105-125.

Richards, D.E., Rega, A.F. & Garrahan, P.J. (1977). ATPase and phosphatase activities from human red cells membranes. I. The effects of N-ethylmaleimide. *J. Membr. Biol.* 35. 113-124.

Richards, D.E., Rega, A.F. & Garrahan, P.J. (1978). Two classes of site for ATP in the Ca-ATPase from human red cell membranes. *Biochim. Biophys. Acta.* 511. 194-201.

Richards, D.E.; Vidal, J.C.; Garrahan, P.J. & Rega A.P. (1977). ATPase and phosphatase activities from human red cell membrane, III The effect of phospholipases on Ca-dependent enzymatic activities. J. Membr. Biol. 35; 137-150.

Roelofsen, B. & Schatzmann, H.J. (1977). The lipid requirement of the (Ca + Mg) ATPase in human erythrocyte membrane, as studied by various highly purified phospholipase. Biochim. Biophys. Acta. 464; 17-36.

Rossi, J.; Garrahan, P. & Rega, A. (1981). Vanadate inhibition of active Ca transport across human red cell membranes. Biochem. Biophys. Acta. 640. 145-150.

Ronner, P. Gazzotti, E. (1977). A lipid requirement for the (Ca +Mg)-activated ATPase of erythrocytes membranes, Arch. Biochim. Biophys. 179; 578-597.

Sarkadi, B., Eneydi, A., Gárdos, G. (1980). Molecular properties of red cell calcium pump. Effects of calcium proteolytic digestion and drugs on the kinetics of active calcium uptake in inside-out red cell membrane vesicles. Cell Calcium 1; 287-293.

Sarkadi, B., Szász, I., Gerloczy, A. & Gárdos, G. (1977). Transport parameters and stoichiometry of active calcium ion extrusion in intact human red cells. Biochem. Biophys. Acta. 464. 93-107.

Scharff, O. (1981). Calmodulina and its role in cellular activation. Cell Calcium, 2. 1-17

Schatzmann, H. J. (1971). The lanthanides Ho and Pr as inhibitors of calcium transporting human red cells, Experimentia, 27. 59-65.

Schatzmann, H.J. (1973). Dependence on calcium pump in human red cells. J.Physiol. 235. 551-590.

Setchell, B.P. (1970). Testicular blood supply, lymphatic drainage and secretion of fluid. En: The testis. Eds. A.D. Johnson, W.R. Gomes & N.L. VanDemark. Academic Press. Vol.I. Cap. 3. 101-239.

Setchell, B.P. (1974). The entry of substances into the seminiferous tubules. En: Male fertility and sterility. Eds R.E. Mancini y L. Martini. Academic Press. Londres. 5. 37-57.

Setchell, B.P. (1980). The functional significance of blood-testis barrier. J. Andrology 1. 3-10.

Setchell, B.P., Davies, R.V. & Main, S.J. (1977). Inhibin. En: The testis. Eds. A.D. Johnson & W. R. Gomes. Academic Press. Londres. Vol. IV, Cap 6. 189-232.

- Setchell, B.P. & Singleton, H.M. (1971). The penetration of rubidium, sucrose and inulin into rat seminiferous tubules in vivo and in vitro. *J. Physiol.* 217. 5-16.
- Sorensen, R.G. & Mahler, H.R. (1981). Calcium-stimulated adenosine triphosphatases in synaptic membranes, *J. Neurochem.* 37. 1407-1411.
- Streb, H., Bayerdörffer, E., Haase, W., Irvine, R.F. & Schulz, I. (1984). Effect of inositol 1,4,5 Triphosphate on Isolated Subcellular fractions of rat pancreas *J. Membrane Biol.* 81. 241-253.
- Szász, I. Sarkadi, B., Schubert, A., & Gárdos, G. (1978). Effects of lanthanum on calcium-dependent phenomena in human red cells *Biochim. Biophys. Acta*, 512. 331-340.
- Szego, L.M.; Seeler, B.J. & Smith, R.E. (1976). Lysosomal cathepsin B1: partial characterization and recompartmentation in response to estradiol 17- $\beta$ . *Eur. J. Biochem.* 64. 463-469
- Tada, M., Kirchberg, A., Iorio, J.A.M. & Kataz, A.M. (1975). Control of cardiac sarcolemmal Adenylate cyclase and sodium, Potassium-activated Adenosine Triphosphatase activities *Circulation Res.* 36. C-17.
- Taverna, R.D. & Henahan (1980). Modulation of human erythrocyte Ca/Mg -ATPase activity by phospholipase A2 and proteases. A comparison with calmodulin, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 94. 652-698.
- Trejo, R. (1982). ATPasa-(Ca + Mg) y calmodulina durante la espermiogénesis. Tesis de maestría.
- Trejo, R. Turner, R. & Dedman, J.R. (1985). Changes in calmodulin mRNA during rat spermatogenesis. *J. Cell. Biol.* 101. 369.
- VanBelle, H. (1972). Kinetics and inhibition of alkaline phosphatases from canine tissues. *Biochim. Biophys. Acta* 289. 156-160
- Vale, M.G.P., Moreno, J.M. & Carvalho, A.P. (1984). Effects of calmodulin antagonists on the active Ca uptake by rate liver mitochondria, *Biochem. J.* 214. 929-935.
- Vernon. R.E., Go, V.L.M. & Fritz, I.B. (1971). Studies of spermatogenesis in rats. II evidence that carnitine acetyltransferase is a marker enzyme for the investigation of germ cell differentiation. *Can. J. Biochem.* 49. 761-767.

Vincenzi, F.F., Aboody, E.C., Niggli, V. & Carafoli, E. (1982). Purified red blood cell Ca<sup>2+</sup>-pump ATPase: evidence for direct inhibition by presumed anti-calmodulin drugs in the absence for calmodulin. *Cell Calcium*, 3. 545-562.

Vogl, W. (1990). Distribution and function of organized concentrations of actin filaments in mammalian spermatogenic cells and Sertoli Cells. *International rev. of cytol.* vol. 19. 1-56.

Volpe, P., Krause, K.H., Hashimoto, G., Zorzato, F., Pozzan, T., Meldolesi, J. & Lew, D.P. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85. 1091-1095. USA

Wang, T.; Tsai, L.; Solaro, J; Grassi, A. & Schwartz, A. (1979). Effects of Potassium on Vanadate inhibition of sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase from dog cardiac and rabbit skeletal muscle. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 91. 356-361.

Warrick, H.M. & Spudich, J.A. (1987). Myosin structure and function in cell motility. *Ann. Rev. Biol.* 3. 379-421

Watson, E.L., Vincenzi, F.F. & Davis P.W., (1971) Ca<sup>2+</sup>-activated membrane ATPase: selective inhibition by ruthenium red. *Biochim. Biophys. Acta.* 249, 606-610.

Webb, L.J. (1966). N-Ethylmaleimide. En "Enzyme and Metabolic Inhibitors", vol. III. Webbs. Cap. 3. 337-365.

Weiss, E. & Levin, R.M. (1978). Mechanism for selectively inhibiting the activation of cyclic nucleotide phosphodiesterase and adenylate cyclase by antipsychotic agents. *Adv. Cyclic nucleotide. Res.* 9. 285-303.

Zurini, M.; Krebs, J.; Penniston, J. & Carafoli, E. (1984). Controlled proteolysis of the purified Ca<sup>2+</sup>-ATPase of the erythrocyte membrane. *J. Biol. Chem.* 259. 618-627.

ANEXO

## PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

### 1.- Solución salina 0.9 % amortiguada con HEPES 20 mM

Se pesaron nueve gramos de NaCl y se disolvieron en 300 ml de agua destilada. Ambas soluciones (la solución salina y amortiguada con HEPES), se mezclaron y se aforó a un volumen final de 1 litro. Esta solución se esteriliza por filtración (filtro millipore de 0.22  $\mu$ M). Se puede mantener a 5°C durante 2 meses.

### 2.- Solución de sacarosa 0.25 M + HEPES 20 mM, pH 7.4

Se pesaron 85.575 g de sacarosa y se disolvieron en 250 ml de agua, también fueron pesados 4.76 g de HEPES y se disolvieron en 250 ml de agua, las soluciones así preparadas se juntaron y se llevaron a un volumen de 900 ml. Posteriormente se ajustó el pH de la solución a 7.4 con HCl a 1 N y se aforó por último a un litro. Se prepara al momento de su uso.

### 3.- Solución 80 mM KCl, 20 mM HEPES y 1 mM de EGTA, pH 7.5

Se pesaron 5.9648 g de KCl y se disolvieron en 250 ml de agua destilada, posteriormente, 4.766 g de HEPES fueron disueltos en 250 ml de agua destilada, por último, 0.3804 g de EGTA también se disolvieron en 250 ml de agua destilada; después, las tres muestras fueron mezcladas y se ajustó el pH a 7.5 con 1 N de HCl, para finalizar, se aforó esta solución a 1000 ml. Es posible mantenerla en refrigeración durante 2 meses.

### 4.- 1 % de Molibdato de amonio en 1.15 N de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, más 4 g de FeSO<sub>4</sub> por cada 100 ml de solución. (Solución para la determinación del Pi)

30.6 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> se diluyeron en 750 ml de agua destilada, también, 10 g de molibdato de amonio tetrahidratado fueron adicionados a la solución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Por último, esta mezcla se aforó a 1000 ml. Cada vez que se utilizó esta solución para determinar el Pi, fue necesario agregar 4 g de FeSO<sub>4</sub> por cada 100 ml de la mezcla.

### 5.- Leupeptina 100 $\mu$ M.

Debido a que la concentración utilizada es muy pequeña, y además, varía el volumen final del medio de homogeneización en cada fraccionamiento subcelular, se elaboró una solución stock de 1 mM. Se pesaron 0.1003 g de Leupeptina disolviéndose en 15 ml de agua destilada, aforándose después a 20 ml. Por último, por cada parte de esta solución de Leupeptina, se adicionaron 10 partes del medio de homogeneización.

## **6.-Antipaina 50 $\mu$ M.**

Debido a que se presenta el mismo problema que con la Leupeptina, se decidió realizar el mismo procedimiento, primero se pesaron 0.0139 g de Antipaina y se disolvieron en 15 ml de agua destilada, después se aforó esta solución en 20 ml obteniendo así una solución de Antipaina a una concentración de 1 mM. Al final, por cada 20 partes del medio de homogeneización se agregó una parte de esta solución de Antipaina.

## **7.-Inhibidor de Tripsina 100 $\mu$ g/ ml.**

Este inhibidor fue preparado fresco cada ocasión que se empleó. Dependiendo del volumen del medio de homogeneización obtenido, fue pesado y agregado directamente a dicho medio disolviéndolo completamente.

### **Preparación de soluciones para la técnica de "Purificación de Calmodulina"**

#### **1.- Amortiguador de Homogeneización. (0.04 M TRIS, 4 mM EDTA y 0.1 M de NaCl, pH 7.4)**

Se pesaron 4.8456 g de TRIS y se disolvieron en 250 ml de agua destilada, posteriormente 1.5208 g de EDTA fueron disueltos a su vez en 250 ml de agua destilada, después 5.8440 g de NaCl se disolvieron en 250 ml de agua destilada. Una vez preparadas estas soluciones, se mezclaron y se le ajustó el pH de 7.4 con HCl 1 N. A continuación se procedió a aforar esta preparación en 1000 ml con agua destilada.

#### **2.-Amortiguador de diálisis (0.04 M de TRIS, 0.1 M de NaCl y 0.5 ml/l de $\beta$ -mercaptoetanol. pH 7.4).**

Primero se pesaron 4.8456 g de TRIS los cuales fueron disueltos en 250 ml de agua destilada, a continuación se pesaron 5.8440 g de NaCl disolviéndose en 250 ml de agua destilada. Se unieron estas soluciones ajustando el pH de 7.4 con 1 N de HCl. El  $\beta$ -mercaptoetanol fue adicionado momentos antes de emplear este amortiguador y por último se aforó a 1000 ml.

#### **3.- Amortiguador de baja concentración de sales (0.075 M de NaCl, 0.04 M de TRIS y 2 mM de CaCl<sub>2</sub>. pH 7.4).**

Se pesaron 4.383 g de NaCl y se disolvieron en 250 ml de agua destilada, posteriormente 4.8456 g de TRIS fueron disueltos en 250 ml de agua destilada, en seguida, se disolvió una cantidad de 0.294 g de CaCl<sub>2</sub> en agua destilada, a continuación

se mezclaron las tres soluciones ajustando el pH a un valor de 7.4 con 1 N de HCl. Por último fue aforado este amortiguador a 1000 ml.

**4.- Amortiguador de alta concentración de sales (0.5 M de NaCl, 0.04 M de TRIS y 2 mM de CaCl<sub>2</sub>. pH 7.4)**

Se pesó una cantidad de 29.22 g de NaCl disolviéndose en 250 ml de agua destilada, después 4.8456 g de TRIS fueron disueltos en 250 ml de agua destilada, posteriormente 0.294 g de CaCl<sub>2</sub> se disolvieron en 250 ml de agua destilada, a continuación se juntaron y mezclaron ajustando el pH a 7.4. Este amortiguador se aforó a 1000 ml.

**5.- Amortiguador de elución (0.075 M de NaCl, 0.04 M de TRIS y 4 M de EDTA. pH 7.4).**

Este amortiguador fue preparado disolviendo 4.383 g de NaCl en 750 ml de agua destilada, a esta misma solución se le agregó una cantidad de 4.8456 g de TRIS para su disolución, así mismo, 1.5208 g de EDTA se disolvieron en esta solución. por último se ajustó el pH (7.4) con 1 N de HCl y se aforó a un volumen de 1000 ml.

**SOLUCIONES PARA LA DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS.**

**1.- Solución patrón de albúmina 100 µg/ml.**

Se pesaron 10 mg de albúmina y se aforaron a 100 ml con agua destilada procurando no agitar mucho la solución para evitar la formación de burbujas. Esta solución se puede guardar a 4°C por un mes.

**2.- Reactivo A.**

2 g de Tartrato doble de sodio y potasio más 100 g de bicarbonato de sodio fueron disueltos en 20 ml de agua destilada, posteriormente a esta solución se le agregó 50 ml de NaOH 1 N, para ser después aforada a 100 ml con agua destilada. Es posible almacenarla en un recipiente de plástico y mantenerla a temperatura ambiente por tres meses.

### 3.- Reactivo B.

Se pesaron 2 g de tartrato doble de sodio y potasio más un gramo de sulfato de cobre, llevándolo después a 50 ml con agua destilada, después se agregó 10 ml de NaOH 1 N y se aforó a 100 ml; así mismo, es posible almacenarla en un frasco de plástico y mantenerla a temperatura ambiente durante tres meses.

### 4.- Reactivo C.

1 ml del reactivo Folin-Cilcoteau 2 N se aforaron en 15 ml con agua destilada, esto con el fin de tener una concentración final de 0.15 N. Esta última solución necesariamente debe de ser preparada en el momento de su utilización.