

00346



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

**POSGRADO EN CIENCIAS
BIOLOGICAS**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Caracterización bioquímica de la H⁺ -ATPasa de la
membrana plasmática del hongo patógeno
Sporothrix schenckii.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE
MAESTRA EN CIENCIAS
(**BIOLOGÍA CELULAR**)

PRESENTA
BIOL. DOLORES MINERVA MORA CABRERA

DIRECTORA DE TESIS: DRA. HAYDEE TORRES GUERRERO

MEXICO, D.F.

MARZO, 2004



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.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Hora Cabrera Dolores Minerua

FECHA: 16/Marzo, 2021

FIRMA: D. Minerua Hora C.

Esta tesis se realizó en el Laboratorio de Genética y Biología Molecular de Hongos del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina, UNAM, bajo la dirección de la Dra. Haydée Torres Guerrero.

Agradecimientos

A mis padres por su confianza.

A mis hermanos por su comprensión y apoyo.

Al CONACYT por el otorgamiento de la beca que me permitió realizar mis estudios de Maestría.

A todos los integrantes del laboratorio de genética y biología molecular de hongos, que en su momento, hicieron agradable mi estancia en el laboratorio.

Y finalmente a todas aquellas personas que contribuyeron a que se cumpliera este objetivo.

ABREVIATURAS

ATP	Trifosfato de adenosina
ADP	Difosfato de adenosina
BSA	Albúmina sérica bovina
BRIJ58	Poliaxietilén-20-cetil-éter
CCCP	Carbonilcianil-m-clorofenil-hidrozona
EDTA	Ácido etilenediaminotetracético
EGTA	Ácido etilenglicol-bis (β aminoetil-éter) N,N,N'N' tetra-acético
H ⁺ -ATPasa	ATPasa de protones de la membrana plasmática
kDa	Kilodaltones
Mes	Ácido monohidratado 2-N-morfolino-etano-sulfónico
NaN ₃	Azida de sodio
Na ₃ VO ₄	Ortovanadato de sodio
pHi	pH intracelular
Pi	Fosfato inorgánico
PMSF	Fenil-metil-sulfonil-fluoruro

ÍNDICE

	Página
I. INTRODUCCIÓN	1
ATPasas tipo P	1
Clasificación	2
La H ⁺ -ATPasa de membrana plasmática en los hongos	3
Organización genómica del gen que codifica para la H ⁺ -ATPasa	4
Relación estructura-función de la proteína	6
Regulación de la actividad de la H ⁺ -ATPasa con la glucosa	8
Mutantes resistentes a Na ₃ VO ₄	10
<i>Sporothrix schenckii</i>	10
Antecedentes	12
II. OBJETIVO	16
III. MATERIALES Y MÉTODOS	17
Material biológico	17
Mantenimiento de la cepa	17
Crecimiento de la cepa	17
Fase micelial	17
Fase de levadura	17
Preparación de fracciones enriquecidas en membranas plasmáticas	18
Tratamiento con enzimas líticas	18
Rompimiento celular	18
Obtención de la fracción enriquecida en membranas plasmáticas	19
Determinación de la proteína	19
Determinación de la actividad de la 5'nucleotidasa	19
Determinación de la actividad de la ATPasa mitocondrial	20
Determinación de la actividad de la ATPasa de la membrana plasmática	20
Determinación del pH óptimo	20
Determinación de las constantes cinéticas de la H ⁺ -ATPasa	21
Determinación de la constante de inhibición (K _i) de la H ⁺ -ATPasa	21

	Página
Cálculo de las constantes cinéticas	21
IV. RESULTADOS	22
Actividad del marcador de la membrana plasmática 5'nucleotidasa	22
Actividad de hidrólisis de ATP que es sensible a la azida o al vanadato en el micelio	22
Actividad de hidrólisis de ATP que es sensible a la azida o al vanadato en la levadura	23
Fracción enriquecida en membranas plasmáticas en micelio y levadura	24
Efecto de los componentes del medio de reacción en la actividad de la H ⁺ -ATPasa	29
Determinación del pH óptimo	31
Determinación de la constante de inhibición Ki	32
Determinación de los parámetros cinéticos	34
V. DISCUSIÓN	38
VII. CONCLUSIONES	43
VII. BIBLIOGRAFÍA	44
APÉNDICE	I

RESUMEN

Sporothrix schenckii es un hongo patógeno de humano que tiene la capacidad de cambiar de una forma micelial a una de levadura dependiendo de las condiciones del medio. *In vitro* este hongo responde a cambios ambientales, siendo el pH del medio el factor determinante de la morfología celular. En condiciones ácidas (pH 5.5) crece como filamentos y en condiciones alcalinas (pH 7.2) crece como levaduras. Una enzima importante en el mantenimiento del pH intracelular y la morfogénesis es la H⁺-ATPasa de membrana plasmática. En algunos hongos patógenos como en *Candida albicans* se ha demostrado que la H⁺-ATPasa tiene un papel importante en el dimorfismo celular.

En este trabajo se caracterizó a la H⁺-ATPasa de la membrana plasmática del micelio y la levadura determinando los parámetros cinéticos de la enzima a partir de una fracción enriquecida en membranas plasmáticas. Se obtuvo una fracción enriquecida en un 72% en membranas plasmáticas para la fase del micelio y un 66% para la de levadura. Una característica importante es la inhibición de la actividad de la enzima por vanadato (Na₃VO₄) que es un inhibidor clásico de estas ATPasas. La inhibición de la actividad fue diferente para la H⁺-ATPasa del micelio se obtuvo una K_i de 25 μM y para la de la levadura fue de 15 μM. Ésto indica que la H⁺-ATPasa del micelio requiere de una concentración mayor del inhibidor que la de la levadura.

La enzima requiere ATP y Mg²⁺ para llevar a cabo su actividad. La hidrólisis del ATP tiene un comportamiento de cinética Michaelis-Menten con una K_m de 1.4 mM para el micelio y 1.1 mM para la de la levadura y una V_{max} de 0.55 y de 0.62 μmol min⁻¹ mg⁻¹ de proteína para el micelio y la levadura respectivamente.

La H⁺-ATPasa del micelio tiene una actividad específica de 443.7 nmolas min⁻¹ mg⁻¹ y de 561.1 nmolas min⁻¹ mg⁻¹ para la levadura.

Por sus características bioquímicas (pH óptimo entre 6.5 a 7.0), sensibilidad al inhibidor y constantes cinéticas de la H⁺-ATPasa de *S. schenckii* puede ser considerada una ATPasa de tipo P. Los resultados obtenidos muestran que la actividad de la H⁺-ATPasa es similar en el micelio y en la levadura.

I. INTRODUCCIÓN

ATPasas tipo P

Las ATPasas tipo P constituyen una superfamilia importante de bombas iónicas, presentes tanto en procariontes como eucariontes. Están involucradas en el transporte de una gran variedad de cationes inorgánicos como K^+ , Na^+ , H^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} a través de la membrana celular (Moller *et al.*, 1996, Kühlbrandt *et al.*, 1998, Morsomme *et al.*, 2000, Lingrel, 2001). Un pequeño grupo de enzimas de esta familia también están involucradas en la translocación de aminofosfolípidos (Tang *et al.*, 1992).

Una característica importante de estas bombas es que durante su ciclo de reacción se forma transitoriamente un intermediario catalítico fosforilado covalente llamado "aspartil-fosfato". Durante la fosforilación la enzima se encuentra en un estado conformacional llamado E2 y después de la desfosforilación, la enzima retorna a un estado E1, de esta manera se lleva a cabo la hidrólisis del ATP y la translocación del ión. Este cambio conformacional es conocido como E2-E1 (Goffeau y Slayman, 1981, Serrano, 1988, 1993).

La dilucidación de la estructura tridimensional de dos miembros de esta superfamilia es un gran avance en el conocimiento del mecanismo molecular de estos transportadores. La estructura de la Ca^{2+} -ATPasa se ha obtenido a partir del procesamiento de imágenes de cristales tubulares de la ATPasa de retículo sarcoplásmico de músculo a una resolución de 8 Å (Zhang *et al.*, 1998, Toyoshima *et al.*, 2000).

En el caso de la estructura de la H^+ -ATPasa de *Neurospora crassa*, ésta fue obtenida a partir de la difracción de rayos X de cristales de dos dimensiones crecidos en la superficie de una película de carbono (Aver *et al.*, 1998).

Un análisis de ambas estructuras muestra que son similares en dimensiones y distribución de masa con respecto a la membrana. En ambas proteínas el 70% del total del polipéptido se encuentra en la región citoplasmática y solo una pequeña región es exocitoplasmática (Kühlbrandt *et al.*, 1998).

Las 10 hélices transmembranales tienen un arreglo muy similar en ambas moléculas, teniendo diferencias solo en su región citoplasmática. Se ha sugerido que dicha diferencia puede estar dada por la presencia de dos asas citoplasmáticas pequeñas en la ATPasa de protones, o bien que presentan estados conformacionales diferentes en el sitio catalítico (Scarborough, 1999).

Clasificación

Basados en los dominios conservados y en sus perfiles de hidropatía Lutsenko y Kaplan (1995) clasificaron en tres grupos a las ATPasas tipo P:

ATPasas P1. Son ATPasas que están formadas por 6 a 8 segmentos transmembranales y únicamente un par de segmentos están localizados hacia el extremo carboxilo. Una característica importante es que presentan de 1 a 6 motivos conservados de "unión a metales" (GTMCXXC o M/HXXM, DHS/GXM) en el extremo amino de la molécula. A este grupo pertenecen las Cd^{2+} -ATPasas bacterianas con una masa molecular aparente de 70 a 85 kDa y la Cu^{2+} -ATPasa de humanos, cuya deficiencia genera el desarrollo de la enfermedad de Wilson y Menkens.

ATPasas P2. A Este grupo pertenecen ATPasas que no transportan metales. Están formadas por una subunidad catalítica y 8 a 10 segmentos transmembranales, tienen un par de segmentos hidrofobicos localizados hacia el extremo amino y cuatro segmentos transmembranales hacia el extremo carboxilo de la molécula. Este grupo puede ser dividido en dos subgrupos:

Ila) Al cual pertenecen la H^+/K^+ -ATPasa, Na^+/K^+ -ATPasa, que se caracterizan por estar formadas por una heterodímero, es decir tienen una subunidad catalítica α y una subunidad glicosilada β .

Ilb) Son un grupo de enzimas con una masa molecular de 100-135 kDa, se caracterizan por estar formadas por una subunidad la cual tiene un largo tallo hidrofílico en el extremo carboxilo que regula la actividad de la enzima. A este subgrupo pertenecen las Ca^{2+} -ATPasas involucradas en la regulación celular de calcio en membranas plasmáticas y en retículo endoplásmico, la Mg^{2+} -ATPasa de *Salmonella* (MgtA y MgtB) y la H^+ -ATPasa de hongos y plantas.

ATPasas P3. Éste último grupo incluye solamente a la KdpABC-ATPasa, su sitio catalítico KdpB es esencialmente corto en la región C-terminal y en esta parte de la molécula se parece a las ATPasas transportadoras de metales, sin embargo no tiene motivos de unión a metales en el extremo amino. Ésta proteína es parte de una maquinaria compleja y no funciona como una sola subunidad.

Posteriormente utilizando análisis de secuencias y relaciones filogenéticas Fagan y Saier (1994) las clasificaron en cuatro grupos. Basados en esta clasificación y en el análisis de las subunidades catalíticas de 159 ATPasas Axelsen y Palmgren (1998) las clasificaron en 5 grupos:

Tipo I. Incluye ATPasas transportadoras de metales y la K^+ -ATPasa de bacterias.

Tipo II. Se encuentran las bombas de Ca^{2+} , Na^+ , K^+/H^+ , K^+ .

Tipo III. Agrupa básicamente a las H^+ -ATPasas.

Tipo IV. Lo forman las bombas de fosfolípidos.

Tipo V. Incluye las ATPasas de función desconocida.

La H^+ -ATPasa de la membrana plasmática en los hongos

La H^+ -ATPasa de la membrana plasmática es la enzima que cataliza la reacción de ATP a ADP + Pi, utilizando la energía liberada para transportar protones del interior de la célula al medio extracelular generando así un gradiente electroquímico. Dicho gradiente a la vez es usado por algunos acarreadores específicos o canales para transportar los iones y los nutrientes a través de la membrana celular (transporte secundario).

La H^+ -ATPasa es la proteína más abundante en la membrana plasmática y se estima que en el caso de las levaduras consume hasta un 60% del ATP celular total (Ambesi *et al.*, 2000).

El reconocimiento de la existencia de la H^+ -ATPasa en la membrana plasmática en los hongos se logró después de numerosas observaciones fisiológicas hechas en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Willsky, 1979, Wach *et al.*, 1990) y en el hongo filamentoso *N. crassa* (Bowman *et al.*, 1981 a, b, Bowman, 1983).

En los primeros estudios se describió como una enzima translocadora de protones, que cataliza la hidrólisis de ATP con la fosforilación de un residuo de

ácido aspártico de manera parecida a la Na^+/K^+ -ATPasa y a la Ca^{2+} -ATPasa. La enzima forma un intermediario fosforilado, β -aspartilfosfato que es esencial para la catálisis; de ahí su clasificación como una ATPasa tipo P (Amory y Goffeau, 1982; Wach *et al.*, 1990). Posteriormente los estudios hechos con anticuerpos (Bowman Bowman, 1986; Monk *et al.*, 1991) y con digestiones con tripsina (Scarborough y Hennessey, 1990) aunados al análisis de la hidropatía, establecieron que la H^+ -ATPasa esta formada por un sólo polipéptido con una masa molecular aparente de 100 kDa embebido firmemente en la bicapa lipídica. La mayor parte de la proteína se encuentra localizada en la región citoplasmática formando una gran asa central hidrofílica comprendida entre los segmentos M4 y M5 y una asa pequeña entre los segmentos transmembranales M2 y M3. Los dos extremos, el amino y el carboxilo se localizan en el citoplasma. La proteína esta anclada a la membrana por 10 segmentos hidrofóbicos, cuatro de ellos (segmentos M1 a M4) se encuentran hacia el extremo amino terminal y seis (segmentos M5 a M10) hacia el extremo carboxilo. Los segmentos están involucrados en la formación del canal a través del cual son translocados los protones.

Organización genómica del gen que codifica para la H^+ -ATPasa

La H^+ -ATPasa en *S. cerevisiae* está codificada por el gen *pma1*. Un segundo gen el *pma2* también codifica para la ATPasa y es homólogo a *pma1*. La proteína PMA2 se expresa en un nivel bajo y su función fisiológica no se conoce bien (Schlesser *et al.*, 1988). La falta de *pma1* es letal y varios estudios han establecido que la ATPasa es esencial para el crecimiento celular.

Un análisis de las secuencias de aminoácidos y mapeo de residuos de 10 genes *pma1* y *pma2* de diferentes hongos reveló que únicamente un 40% de los residuos están conservados en ambos genes (Ambesi *et al.*, 2000).

Poco se conoce de la región promotora del gen *pma1* y de los mecanismos que regulan la expresión del gen. En la región promotora de *pma1* de *S. cerevisiae* se han encontrado secuencias río arriba de esta región que están implicadas en la regulación del gen. Utilizando la técnica de la nucleasa S1, se mapeó el sitio de inicio de la transcripción que se encuentra alrededor del nucleótido -233 río arriba

de la región promotora, además de otros sitios que son reconocidos por el factor de transcripción TUF/RA1/GRF1 (-892 a -882 y -795 a -785). Análisis hechos por computadora revelaron posibles sitios de unión a factores de transcripción: *gcr1* que es un factor que regula genes que codifican para enzimas glicolíticas (en la posición -935 a -927), mientras que *mcm1* (en la posición -709 a -694) regula una gran variedad de genes como los del ciclo celular (Portillo, 2000).

Recientemente se ha demostrado que la expresión de *pma1* esta bajo el control de GLN3 que es un factor de la transcripción de la familia GATA que tiene dedos de zinc. GLN3 se une a las secuencias GATAA en la posición -815 a -811. Este factor es un activador transcripcional de los genes que se requieren para la incorporación y degradación de algunas fuentes de nitrógeno como la prolina (Cox *et al.*, 1999).

En el ámbito de la regulación transcripcional poco se conoce. Esta regulación se ha visto que puede ser controlada por el factor de transcripción TUF/RAP1/GRF1 modulado por glucosa. Se han obtenido mutaciones en otros siete genes designados arbitrariamente *apa1-apa7* ("genes affecting plasma membrane ATPase activity"). De éstos, *apa1* fue clonado por complementación. Se ha observado que la supresión de este gen causa una disminución en el nivel de la H⁺-ATPasa. La anulación de este gen no afecta la expresión de otros genes regulados por TUF, lo que sugiere que otra vía podría también controlar la expresión de *pma1*, además del factor transcripcional TUF/RAP1/GRF1 (García-Arranz *et al.*, 1994).

Otro gen que se ha descrito es el *yorg137c* (*apa7*) que codifica para una proteína de membrana de 71.8 kDa cuya función es desconocida. El análisis del fenotipo de células mutadas en este gen muestra un ligero crecimiento en medio ácido y una reducción en la actividad de la H⁺-ATPasa. Por análisis de inmunoréplicas tipo Western se observó que los niveles de PMA1 no cambiaron. Al analizar el efecto de la mutación en los parámetros cinéticos no se observó el incremento en la V_{max} cuando las células se hacen crecer en glucosa. Aunque todavía no es clara su función, se sugiere que el producto del gen *yorg137c* tiene un papel en el incremento de la V_{max} (De la Fuente *et al.*, 1997).

Relación estructura-función de la proteína

La H⁺-ATPasa en *S. cerevisiae* es una proteína que está constituida por 918 aminoácidos de los cuales 212 han sido sustituidos y con ello se ha establecido el papel funcional de un gran número de residuos de aminoácidos de la proteína (Morsomme *et al.*, 2000).

Los residuos conservados se encuentran distribuidos tanto en la asa citoplasmática pequeña como en la asa grande. Sesenta aminoácidos del segmento transmembranal M4 constituyen la región de fosforilación. Sesenta aminoácidos del tallo del segmento 5 (S5) y el segmento M6 son esenciales para el mecanismo. Los segmentos del tallo M4 y M5 constituyen el dominio central catalítico de la enzima y probablemente participan en transmitir el cambio conformacional E1-E2 (Ambesi *et al.*, 1998, Miranda *et al.*, 2001).

El primer y segundo segmento transmembranal (M1 y M2) están unidos por la asa citoplasmática pequeña. Esta estructura tiene un papel en la inserción del polipéptido a la membrana lipídica durante la biogénesis. También juega un papel importante en el mecanismo catalítico de la enzima, por lo que no es sorprendente que la supresión de los 114 aminoácidos que forman la asa provoque un fenotipo letal recesivo.

Un residuo muy conservado en las ATPasas de tipo P es la A135 que se localiza en la asa pequeña del M1 y el M2. La sustitución en este residuo afecta la actividad de la enzima además de conferirle resistencia a higromicina (Na *et al.*, 1993).

En el caso del segmento transmembranal M3, sólo una mutación L298F ha sido aislada como un supresor de la mutación S368F (Petrov y Slayman, 1995); sugiriendo la posible interacción del M3 con la asa citoplasmática grande.

Los segmentos transmembranales M4, M5, M6 y M8 son de particular interés porque en otras ATPasas (Ca²⁺-ATPasa, Na⁺/K⁺-ATPasa) juegan un papel crítico en la unión del catión y el transporte del mismo.

El residuo V336 ocupa la posición que corresponde al E309 de la Ca²⁺-ATPasa y el E327 de la Na⁺/K⁺-ATPasa en los cuales una mutación afecta el transporte del catión en ambas ATPasas. En el caso de la H⁺-ATPasa no juega un papel

importante porque el cambio V336A no afecta el bombeo de protones (Morsomme *et al.*, 2000).

El residuo E703 es el equivalente a el E771 de la Ca^{2+} -ATPasa y al E779 de la Na^+/K^+ -ATPasa. Las mutaciones en este residuo producen una disminución en la unión del catión al sitio de alta afinidad y el transporte del catión. En el caso de la enzima de la levadura un cambio a glutamina o leucina produce un desacoplamiento parcial, lo que sugiere que no tiene un papel esencial, pero si participa en el transporte de protones (Ambesi *et al.*, 2000).

La S699 es un residuo también de interés porque está conservado en las ATPasas tipo P. Es el equivalente a la S769 de la Ca^{2+} -ATPasa donde al parecer no tiene un papel directo en la unión del calcio. En el caso de la Na^+/K^+ -ATPasa es el equivalente a la S775 donde un cambio en este aminoácido provoca una disminución en la unión del Na^+ y del K^+ . En la enzima de la levadura un cambio en esta serina por alanina o cisteína produce un modesto cambio en la actividad que depende del pH, lo que sugiere que tiene un papel en la modulación del transporte de los protones (Dutra *et al.*, 1998).

El extremo amino es el más variable en todas las ATPasas tipo P tanto en secuencia como en longitud. En la H^+ -ATPasa la supresión de los residuos del uno hasta el veintisiete no afecta la actividad de la enzima, ni responde a cambios con glucosa (Mason *et al.*, 1998).

La asa citoplasmática grande esta formada por 347 residuos localizados entre el segmento M4 y M5. Incluye los dominios requeridos para la unión al ATP y para la formación del intermediario fosforilado (Morsomme *et al.*, 2000).

Los estudios del dominio de fosforilación indican que este dominio es importante para el plegamiento, la biogénesis y la actividad catalítica de la enzima. El D378 es un residuo muy conservado y la mutación del mismo da como resultado un fenotipo letal dominante (Wach *et al.*, 1996, Portillo, 1997, Nakamoto *et al.*, 1998). Las sustituciones D378N, D378S y D378E producen proteínas sensibles a la tripsina, lo que sugiere un plegamiento defectuoso de estas proteínas (Nakamoto *et al.*, 1998).

Como se puede observar, los residuos más conservados de la H⁺-ATPasa están distribuidos en seis (M1, M2, M4, M5, M6 y M8) de los 10 segmentos transmembranales. Sin embargo todavía no está muy claro exactamente que residuos participan directamente en el transporte de protones (Morsomme *et al.*, 2000).

Regulación de la actividad de la H⁺-ATPasa con la glucosa

La actividad de la H⁺-ATPasa en los hongos es regulada por un gran número de factores ambientales. La glucosa es una de las señales externas más ampliamente estudiada. La glucosa regula la actividad de la enzima a dos niveles: incrementa la síntesis del RNA mensajero (García-Arranz *et al.*, 1994) y activa la H⁺-ATPasa disminuyendo la K_m, incrementando la V_{max} y el pH óptimo cambia a valores neutros (Eraso y Portillo 1994, Mason *et al.*, 1998, Portillo, 2000).

La H⁺-ATPasa es activada *in vivo* cuando se adiciona glucosa a células en ayuno. El extremo carboxilo está formado por 46 residuos que tienen un papel importante en la regulación con glucosa en la actividad de la enzima (Serrano, 1983). La supresión del extremo carboxilo genera una enzima que se muestra activada constitutivamente y que tiene parámetros cinéticos similares a los observados cuando la proteína silvestre es activada con glucosa. En este dominio hay dos residuos la S911 y la T912 que son conservados en las H⁺-ATPasas. Un cambio en cualquiera de estos residuos disminuye la activación de la enzima con la glucosa. La doble mutación S911A/T912A provoca que la ATPasa no se active con glucosa (Eraso y Portillo, 1994).

Mediante un análisis de las mutaciones intragénicas que tienen un efecto supresor de la doble mutante S911A/T912A se identificaron varios dominios que están involucrados en la activación de la H⁺-ATPasa con la glucosa. Estos dominios se localizan en la región del tallo, en la región de unión del ATP y en el dominio regulatorio del extremo carboxilo. El extremo carboxilo puede interactuar directa o indirectamente con estos dos dominios para inhibir la actividad. La interacción con la región del tallo puede bloquear el acceso de los protones al sitio de transporte y la interacción con el dominio de unión del ATP puede limitar el acceso del sustrato.

La glucosa puede disparar una modificación de la enzima a través de la fosforilación de la T912 lo cual a su vez puede liberar dichas interacciones, lo que da como resultado la activación de la enzima (Eraso y Portillo, 1994). Aunque la T912 es un sitio de fosforilación para la proteína cinasa dependiente de calmodulina/ Ca^{2+} (Serrano *et al.*, 1992) no se ha identificado que esta proteína-cinasa esté involucrada en la fosforilación de la ATPasa. Sólo se sabe que la vía de la proteína-cinasa-cAMP-RAS no está involucrada en la activación inducida con la glucosa (Becher dos Passos *et al.*, 1992). Recientemente se demostró que la proteína cinasa involucrada en la regulación de otras proteínas de la membrana plasmática podría estar relacionada con la activación de la H^+ -ATPasa inducida con la glucosa (Goossens *et al.*, 2000).

Se ha demostrado que la activación de la H^+ -ATPasa requiere la presencia de Snf3p (un sensor de glucosa), Gpa2 (una proteína G) y la participación de PKC. La señal interna generada con la fosforilación del azúcar se puede transmitir a través de Gpa2 generándose un segundo mensajero que activa la PKC y como consecuencia se fosforila y activa la H^+ -ATPasa (Souza *et al.*, 2001).

En contraste con el papel de la glucosa en la regulación de la H^+ -ATPasa de levaduras, en el hongo patógeno *Candida albicans* (Monk *et al.*, 1993) y también en *Ureomyces fabae* (Struk *et al.*, 1996) la H^+ -ATPasa responde poco a la glucosa. La regulación de la enzima en estos hongos es a través de señales morfogenéticas principalmente.

En los hongos halotolerantes *Zygosaccharomyces rouxii* y *Torulopsis versatilis* la H^+ -ATPasa es regulada con el NaCl en lugar de la glucosa. La acidificación del medio durante el crecimiento de la levadura de estos hongos provoca una disminución en el pH citosólico, lo cual activa la ATPasa. Esta activación es diferente a la producida con la glucosa y se debe a un cambio en la K_m sin que la V_{max} y el pH óptimo se modifiquen (Carmelo *et al.*, 1997, Portillo, 2000).

En el caso de *Aspergillus nidulans* se ha observado que los parámetros cinéticos no se ven alterados con la glucosa. En el extremo carboxilo de esta proteína no están los residuos (S911 y T912) que son esenciales para la activación con la glucosa (Abdallah *et al.*, 2000).

En el hongo *Cryptococcus neoformans* se obtuvo un cDNA que codifica para la H⁺-ATPasa del hongo. El cDNA se expresó en un sistema de expresión heterólogo y estudiaron las propiedades cinéticas de la enzima. En este trabajo se observó que no hay un efecto claro de activación de la enzima con la glucosa (Gorgojo *et al.*, 2000).

Mutantes resistentes a Na₃VO₄

El ortovanadato inorgánico (Na₃VO₄) es un inhibidor clásico de las ATPasas tipo P y actúa como un análogo del fosfato inorgánico (Pi). Se une fuertemente en el sitio de la enzima que une el Pi en el estado conformacional E2, lo que ocasiona un bloqueo del ciclo de reacción (Morsomme *et al.*, 2000).

Cambios en la secuencia del polipéptido de 100 kDa confieren resistencia al Na₃VO₄. Las mutaciones que dan a la enzima una gran resistencia al inhibidor se encuentran en el extremo de la asa pequeña entre segmentos M4 y M5. Si bien los residuos afectados se encuentran distantes en la estructura primaria de la ATPasa es probable que varios de ellos estén cercanos en la estructura terciaria y definan el sitio de unión del Pi (Ulaszewski *et al.*, 1987, Morsomme *et al.*, 2000).

La resistencia a la inhibición por Na₃VO₄ está acompañada frecuentemente por cambios en los parámetros cinéticos, como una disminución en la K_m y un aumento del pH óptimo. Las mutaciones en 9 residuos consecutivos de la región del tallo 4 elevan la IC₅₀ para Na₃VO₄ de 1 μmol l⁻¹ a 10-200 μmol l⁻¹ y disminuyen la K_m para el ATP-Mg²⁺ de 1.5 nmol l⁻¹ a 0.1-0.5 nmol l⁻¹. Estas alteraciones en las propiedades cinéticas sugieren que esta región juega un papel crítico durante la transición conformacional E1⇒ E2 (Ambesi *et al.*, 2000).

Sporothrix schenckii

S. schenckii es un deuteromiceto que tiene una amplia distribución mundial. Es el agente etiológico de la esporotricosis, que es la micosis subcutánea humana más importante en México. Esta micosis es de evolución subaguda o crónica, ataca la piel y el tejido subcutáneo. Cuando hay diseminación afecta también las articulaciones, el hueso, el sistema nervioso central y las vías genitourinarias. Se

adquiere generalmente como consecuencia de un traumatismo en la piel y el contacto con material de origen vegetal que está contaminado con la forma saprofita del hongo (hifas y conidios). Al penetrar en el hospedero la hifa cambia su morfología desarrollando las levaduras que son la forma parasitaria del hongo (Rippon, 1990).

El primer caso de esporotricosis se dió a conocer en 1898 por Schenck en el hospital Johns Hopkins en Baltimore. Aunque actualmente es rara en Europa, durante la primera década del siglo XX Francia fue considerada como zona endémica. Los estudios hechos por Beurmann, Raymond y Gougerot contribuyeron al conocimiento del hongo y establecieron el uso de yoduro de potasio como tratamiento para curar esta micosis (Kwon-Chung y Bennett, 1992).

La esporotricosis tiene una distribución mundial, es frecuente en Japón, Australia y Sudáfrica. En América se ha encontrado en Estados Unidos, Canadá, Uruguay, Brasil, Colombia, Venezuela. En México las principales zonas endémicas son Puebla, Jalisco y el Distrito Federal (Velasco y González 1976, Lavallo, 1979, Espinosa-Taxis *et al.*, 2000).

Por su frecuencia y aspecto clínico de las lesiones, la esporotricosis se ha considerado como una micosis ocupacional debido a que la mayoría de los pacientes la adquieren durante sus actividades de trabajo. No existe una relación con el sexo y edad de los pacientes que presentan la infección producida por el hongo (Lavallo 1979, Espinosa-Taxis *et al.*, 2000).

S. schenckii es un hongo al cual no se le ha encontrado una reproducción sexual. Se encuentra como saprófito micelial en el suelo y es muy resistente a la desecación. Cuando crece a 28°C *in vitro* en un medio de cultivo sólido, forma colonias membranosas con bordes bien delimitados. El color de la colonia se torna de color pardo oscuro o negro dependiendo de la cepa. Microscópicamente se observan hifas septadas, hialinas, de aproximadamente 2 a 3 µm de diámetro. Los conidios que produce son de dos tipos: hialinos y pigmentados. Los conidios hialinos son ovales, elípticos o piriformes, su tamaño varía de 2 a 6 µm y son producidos por el conidióforo. Los conidios pigmentados son esféricos, ovales o triangulares de 2 a 4 µm de diámetro y son producidos a lo largo de las hifas. El

conidióforo es alargado y estrecho, es de 1 a 2 μm de diámetro, y en la parte apical se forman los simpodio-conidios que adoptan un arreglo de “flor de margarita”.

Las colonias que se obtienen de la forma parasitaria o levaduriforme del hongo crecen en medios complejos a 37°C. Son levaduras redondas ovoides o en forma de “cigarro”. En el microscopio se observan como células fusiformes u ovoides uní o bí gemantes con un diámetro de 1 a 10 μm (Kwon-Chung y Bennett, 1992).

Antecedentes

Una variedad de factores ambientales influye en el dimorfismo de *S. schenckii*, y entre los más importantes se encuentran el medio de cultivo, la temperatura y el pH. El mantenimiento de la homeostasis del pH intracelular (pHi) es muy importante para el funcionamiento correcto de la célula. Se sabe que los cambios en el pHi afectan la forma de la célula, la transición morfológica, el ensamblado del citoesqueleto; la agregación y la segregación en una gran variedad de células (Denison, 2000).

Las levaduras, a pesar de tener un pH externo bajo, son capaces de mantener su pHi cercano a la neutralidad que mantiene en condiciones óptimas el funcionamiento de sus vías metabólicas. La habilidad de las levaduras para crecer a concentraciones altas del ion H^+ , refleja la capacidad para mantener el pH interno bombeando protones. La enzima dedicada al mantenimiento del pHi es la H^+ -ATPasa de la membrana plasmática. Debido a la importancia del mantenimiento del pHi esta enzima es esencial para el crecimiento (Bracey *et al.*, 1998).

En general se acepta que la H^+ -ATPasa en la membrana plasmática de las levaduras es activada cuando las células se exponen a un pH ácido y esta enzima contribuye al mantenimiento de la homeostasis del pHi (Carmelo *et al.*, 1996, 1997). En el caso de algunos hongos, estos cambios en el pHi se han correlacionado con la transición dimórfica.

En 1999, Brown y Gow sugirieron que el pH interno estaba asociado con el dimorfismo. Previamente se había demostrado que la alcalinización citoplasmática

que acompaña la formación del tubo germinativo se inhibía con dietilestilbestrol, un inhibidor de la ATPasa de la membrana plasmática; lo que sugería que el aumento en el pH interno era debido a un bombeo activo de protones por esta enzima. En *C. albicans* se sabe que el pH citoplasmático se incrementa de 6.8 a 8.0 cuando las células se hacen crecer en condiciones que normalmente inducen la formación del tubo germinativo. En estas condiciones las mutantes que no pueden cambiar de forma su pH interno únicamente cambia 0.3 unidades. La cepa silvestre acidifica más rápidamente el medio de cultivo que las cepas alteradas en el crecimiento dimorfo. Estos resultados sugieren que el control de pH interno está asociado con el dimorfismo (Stewart *et al.*, 1989).

Previamente se había reportado que *C. albicans* puede formar tubos germinativos en un intervalo de pH de 6 a 8 y que los cambios en el pH pueden regular la formación del tubo germinativo. Si bien el pH no regula directamente el dimorfismo en este hongo, sí tiene un papel importante en este proceso.

En 1991, Kaur y Mishra estudiaron en células permeabilizadas de *C. albicans* la actividad de la H⁺-ATPasa de la membrana plasmática durante el dimorfismo inducido con un cambio en el pH. Observaron que la actividad de la H⁺-ATPasa aumentó durante la formación del tubo germinativo y la gemación, coincidiendo con el tiempo de evaginación (135 min). El micelio presentó una mayor actividad comparada con la levadura. En la levadura la actividad inicial fue de 202 nmolas min⁻¹ mg⁻¹ y en el micelio fue de 119 nmolas min⁻¹ mg⁻¹. Sin embargo, una vez alcanzado la fase de micelio, presenta una alta actividad de 431 nmolas min⁻¹ mg⁻¹ comparada con la levadura que es de solo 210 nmoles min⁻¹ mg⁻¹. Éstos resultados sugieren que esta enzima juega un papel regulatorio en el dimorfismo de *C. albicans*.

Monk y sus colaboradores en 1993 estudiaron la expresión de la proteína PMA1, la cinética enzimática y la distribución de la ATPasa en células privadas de fuente de carbono y en células inducidas con glucosa creciendo a un pH 4.5 o de 6.7. En la levadura la actividad específica de la H⁺-ATPasa se mantiene a través de todo el experimento pero la K_{0.5} (que es la concentración mili molar de ATP-Mg²⁺ requerido para alcanzar la mitad de la Vmax) para el ATP se incrementó un 50%

después de tres horas de crecimiento, es decir, de 2 a 3 mM. En el caso de las células que forman el tubo germinativo la actividad específica se incrementó dos veces y la $K_{0.5}$ del ATP (2 mM) se mantuvo durante las tres horas de crecimiento. La $K_{0.5}$ para el ATP-Mg²⁺ disminuyó, cuando se adicionó glucosa al medio de cultivo, a un pH de 4.5 o de 6.7 lo que indica una activación de la enzima con el metabolismo de la glucosa.

En células que forman los tubos germinativos la actividad de la H⁺-ATPasa es más alta (dos veces) que en las células que geman. Lo que sugiere que la enzima mantiene el pH citosólico durante el crecimiento de la hifa.

El mecanismo que controla el dimorfismo en *S. schenckii* ha sido poco estudiado. En algunos trabajos se ha sugerido que el dimorfismo responde a algunas moléculas efectoras que controlan la diferenciación en otras células eucarióticas, lo que indica que la regulación del dimorfismo involucra una vía de traducción de señales (Aquino-Piñero y Rodríguez-del Valle, 1997).

Otros estudios en este hongo han demostrado que existe una correlación entre síntesis de componentes de pared celular y dimorfismo (Toledo *et al.*, 2000).

S. schenckii puede ser inducido a cambiar de forma, de levadura a micelio, dependiendo de las condiciones del medio de cultivo, lo que permite el estudio de la diferenciación del hongo en el laboratorio. Se ha establecido que, en un medio químicamente definido a un pH ácido 5.5, el hongo crece como micelio y en el mismo medio, a un pH de 7.2, crece como levadura (Fig. 1).

Debido a la importancia de la H⁺-ATPasa de membrana plasmática en el mantenimiento del pH intracelular en este trabajo nos propusimos caracterizar a esta enzima para empezar a entender el papel que desempeña en el cambio de morfología de *S. schenckii*.

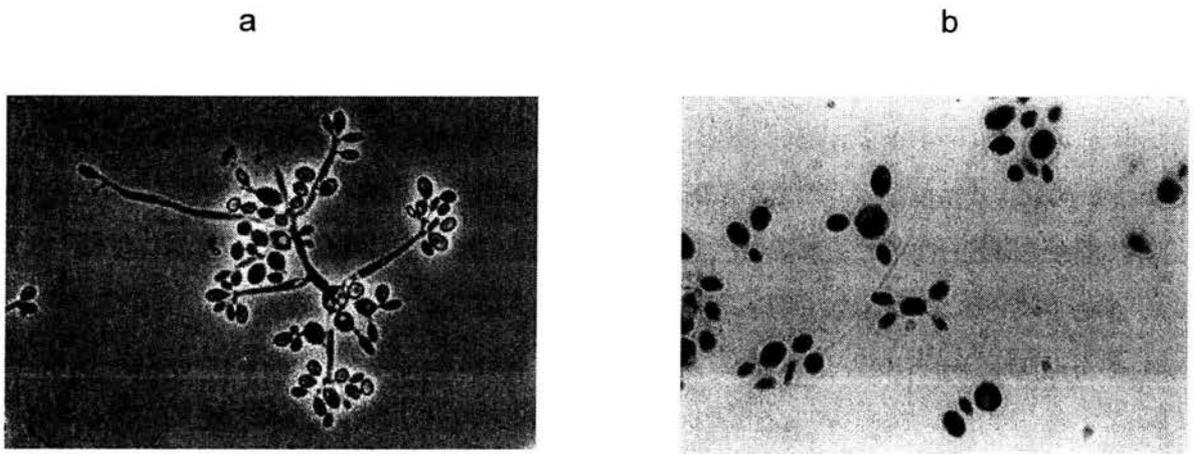


Fig. 1. *Sporothrix schenckii* sembrado en un medio químicamente definido con un pH de 5.5 crece como micelio (a) y con un pH de 7.2 crece como levadura (b).

II. OBJETIVO

Caracterizar la H⁺-ATPasa de la membrana plasmática del micelio y la levadura de *S. schenckii*.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

Para la realización de este trabajo se utilizó la cepa EH-217 de *S. schenckii* obtenida de un aislamiento clínico en el Instituto Dermatológico de Occidente, Guadalajara, Jalisco. La cepa fue donada por el Dr. Jorge Mayorga.

Mantenimiento de la cepa

La cepa del hongo se resembró en tubos con medio YEPD (ver apéndice) incubando a 28°C por siete días.

Crecimiento de la cepa

El micelio y las levaduras se obtuvieron de los conidios provenientes de los tubos de YEPD inoculados en medio de cultivo RV (ver apéndice) que tiene un pH diferente.

Fase micelial

Los conidios se inocularon en 100 ml de medio líquido RV, pH 5.5, los cultivos fueron crecidos en una incubadora con agitación a 28°C por 23 h. Éstos se filtraron a través de papel Whatman No. 40 y se lavaron con agua destilada estéril. El micelio se congeló a -20°C hasta su uso.

Fase de levadura

Los conidios se inocularon en 100 ml de medio líquido RV, pH 7.2, los cultivos fueron crecidos en una incubadora con agitación a 28°C por 72 h. Las levaduras fueron colectadas por centrifugación a 3000 rpm por 15 min, se lavaron con agua destilada estéril y se congelaron a -20°C hasta su uso.

Preparación de fracciones enriquecidas en membranas plasmáticas

Con base en los métodos descritos para *N. crassa* (Bowman *et al.*, 1981 b) y *C. albicans* (Monk *et al.*, 1993) se estableció un protocolo de extracción de las membranas para nuestro hongo. Las condiciones de extracción se establecieron en la fase de micelio debido a la fácil obtención de la biomasa.

Tratamiento con enzimas líticas

La biomasa (micelio o levadura) fué resuspendida en glucosa 1 M a una concentración de 0.1 g/ml y se agregó 53 μ l/ml de succinato de sodio 10 mM pH 5.0, β -mercaptoetanol 3 μ l/ml, liticase 5 μ l/ml, y glucouronidasa 66 μ g/ml. La suspensión se incubó a 30°C en agitación suave por 45 minutos. Posteriormente se centrifugó y se lavó con glucosa 1 M.

Rompimiento celular

La biomasa (micelio o levaduras) se resuspendió en el amortiguador de rompimiento BR (ver apéndice) a una concentración de 0.05 g de peso húmedo por ml de amortiguador, se agregó el inhibidor de proteasas PMSF a una concentración final de 1 mM. El rompimiento se realizó mediante un homogenizador tipo Braun dando un pulso de 15 seg. El homogenado se centrifugó a 6000 rpm por 10 min (en un rotor GSA); sedimentando la pastilla nuclear, que contiene los núcleos, restos celulares y las células no rotas. El sobrenadante se mantuvo en hielo y la pastilla nuclear se resuspendió nuevamente bajo las mismas condiciones en amortiguador de rompimiento BR/PMSF a la cual se le dió un segundo pulso de 15 seg en el homogenizador Braun y se centrifugó a 6000 rpm por 10 min. Los sobrenadantes colectados se centrifugaron a 12000 rpm por 1 h (en un rotor SS34). La pastilla que se formó corresponde a la fracción mitocondrial. El sobrenadante recuperado se centrifugó a 30000 rpm durante 1 h (en un rotor 45Ti). La pastilla recuperada corresponde a la fracción microsomal y el sobrenadante se desechó.

La fracción mitocondrial se resuspendió en 1 mM de EGTA, pH 7.2 y la fracción microsomal se resuspendió en un amortiguador BG (ver apéndice). Ambas fracciones se almacenaron a -70°C hasta su uso.

Todo el fraccionamiento se llevo acabo a 4°C y las centrifugaciones se realizaron en una centrifuga Sorvall y una ultracentrífuga Beckman LB-M.

Obtención de la fracción enriquecida en membranas plasmáticas

La fracción microsomal se subfraccionó en un gradiente discontinuo de sacarosa formado espontáneamente a partir de dos fases una con 53.5 % y otra con 43.5% de sacarosa (MonK *et al.*, 1991) que se centrifugó a 35000 rpm por 5 h a 4°C (rotor SW40) en una ultracentrífuga Beckman LB-M.

Con esta centrifugación se obtuvieron dos bandas: una en la parte superior de la fase de 43.5% de sacarosa, denominada fracción enriquecida en membranas plasmáticas y otra en la interfase del gradiente denominada FI. Las bandas se extrajeron del gradiente y se sedimentaron por centrifugación a 35000 rpm por 1 h (en un rotor 45Ti). Las fracciones enriquecidas en membranas plasmáticas y FI fueron resuspendidas en EGTA 1 mM, pH 7.2 y se almacenaron a -70°C hasta realizar los ensayos enzimáticos.

Determinación de la proteína

La determinación de proteína se realizó por el método de Lowry (ver apéndice), utilizando como curva patrón una solución de albúmina sérica bovina (BSA) a una concentración de 1 mg/ml.

Determinación de la actividad de la 5' nucleotidasa

Para caracterizar las diferentes fracciones celulares obtenidas (homogenizado, fracción nuclear, mitocondrial, microsomal y enriquecida en membranas plasmáticas) se cuantificó la actividad de la enzima 5' nucleotidasa que es un marcador de la membrana plasmática. La actividad de la enzima se determinó cuantificando el Pi liberado del sustrato AMP de acuerdo al método descrito por González-Romo *et al.*, 1992 (ver apéndice).

La reacción se llevó a cabo en la siguiente mezcla: KCl 100 mM, MgCl₂ 100 mM, tartrato Na/K 10 mM, Tris HCl 50 mM pH 7.4, Brij58 0.015%, AMP 5 mM. Se llevó a cabo a con 30 µg de proteína a 30°C durante 30 min y se detuvo con SDS al 24%.

Determinación de la actividad de la ATPasa mitocondrial

La hidrólisis de ATP de la ATPasa mitocondrial se determinó cuantificando el Pi liberado del sustrato ATP (González-Romo *et al.*, 1992).

La reacción se llevó a cabo en 150 µl de la siguiente mezcla: Mes-Tris 30 mM pH 6.5, MgSO₄ 10 mM, CCCP 7 µM, Brij58 0.015% y ATP 10 mM; en presencia y ausencia de NaN₃ 10mM. La reacción se llevó a cabo a 30°C durante 30 min y se detuvo con SDS al 24%.

Esta actividad se determinó en las fracciones mitocondrial, microsomal y enriquecida en membranas plasmáticas.

Determinación de la actividad de la ATPasa de la membrana plasmática

La actividad de la ATPasa de la membrana plasmática se determinó cuantificando el Pi liberado del sustrato ATP (González-Romo *et al.*, 1992), en la siguiente mezcla de reacción Mes-Tris 30 mM pH 6.5, MgSO₄ 10 mM, CCCP 7 µM, Brij58 0.015%, ATP 10 mM, KNO₃ 50 mM, en presencia y ausencia de Na₃VO₄ 200 µM.

La actividad de la ATPasa de la membrana plasmática se determinó en las fracciones mitocondrial, microsomal y enriquecida en membranas plasmáticas.

Determinación del pH óptimo

La determinación del pH óptimo de la fracción enriquecida en membranas plasmáticas se realizó en el siguiente amortiguador MOPS 50mM, Mes 50mM y Tris 50 mM ajustando el pH de 5 a 9 con NaOH o HCl, MgCl₂ 5 mM ATP 5 mM, Brij58 0.015%, CCCP 7µM, KNO₃ 50 mM y NaN₃ 10 mM y un sistema regenerador

de ATP que consta de piruvato cinasa (PC) de músculo de conejo 4.7 $\mu\text{l/ml}$ y fosfoenol piruvato (PEP) 2 mM.

Determinación de las constantes cinéticas de la H^+ -ATPasa

Los parámetros cinéticos se determinaron en la fracción enriquecida de membranas plasmáticas. Se cuantificó la hidrólisis de ATP variando la concentración de sustrato ATP-Mg^{2+} de 0.05 a 6 mM.

La reacción se llevó a cabo en un volumen de 150 μl de la siguiente mezcla de reacción: Mes-Tris 30mM pH 6.5, CCCP 7 μM , Brij58 0.015%, KNO_3 50 mM y NaN_3 , 5 mM y el sistema regenerador de ATP.

La reacción se llevó a cabo a 30°C durante 30 min y se detuvo con SDS al 24%.

La actividad se determinó cuantificando el Pi liberado de la hidrólisis de ATP (González-Romo *et al.*, 1992).

Determinación de la constante de inhibición (K_i) de la H^+ -ATPasa

Se determinó la K_i en la fracción enriquecida en membranas plasmáticas. Se determinó la hidrólisis de ATP variando la concentración del inhibidor Na_3VO_4 de 0 a 200 μM . La reacción se llevó a cabo en un volumen de 150 μl de la siguiente mezcla de reacción Mes-Tris 30 mM pH 6.5, MgCl_2 2 mM, ATP 2 mM, CCCP 7 μM , Brij58 0.015%, KNO_3 50 mM, NaN_3 5 mM y el sistema regenerador de ATP.

Cálculo de las constantes cinéticas

Para determinar la variación estadística de los datos se utilizó el programa EXEL y para determinar las constantes cinéticas se utilizó el programa Origin 6.0.

IV. RESULTADOS

Actividad del marcador de la membrana plasmática 5'nucleotidasa

Durante el proceso de purificación es importante tener un marcador que nos indique el enriquecimiento de la preparación en membranas plasmáticas. Se utilizó como marcador del plasmolema la enzima 5'nucleotidasa, cuya actividad se determinó en todos los pasos de la extracción de las membranas del micelio: el homogenado, la fracción nuclear mitocondrial, microsomal y la fracción enriquecida en las membranas plasmáticas. Los resultados muestran que la actividad de la 5'nucleotidasa se encuentra distribuida en todas las fracciones obtenidas durante la purificación, observándose la mayor actividad específica en la fracción mitocondrial con $0.7 \text{ nmolas min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ y en la fracción enriquecida en las membranas plasmáticas $1.3 \text{ nmolas min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$, lo que indica que están enriquecidas en membrana plasmática (Tabla 1).

Ambas fracciones se consideraron buenas candidatas para realizar las siguientes determinaciones enzimáticas.

Actividad de hidrólisis del ATP que es sensible a la azida o al vanadato en el micelio

La actividad de la ATPasa mitocondrial se utilizó como un marcador de las membranas mitocondriales. Éstas generalmente contaminan la preparación de las membranas plasmáticas. La ATPasa mitocondrial es una enzima sensible a la azida de sodio (NaN_3) que es un inhibidor de enzima. Utilizando esta característica se determinó la proporción de la actividad de la ATPasa sensible a azida en las fracciones mitocondrial, microsomal, y la enriquecida en membranas plasmáticas del micelio. En la Tabla 2 se observa que la actividad específica de la ATPasa mitocondrial fue mayor en la fracción mitocondrial, ya que al agregar el inhibidor se obtuvo una actividad residual, de $18.3 \text{ nmolas min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$, lo que indica un 89% de inhibición de la enzima. La actividad en la fracción enriquecida en membranas

plasmáticas tuvo un 26% de inhibición por azida. En cambio en ésta se observó la mayor actividad específica de ATPasa de membrana plasmática de 38.2 nmolas $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$.

En la fracción microsomal se observó una actividad específica de la ATPasa de membrana plasmática de 30.9 nmolas $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ y también se observó una contaminación con la ATPasa mitocondrial 39.3 nmolas $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$.

En las fracciones mitocondrial, microsomal y en la enriquecida en membranas plasmáticas se determinó la actividad de la H^+ -ATPasa de membrana plasmática utilizando al vanadato (Na_3VO_4) como inhibidor específico de la bomba de protones.

En la fracción mitocondrial sólo se observó un 11% con Na_3VO_4 y en la fracción microsomal un 41%, lo que indica que estas fracciones contienen remanentes de ATPasa de membrana plasmática. En cambio la fracción enriquecida en membranas se inhibió un 72% de actividad al agregar Na_3VO_4 , lo que significa que esta efectivamente enriquecida en ATPasa de protones.

Con esta purificación (72%) que tiene un enriquecimiento en la actividad de la enzima 5'nucleotidasa (1.3 nmolas $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$) y un 26% de contaminación de la ATPasa mitocondrial, se considera que la preparación es adecuada para realizar los estudios posteriores.

Actividad de hidrólisis del ATP que es sensible a la azida o al vanadato en la levadura

La extracción de membranas de la fase de levadura de *S. schenckii* se realizó de la misma manera que para el micelio, sólo que se utilizó una menor cantidad de biomasa (14 g).

La actividad de hidrólisis del ATP que es sensible a la NaN_3 y Na_3VO_4 se determinó en las tres fracciones principales: mitocondrial, microsomal y enriquecida en membranas plasmáticas.

Al igual que en el micelio, en la fracción mitocondrial se observó la mayor actividad que es sensible a la NaN_3 (93% de inhibición). Esta actividad es solo de 20% de

inhibición en la fracción enriquecida en membranas plasmáticas en la que se observó la mayor actividad de la H⁺-ATPasa de protones (Tabla 3).

También se determinó la actividad sensible a Na₃VO₄ en las tres fracciones: mitocondrial, microsomal y la enriquecida en membranas plasmáticas.

En la Tabla 3 se observa que sólo un 10% de actividad fue inhibida en la fracción mitocondrial al agregar Na₃VO₄ y un 28% en la fracción microsomal. Esto indica que, al igual que en el micelio, algunos restos de ATPasa de membrana plasmática se quedaron en estas fracciones. En la fracción enriquecida en membranas se observó un 66% de inhibición de la actividad con el Na₃VO₄ indicando que es la fracción que está más enriquecida en la en ATPasa de membrana plasmática.

Fracción enriquecida en membranas plasmáticas en el micelio y la levadura

En ambas morfologías, micelio y levadura, este método permitió obtener una fracción enriquecida en membranas plasmáticas adecuada para determinar los parámetros cinéticos de la enzima. Sin embargo, como se observa en la Tabla 4, el micelio es el mejor para obtener las fracciones enriquecidas en membranas plasmáticas, aunque el porcentaje de inhibición con Na₃VO₄ es similar en ambas morfologías (72% en micelio y 66% en levadura). En el micelio se tiene una mayor actividad específica de la enzima (38.1 nmolas min⁻¹ mg⁻¹) en cambio en la levadura fue de 8.3 nmolas min⁻¹ mg⁻¹. Si bien se obtuvo la misma cantidad de proteína que en el micelio el rendimiento fue menor (0.09%). Es importante señalar que para la extracción de las membranas plasmáticas se utilizó una mayor cantidad de biomasa en el caso del micelio (40 g) comparado con la de la levadura (14 g) debido a la mayor facilidad de obtener la biomasa del micelio.

Tabla 1. Distribución de la actividad de la enzima 5´nucleotidasa en las diferentes fracciones subcelulares del micelio. Los valores son el promedio de tres preparaciones diferentes.

Fracción celular	Proteína mg	Recuperación de proteína %	5´nucleotidasa	
			Actividad específica nmolas min ⁻¹ mg ⁻¹	Actividad total nmolas min ⁻¹
Homogenado	824.3 ± 71.1	100	0.02 ± 0	20.3
Nuclear	28.6 ± 11.3	3.4	0.2 ± 0	6.3
Mitocondrial	6.9 ± 3.1	0.8	0.7 ± 0.4	5.1
Microsomal	12.8 ± 4.3	1.5	0.3 ± 0.1	3.9
Enriquecida en membranas plasmáticas	1.6 ± 0.5	0.2	1.3 ± 0.2	2.2

Tabla 2. Actividad de hidrólisis del ATP que es sensible a la NaN_3 y al Na_3VO_4 en fracciones celulares del micelio. Los valores obtenidos son el promedio de tres preparaciones diferentes.

Fracción celular	Proteína mg	Hidrólisis de ATP				
		Sin inhibidor*	+ NaN_3 *	% de inhibición	+ Na_3VO_4 *	% de inhibición
Mitocondrial	4.9 ± 1.1	223.3 ± 118.9	18.3 ± 14.1	88.9 ± 8	188.7 ± 73.8	10.9 ± 15.2
Microsomal	8 ± 6.3	74.3 ± 41.8	35 ± 9.9	44.2 ± 24.2	43.4 ± 27.5	40.9 ± 13.5
Enriquecida en membranas plasmáticas	1.2 ± 0.9	53.5 ± 31.3	39.8 ± 23.1	26.3 ± 8.1	15.3 ± 10.5	72.1 ± 3.4

* actividad específica $\text{nmolas min}^{-1} \text{mg}^{-1}$

Tabla 3. Actividad de hidrólisis del ATP sensible a la NaN_3 y al Na_3VO_4 en fracciones obtenidas de levadura. Las determinaciones son el promedio de dos preparaciones diferentes.

Fracción celular	Proteína mg	Hidrólisis de ATP				
		Sin inhibidor*	+ NaN_3 *	% de inhibición	+ Na_3VO_4 *	% de inhibición
Mitocondrial	9.4 ± 0.4	337.2 ± 169.2	22.1 ± 11.5	93.4 ± 0.1	314 ± 191.8	9.7 ± 11.5
Microsomal	3.9 ± 0.5	28.7 ± 3.3	6.9 ± 0.2	75.5 ± 2.2	21 ± 10.1	28.3 ± 26.8
Enriquecida en membranas plasmáticas	1.1 ± 0.2	12.7 ± 1.5	10 ± 2.9	20.4 ± 11.4	4.1 ± 0.07	66.1 ± 5.7

*actividad específica $\text{nmolas min}^{-1} \text{mg}^{-1}$

Tabla 4. Fracciones enriquecidas de membrana plasmática obtenidas del micelio y la levadura.

Morfología	Proteína total mg	Rendimiento %	Actividad total nmolas min ⁻¹	Actividad específica. nmolas min ⁻¹ mg ⁻¹	Inhibición con Na ₃ VO ₄ %
Micelio	1.2 ± 0.9	0.14	61.7 ± 19	38.1 ± 6.3	72.1 ± 3.4
Levadura	1.1 ± 0.2	0.09	9.7 ± 4	8.3 ± 1.9	66.1 ± 5.7

Efecto de los componentes del medio de reacción en la actividad de la H⁺-ATPasa

Para llevar a cabo los estudios de cinética fue necesario optimizar las condiciones de medición de la hidrólisis del ATP. Por ello se determinó el efecto de los componentes del medio de reacción en la actividad de la enzima.

Solo dos componentes del medio de reacción afectaron la actividad de la H⁺-ATPasa: el Mg²⁺ y el sistema de regeneración del ATP (fosfoenolpiruvato y piruvato cinasa). La actividad específica de la enzima en ausencia del Mg²⁺ disminuyó hasta un 3% de actividad para ambas morfologías (Tabla 5). Estos resultados muestran que la H⁺-ATPasa es dependiente de Mg²⁺ en ambas morfologías.

En ausencia del sistema de regeneración del ATP la actividad específica es baja como se muestra en la Tabla 4. La reacción fue inhibida por el ADP, ya que al adicionar el sistema de regeneración del ATP la actividad aumentó en ambas morfologías, de 35 nmolas min⁻¹ mg⁻¹ a 443.7 nmolas min⁻¹ mg⁻¹ en el micelio y de 10.4 nmolas min⁻¹ mg⁻¹ a 561.1 nmolas min⁻¹ mg⁻¹ en la levadura (Tabla 5). Es importante señalar que la composición iónica del medio de reacción utilizado en las primeras determinaciones de hidrólisis de ATP (Tabla 2, 3 y 4) fue la misma y la baja actividad observada puede ser debido a la inhibición de la H⁺-ATPasa por el ADP generado en la mezcla de reacción.

La actividad de la enzima no se modificó cuando no se adicionó a la reacción el BRIJ58 o el CCCP tanto en la fracciones de membrana obtenida del micelio y de la levadura (Tabla 5).

Estos datos indican que para obtener una actividad máxima de la enzima se requiere la presencia de concentraciones óptimas del sustrato ATP, de Mg²⁺ y de un sistema regenerador del ATP.

Tabla 5. Efecto de los componentes del medio de reacción en la actividad de la H⁺-ATPasa en la fracción de membrana plasmática del micelio y la levadura

Componente	Micelio	Levadura
	Actividad específica (nmolas min ⁻¹ mg ⁻¹)	
Medio de reacción completo	443.7	561.1
Sin Mg ²⁺	13.9	14.9
Sin CCCP	418.3	547.3
Sin BRIJ58	454.9	577.4
Sin sistema de regeneración del ATP	35.4	10.4

Determinación del pH óptimo

La curva de hidrólisis del ATP en función del pH es de particular interés porque el pH puede afectar la actividad de la enzima. En el caso particular de este trabajo era importante determinar si la H⁺-ATPasa tenía pH óptimos diferentes que pudieran implicar una diferente forma enzimática.

En ambas formas de crecimiento se determinó la actividad de la H⁺-ATPasa a diferentes valores del pH en el intervalo de 4.5 a 9.5. Los resultados muestran que el perfil del pH es idéntico para ambas morfologías. El pH óptimo está entre 6.5 y 7. Esto es similar a la descrita para otros hongos (Fig. 2).

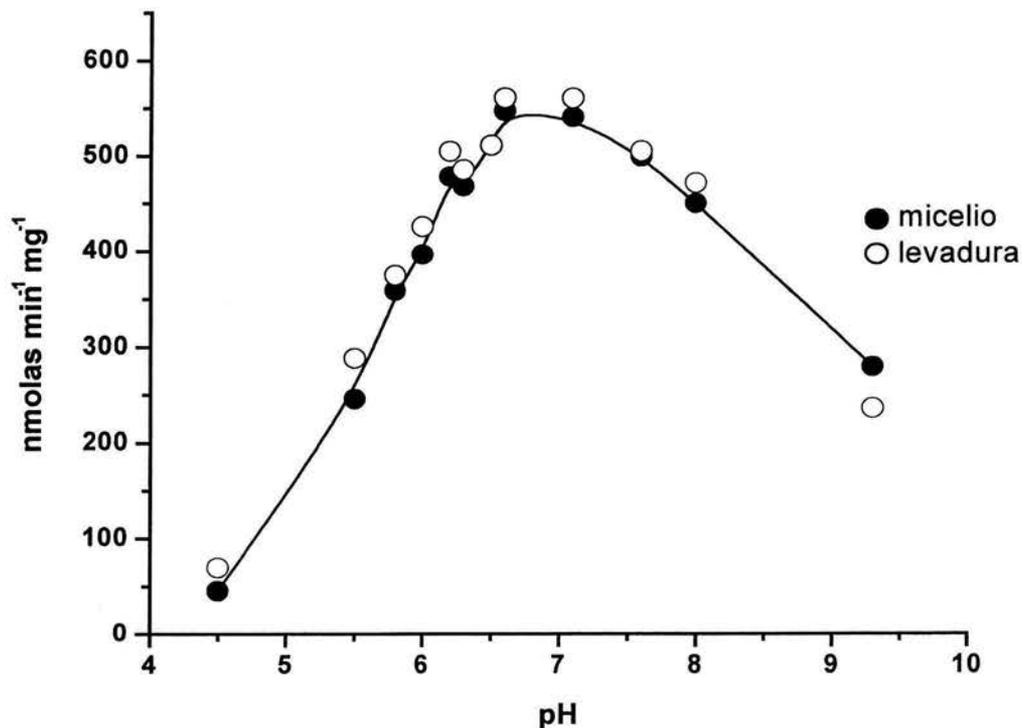


Fig. 2. Efecto del pH en la actividad de la H⁺-ATPasa del micelio y la levadura.

Determinación de la constante de inhibición K_i

Se determinó la sensibilidad de la actividad de la H^+ -ATPasa al inhibidor específico Na_3VO_4 , el cual se adicionó en un intervalo de concentración de 5 a 200 μM . Los resultados muestran que la actividad de la H^+ -ATPasa se inhibe a medida que la concentración de Na_3VO_4 se incrementa en el medio de reacción. Sin embargo el patrón de inhibición de la enzima no fue igual para ambos tipos de crecimiento. En el caso del micelio la actividad de la H^+ -ATPasa mostró un 60% de inhibición con la máxima concentración de Na_3VO_4 (200 μM) y en la levadura se alcanzó un 90% de inhibición (Fig. 3). Se determinó una K_i de 25 μM para el micelio y para la levadura la K_i fue menor de 15 μM (Fig. 4). Los resultados nos indican que las proteínas muestran diferente sensibilidad al Na_3VO_4 siendo más sensible la H^+ -ATPasa de levadura que la de micelio.

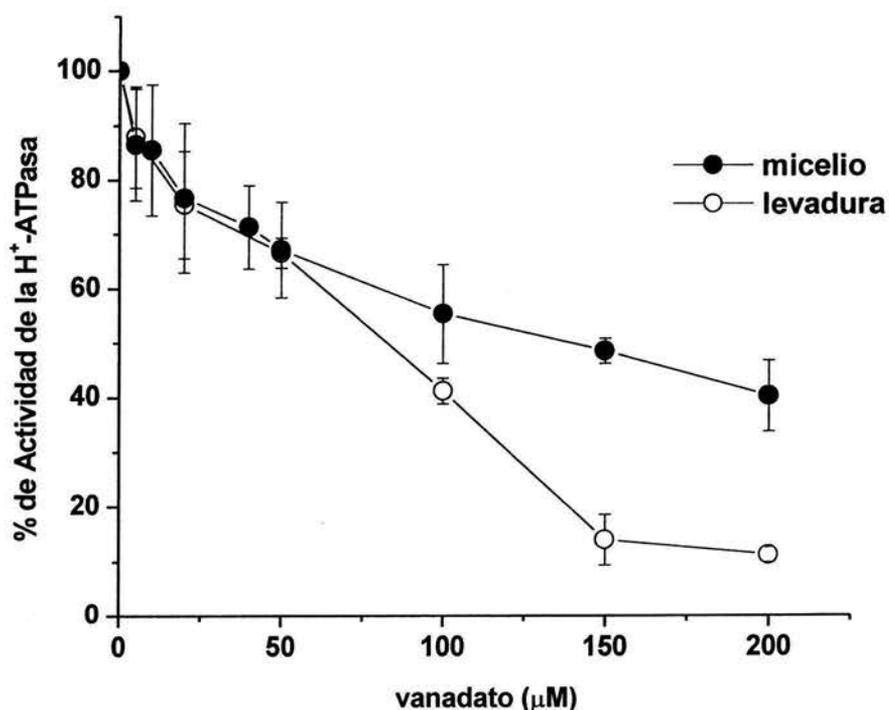
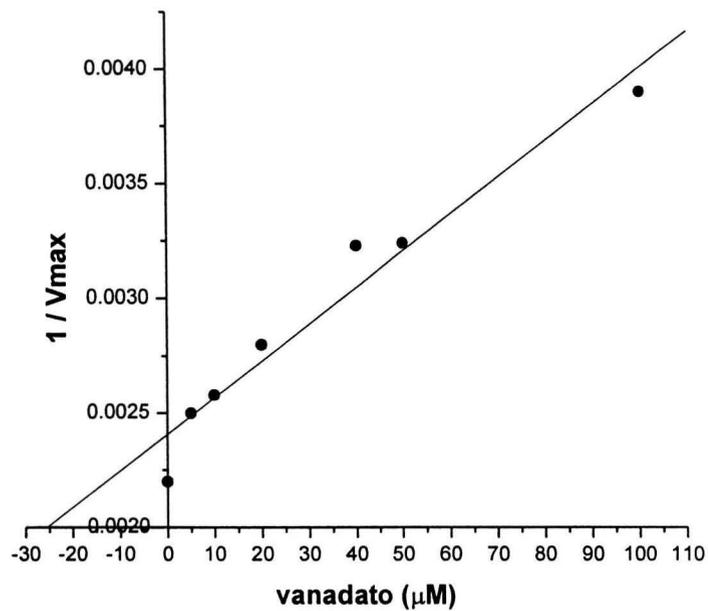


Fig. 3. Inhibición de la actividad de la H^+ -ATPasa por Na_3VO_4 en ambas morfologías micelio y levadura de *S. schenckii*. La reacción se llevó acabo de acuerdo a lo descrito en Materiales y Métodos. Cada punto es el promedio de 2 determinaciones.

a) micelio



b) levadura

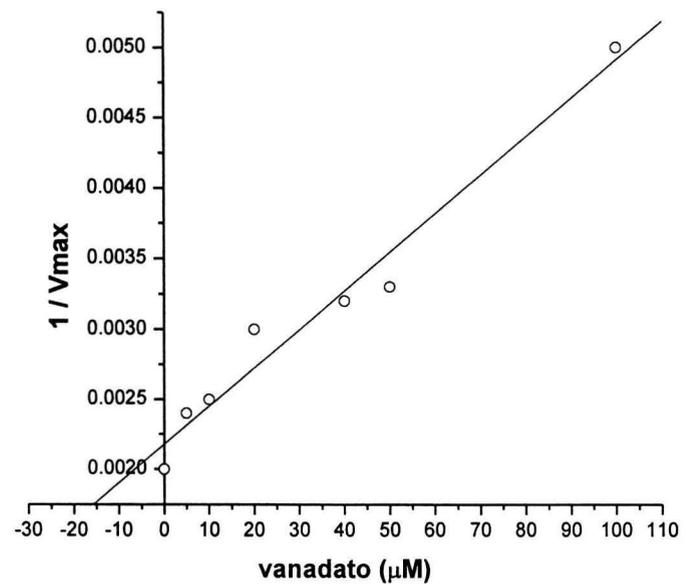


Fig. 4. Gráfica de Dixon de la inhibición de la actividad de ATPasa por Na_3VO_4 en a) micelio y b) levadura del hongo *S. schenckii*. Los puntos obtenidos son el promedio de los datos mostrados en la Fig. 3.

Determinación de los parámetros cinéticos

Las propiedades cinéticas de la H⁺-ATPasa unida a la membrana plasmática son importantes porque indican su capacidad catalítica. La actividad de la H⁺-ATPasa de la membrana plasmática se determinó con diferentes concentraciones de Mg²⁺-ATP (0.05 a 6 mM). En el micelio y en la levadura los resultados muestran la cinética de Michaelis-Menten es muy similar para ambas formas de crecimiento (Fig. 5).

Mediante la linearización de las curvas Michaelianas con el método Lineweaver-Burk se determinaron los parámetros cinéticos: Km y Vmax (Fig. 6). Los resultados muestran que en ambas formas de crecimiento la Km no fue significativamente diferente, indicando que ambas morfologías tienen una afinidad similar por el sustrato. Con respecto a la Vmax ésta fue ligeramente mayor en la levadura con respecto a la fase de micelio.

En la Tabla 6 se presentan en resumen los parámetros cinéticos obtenidos para la H⁺-ATPasa de membrana plasmática en ambas morfologías de *S. schenckii*. No existen diferencias significativas entre los parámetros cinéticos de ambas formas por el sustrato. Con respecto a la Vmax ésta fue ligeramente mayor en la levadura con respecto a la fase de micelio.

En la Tabla 6 se presentan en resumen los parámetros cinéticos obtenidos para la H⁺-ATPasa de membrana plasmática en ambas morfologías de *S. schenckii*. No existen diferencias significativas entre los parámetros cinéticos de ambas formas de crecimiento. Solo el caso de la constante de inhibición presentó diferencia significativa.

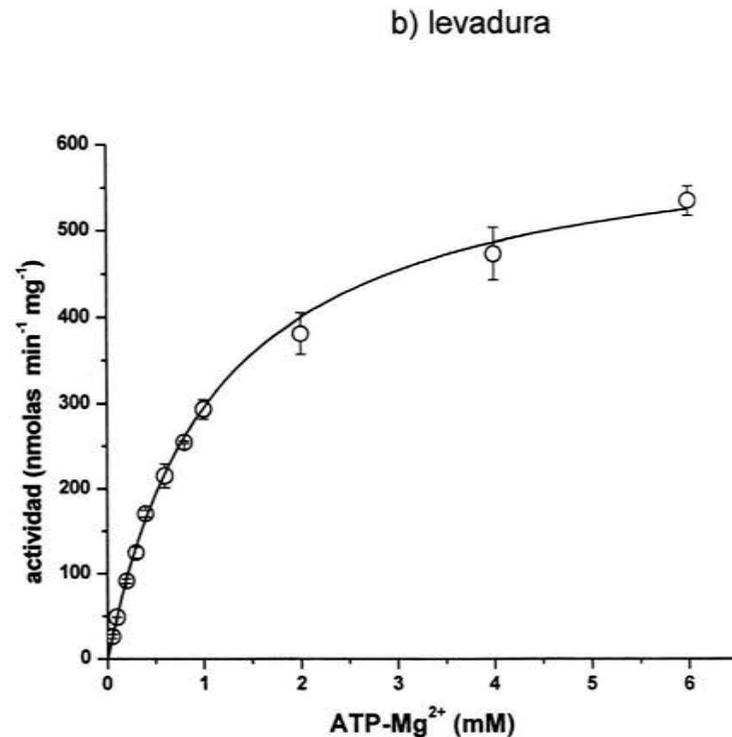
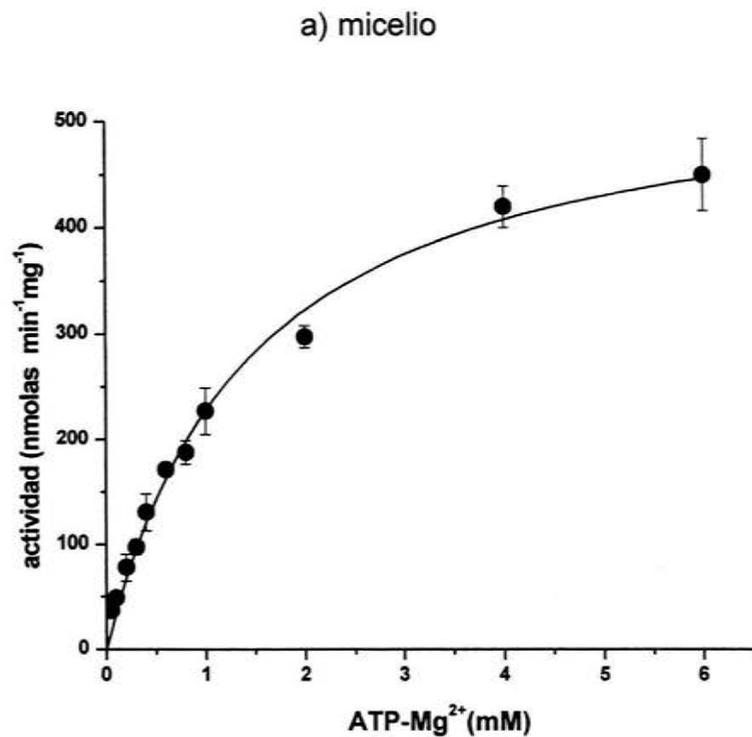
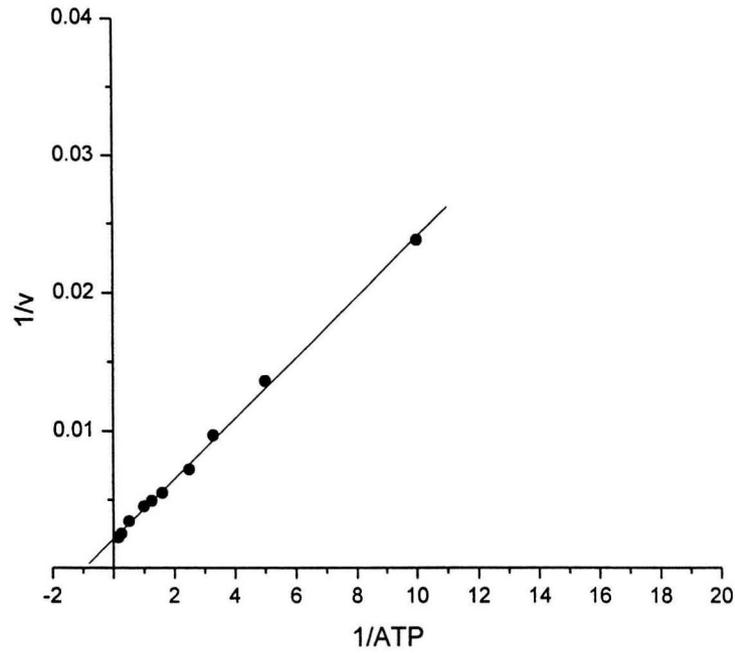


Fig. 5. Actividad de la H⁺-ATPasa a diferentes concentraciones de sustrato en ambas formas de crecimiento: a) micelio y b) levadura del hongo *S. schenckii*. La reacción se llevó a cabo de acuerdo a lo descrito en Materiales y Métodos. Los puntos representan el promedio de cuatro determinaciones.

a) micelio



b) levadura

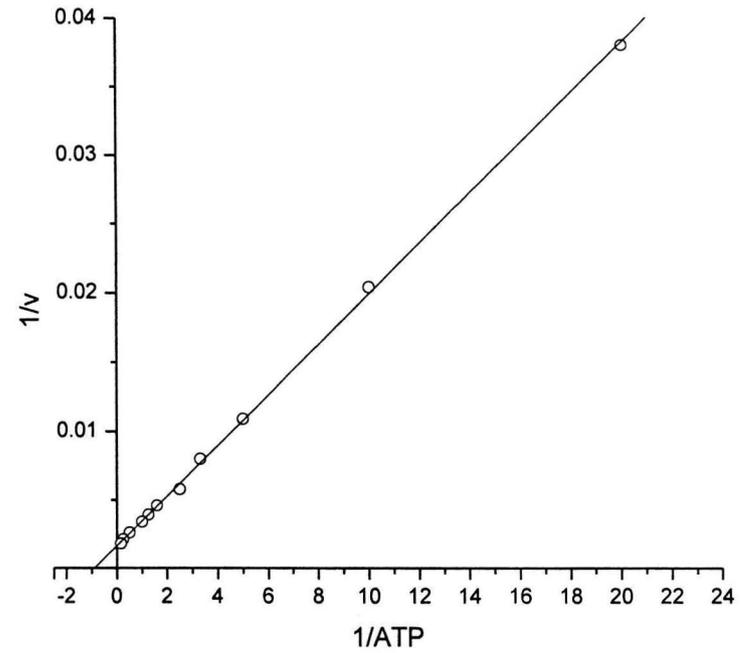


Fig. 6. Gráfica obtenida por el método de linearización Lineaweaver- Burk de la cinética de la actividad de la ATPasa a diferentes concentraciones de sustrato en a) micelio y b) levadura del hongo *S. schenckii*. Los puntos obtenidos son el promedio de los datos mostrados en la Fig. 5.

Tabla 6. Parámetros cinéticos de la H⁺-ATPasa de membrana plasmática del micelio y la levadura. Los valores de la Km y Vmax fueron calculados usando concentraciones de ATP-Mg²⁺ en el intervalo de 0.05 a 6 mM y la Ki fue determinada usando las concentraciones de 5 a 200 μM de Na₃VO₄.

Fase de crecimiento	Km (mM)	Vmax (μmol min ⁻¹ mg ⁻¹)	Ki (μM)	pH óptimo
Micelio	1.4 ± 0.12	0.55 ± 0.02	25	6.5-7.0
Levadura	1.1 ± 0.04	0.62 ± 0.01	15	6.5-7.0

V. DISCUSIÓN

La capacidad de los microorganismos para crecer en un intervalo amplio de pH requiere de un mecanismo de homeostasis eficiente que proteja los diferentes procesos intracelulares de los cambios extremos en la concentración de H^+ .

El mantenimiento del pH intracelular (pHi) es muy importante para el funcionamiento correcto de la célula. Se sabe que los cambios en el pHi afectan el ensamblaje del citoesqueleto y por ende la forma de las células. En general se acepta que la H^+ -ATPasa de la membrana plasmática tiene un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis del pHi. Las levaduras como *S. cerevisiae* son capaces de crecer en condiciones ácidas debido al bombeo protones a través de la H^+ -ATPasa que neutraliza el citoplasma.

El hongo *S. schenckii* responde a los cambios en el pH del medio de cultivo. En condiciones ácidas (pH 5.5) el hongo crece de manera filamentosa y en condiciones neutras (pH 7.2) crece como levadura.

Diferentes hongos patógenos como *C. albicans* y *Ustilago maydis* tienen la habilidad de cambiar de morfología entre la levadura y la forma micelial dependiendo de los estímulos del medio. Esta capacidad se ha correlacionado con la virulencia del hongo, ya que durante la infección se lleva a cabo el cambio de morfología. En el caso de *C. albicans* se ha demostrado que el pH extracelular del medio es uno de los estímulos involucrados en la transición dimórfica.

En general existe poca información sobre la H^+ -ATPasa de los hongos patógenos. En el hongo oportunista *C. albicans* se ha demostrado que esta enzima juega un papel importante en el mantenimiento del pH intracelular y en el cambio de morfología (Monk *et al.*, 1991, 1993).

Para iniciar el estudio sobre la participación de la H^+ -ATPasa en el proceso de transición dimórfica en *S. schenckii*, en este trabajo se llevó a cabo la caracterización bioquímica de esta enzima a partir de una fracción enriquecida de vesículas de membrana plasmática de ambos tipos de crecimiento.

La fracción enriquecida en membranas plasmáticas se obtuvo siguiendo los protocolos descritos para *C. albicans* (Monk *et al.*, 1993) y para *N. crassa*

(Bowman *et al.*, 1981 b). En la literatura se describe que el mejor método para obtener una preparación homogénea en membranas plasmáticas es darles a las células un tratamiento con enzimas liticas para degradar la pared celular. Posteriormente se hace un rompimiento mecánico en un homogenizador. De esta manera se logra que los organelos membranosos se conserven íntegros y puedan ser eliminados por centrifugación diferencial.

Como indicador del enriquecimiento en las membranas plasmáticas se utilizó a la enzima 5'nucleotidasa. En hongos como *N. crassa* la actividad específica de esta enzima es de $55.4 \text{ nmolas min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$, lo que representa un 0.5% de enriquecimiento con respecto al homogenizado (Scarborough, 1975). En *Dictyostelium discoideum* la actividad es de $8.5 \text{ nmolas min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ (5% de enriquecimiento) (Gilkes y Weeks, 1977, Coukell y Cameron, 1997) y *Blastomyces dermatitis* es de $3.4 \text{ } \mu\text{molas min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ (Chaturverdi *et al.*, 1990). En el caso del micelio de *S. schenckii* tiene una actividad de $1.3 \text{ nmolas min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ (11% de enriquecimiento). Un problema en el análisis del enriquecimiento de un marcador es que no se puede obtener un valor exacto. Esto puede ser debido a la sobreestimación del resultado, ya que durante el procedimiento de purificación la enzima puede activarse, o también el resultado puede estar subestimando porque se pierde actividad de la enzima durante los pasos de purificación. Esto no permite una comparación de los datos, sin embargo la fracción donde se encuentra la máxima actividad de la enzima 5'nucleotidasa también tiene la máxima actividad de la H^+ -ATPasa de la membrana plasmática.

Considerando sus características de perfil de pH y sensibilidad a inhibidores se determinó que la actividad de ATPasa obtenida en nuestra preparación es debida a la de membrana plasmática y no a la mitocondrial. Los resultados obtenidos muestran que las preparaciones de membranas plasmáticas tienen una contaminación de membranas mitocondriales, un 26% de contaminación en la fracción enriquecida de membranas plasmáticas obtenida del micelio y 20% en la levadura.

Para determinar que la actividad específica obtenida en las fracciones enriquecidas en las membranas plasmáticas corresponde a la H^+ -ATPasa de la

membrana plasmática se determinó la inhibición de la actividad con el Na_3VO_4 , (Bowman, 1983). El porcentaje de inhibición por Na_3VO_4 , reportado en otros hongos varía de 60 a 95%. En la fracción de membranas obtenida de micelio la actividad fue inhibida en un 72% y en la fracción obtenida en levaduras fue del 66%.

En plantas como *Arabidopsis thaliana* existen isoformas de la H^+ -ATPasa que presentan cambios significativos en la actividad específica de la enzima purificada lo que implica que existen diferencias en las proteínas expresadas (Palmgren y Christensen, 1994). En el caso de *S. schenckii*, la actividad específica de la H^+ -ATPasa no presentó cambios significativos entre ambas morfologías.

El pH óptimo al cual la H^+ -ATPasa lleva a cabo su actividad varía en un intervalo pequeño (6.5 a 6.7) dependiendo de la especie de hongo. Por ejemplo en *C. albicans* (Monk *et al.*, 1993) y en *C. neoformans* (Gorgojo *et al.*, 2000, Soteropolus *et al.*, 2000), *S. cerevisiae* el pH óptimo es 6.5. Por otro lado *N. crassa* tiene un pH óptimo de 6.7. En los casos de las dos morfologías de *S. schenckii*, mostraron el mismo pH óptimo (que es un valor que está entre 6.5 y 7) y el mismo perfil de actividad a diferentes valores de pH.

Es característico de la H^+ -ATPasa de la membrana plasmática de *S. schenckii* (como ya se ha descrito para muchas otras ATPasas tipo P) que requiera ATP-Mg^{2+} . Los resultados muestran que la hidrólisis de ATP describe una cinética Michaelis-Menten tanto para el micelio como la levadura.

El análisis de las constantes cinéticas obtenidas en ambas morfologías, muestran que la enzima tiene buena afinidad por el sustrato y no resulta muy alta, lo cual es común en las ATPasas tipo P. La K_m obtenida en la levadura fue de 1.1 mM y en el micelio de 1.4 mM. Estos valores son similares a los descritos para otros hongos patógenos en los que se han determinado las constantes cinéticas en las mismas condiciones experimentales en fracciones enriquecidas en membranas plasmáticas. Así se obtuvieron diferentes valores para *C. neoformans* (1.5 mM), *A. nidulans* (1.7 mM) y *S. cerevisiae* (1.6 mM). La V_{max} de la enzima de *S. schenckii* es de $0.62 \mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ para la levadura y de $0.55 \mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ para el micelio. Estos valores son semejantes al observado en *C. neoformans*

($0.33 \mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$) (Gorgojo *et al.*, 2000); La V_{max} varía dependiendo de la especie del hongo, en *S. cerevisiae* la enzima tiene una V_{max} de $3.1 \mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ y en *A. nidulans* una V_{max} de $407 \mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$.

En este trabajo también se determinó la constante de inhibición (K_i) de la enzima en ambas morfologías. La K_i para el micelio fue de $25 \mu\text{M}$ y $15 \mu\text{M}$ para levadura. La K_i resultó ser ligeramente mayor a la descrita para *C. albicans*, donde la K_i varía de 4 a $6 \mu\text{M}$ dependiendo de la fase de crecimiento. Estos resultados muestran que la enzima de *S. schenckii* es menos sensible al inhibidor. La diferencia entre los valores de K_i sugiere diferencias estructurales en las dos proteínas, como se ha descrito en las isoformas de la enzima de la planta *A. thaliana* en la cual se observa una diferencia en la sensibilidad al vanadato de 1 a $10 \mu\text{M}$ dependiendo de la isoforma. El análisis de la secuencia de nucleótidos de estas isoformas mostró un 87.7% de identidad. Las diferencias se encuentran en muchos aminoácidos a lo largo de toda la cadena polipeptídica (Palgrem y Christensen, 1994).

La dependencia que tiene por el ATP-Mg^{2+} , el perfil de la actividad a diferentes valores de pH, la inhibición con el Na_3VO_4 y las constantes cinéticas indican que la H^+ -ATPasa en *S. schenckii* es una ATPasa tipo P como la descrita en otros hongos

El control del pH intracelular en las células eucariotas es complejo y en él participa una variedad de mecanismos que incluye el funcionamiento de los antiportadores Na^+/H^+ , los intercambiadores $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ y las bombas de protones dependientes del ATP. Algunos autores han demostrado una correlación entre el poco crecimiento en las levaduras, la actividad de la H^+ -ATPasa y el pH intracelular (Serrano *et al.*, 1992, Portillo, 1997). En algunos parásitos se ha reportado que la regulación del pH intracelular se debe a la H^+ -ATPasa. Cuando se utilizan inhibidores específicos de la enzima disminuye el flujo de protones y ello afecta la diferenciación del parásito (Marchesini y Docampo, 2002).

En las plantas y los hongos las ATPasas de protones constituyen las bombas primarias más importantes y son además relevantes para la regulación del pH intracelular. La H^+ -ATPasa se ha considerado un enzima importante para el

mantenimiento del pH intracelular en los hongos patógenos dimórficos. En *C. albicans* el crecimiento del micelio se ha correlacionado con cambios en el pH citoplásmico (de 6.8 a 8) y con el aumento en la actividad de la H⁺-ATPasa, lo que ha sugerido que la bomba contribuye al mantenimiento del pH intracelular durante la transición morfológica de este hongo (Kaur y Mishra, 1991, Monk *et al.*, 1991, 1993). Sin embargo en *C. albicans* los parámetros cinéticos son muy similares en ambos tipos de crecimiento: en la levaduras la K_{0.5} es de 3.0 mM y la Vmax 0.8 μmol min⁻¹mg⁻¹de proteína y en el micelio la K_{0.5} es de 2.9 mM y Vmax 0.6 μmol min⁻¹mg⁻¹de proteína (Monk *et al.*, 1993). En el caso de *S. schenckii* también se observa que la cinética encontrada para la enzima del micelio y de la levadura son muy similares. En *C. albicans* se ha observado una diferencia en la actividad específica y la morfología, el micelio tiene una mayor actividad específica (431 nmolas min⁻¹mg⁻¹) comparada con la enzima de la levadura (210 nmolas min⁻¹mg⁻¹) (Kaur y Mishra, 1991). En cambio en *S. schenckii* no encontramos una diferencia relacionada con el tipo de crecimiento con la actividad específica. En micelio fue de 443.7 nmolas min⁻¹mg⁻¹ y en la levadura fue de 561.1 nmolas min⁻¹mg⁻¹.

Los resultados obtenidos sugieren que en general la actividad de la H⁺-ATPasa no cambia con el dimorfismo cuando el pH extracelular varía de forma importante. Sin embargo, es importante señalar que la diferencia en la sensibilidad al vanadato puede indicar una diferencia entre las dos enzimas y que puede ser a nivel del sitio catalítico.

Por ello sería importante realizar estudios de la actividad de la enzima durante el proceso de transición dimórfica para determinar si la enzima desempeña un papel importante durante este proceso.

VI. CONCLUSIONES

- Se obtuvieron fracciones enriquecidas en membranas plasmáticas para el micelio y para la levadura.
- La H⁺-ATPasa de *S. shenckii* es una ATPasa de tipo P con los siguientes parámetros cinéticos:
 - pH óptimo entre 6.5 a 7.0.
 - Km de 1.4 mM para el micelio y 1.1 mM para la levadura.
 - Vmax de 0.55 $\mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ para el micelio y 0.62 $\mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ para la levadura.
 - Ki de 25 μM para el micelio y 15 μM para la levadura.
- Entre ambos tipos de crecimiento no hubo diferencias significativas en la actividad de la enzima en cuanto a los parámetros cinéticos de Km y Vmax.
- Ambas morfologías mostraron valores de Ki con diferencias estadísticamente significativas, lo que indica que la diferencia entre las dos enzimas puede ser a nivel del sitio catalítico. Sin embargo estas diferencias son muy pequeñas pues no afectan los parámetros cinéticos de la enzima.
- La actividad de la H⁺-ATPasa no cambia con los diferentes tipos de crecimiento a pesar de que el pH del medio de cultivo en donde crecen es determinante para la morfología.

VII. BIBLIOGRAFÍA

Abdallah B.M., Simoes T., Fernandes A.R., Strauss J., Seiboth B., Sá-Correia I. and Kubicek C.P. (2000). Glucose does not activate the plasma-membrane-bound H⁺-ATPase but affects pmaA transcript abundance in *Aspergillus nidulans*. Arch. Microbiol.; **174**:340-345.

Ambesi A., DeWitt N., Petrov V., Gupta S. and Slayman C. (1998). Structure-function relationships in transmembrane segments 4, 5 and 6 of the yeast plasma-membrane H⁺-ATPase. Acta Physiol. Scand.; suppl **643**:107-113.

Ambesi A., Miranda M., Petrov V. and Slayman C. (2000). Biogenesis and function of the yeast plasma-membrane H⁺-ATPase. J. Exp. Biol.; **203**:155-160.

Amory A. and Goffeau A. (1982). Characterization of the β-aspartyl phosphate intermediate formed by the H⁺-translocating ATPase from the yeast *Schizosaccharomyces pombe*. J. Biol. Chem.; **257**:4723-4730.

Aquino-Piñero E. and Rodríguez-del Valle N. (1997). Different protein kinase C isoforms are present in the yeast and mycelium forms of *Sporothrix schenckii*. Mycopathologia; **138**:109-115.

Aver M., Scarborough G.A. and Kuhlbrandt W. (1998). Three-dimensional map of the plasma membrane H⁺-ATPase in the open conformation. Nature; **392**:840-843.

Axelsen K.B. and Palmgren M.G. (1998). Evolution of substrate specificities in the P-type ATPase superfamily. J. Mol. Evol.; **46**:84-101.

Becher dos Passos J.B., Vanhalewyn M., Brandao R.L., Castro I.M., Nicoli J.R. and Thevelein J. (1992). Glucose-induced activation of plasma membrane H⁺-ATPase in mutants of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* affected in cAMP

metabolism, cAMP depend protein phosphorylation and the initiation of glycolysis. *Biochim. Biophys. Acta*; **1136**:57-67.

Bowman E.J., Bowman B.J. and Slayman C. (1981 a). Isolation and characterization of plasma membranes from wild type *Neurospora crassa*. *J. Biol. Chem.*; **256**: 12336-12342.

Bowman B.J., Blascos F. and Slayman C. (1981 b). Purification and characterization of the plasma membrane ATPase of *Neurospora crassa*. *J. Biol. Chem.*; **256**: 12343-12349.

Bowman B. J. (1983). Kinetic evidence for interacting active sites in the *Neurospora crassa* plasma membrane ATPase. *J. Biol. Chem.*; **258**:13002-13007.

Bowman B.J. and Bowman E.J. (1986). H⁺-ATPases from mitochondria, plasma membranes and vacuoles of fungals cells. *J. Membr. Biol.*; **94**:83-97.

Bracey D., Holyoak C.D., Nebe-von G. and Coote P.J. (1998). Determination of the intracellular ph (pHi) of growing cells of *Saccharomyces cerevisiae*: the effect of reduced-expression of the membrane H⁺-ATPase. *J. Microbiol. Meth.*; **31**:113-125.

Brown A.J.P. and Gow N.A.R. (1999). Regulatory networks controlling *Candida albicans* morphogenesis. *Trends Microbiol.*; **7**:333-337.

Carmelo V., Bogaerts P. and Sá-Correia I. (1996). Activity of plasma membrane H⁺-ATPase and expression of pma1 and pma2 genes in *Saccharomyces cerevisiae* cells grown at optimal and low pH. *Arch. Microbiol.*; **166**:315-320.

Carmelo V., Santos H. and Sá-Correia I. (1997). Effect of extracellular acidification on the activity of plasma membrane ATPase and on the cytosolic and vacuolar pH of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta*; **1325**:63-70.

Chaturvedi V.P., Chaturvedi S., Randhawa H.S., Khan Z.U. and Puri B.K. (1990). Isolation and partial characterization of a plasma membrane-enriched fraction of *Blastomyces dermatitidis*. *Microbios*; **61**:145-151.

Coukell M., Moniakis J. and Cameron A. (1997). The *patB* gene of *Dictyostelium discoideum* encodes a P-type H⁺-ATPase isoform essential for growth and development under acidic conditions. *Microbiology*; **143**:3877-3888.

Cox K.H., Pinchak A.B. and Cooper T.G. (1999). Genome-wide transcriptional analysis in *S. cerevisiae* by mini-array membrane hybridization. *Yeast*; **15**:703-713.

De la Fuente N., Maldonado A.M. and Portillo F. (1997). Glucose activation of the yeast plasma membrane H⁺-ATPase requires the ubiquitin-proteasome proteolytic pathway. *FEBS Letters*; **411**:302-312.

Denison S. (2000). pH regulation of gene expression in fungi. *Fungal Genet. Biol.*; **29**:61-71.

Dutra M., Ambesi A. and Slayman C. (1998). Structure-function relationships in membrane segment 5 of the yeast *pma1* H⁺-ATPase. *J. Biol. Chem.*; **273**:17411-17417.

Espinosa-Texis A., Hernández-Hernández F., Lavalle P., Barba-Rubio J. y López-Martínez R. (2000). Estudio de 50 pacientes con esporotricosis. Evaluación clínica y de laboratorio. *Gac. Med. Mex.*; **137**:111-116.

Eraso P. and Portillo F. (1994). Molecular mechanism of regulation of yeast plasma membrane H⁺-ATPase by glucose. *J. Biol. Chem.*; **269**:10393-10399.

Fagan M.J. and Saier M.H. Jr. (1994). P-type ATPases of eukaryotes and bacteria: sequence analyses and construction of phylogenetic trees. *J. Mol. Evol.*; **38**:57-99.

García-Arranz M., Maldonado M., Mazon M.J. and Portillo F. (1994). Transcriptional control of yeast plasma membrane H⁺-ATPase by glucose. *J. Biol. Chem.*; **269**:18076-18082.

Gilkes N.R. and Weeks G. (1977). The purification and characterization of *Dictyostelium discoideum* plasma membranes. *Biochim. Biophys. Acta*; **464**:142-156.

Goffeau A. and Slayman C. (1981). The proton-translocating ATPase of the fungal plasma membrane. *Biochim. Biophys. Acta*; **639**:197-223.

González-Romo P., Sánchez-Nieto S. and Gavilanes-Ruiz M. (1992). A modified colorimetric method for the determination of orthophosphate in the presence of high ATP concentrations. *Anal. Biochem.*; **200**:235-238.

Gorgojo B., Portillo F. and Martínez-Suárez M. (2000). Sequencing and heterologous expression in *Saccharomyces cerevisiae* of a *Cryptococcus neoformans* cDNA encoding a plasma membrane H⁺-ATPase. *Biochim. Biophys. Acta*; **1509**:103-110.

Goossens A., De la Fuente N., Forment J., Serrano R. and Portillo F. (2000). Regulation of yeast H⁺-ATPase by protein kinases belonging to a family dedicated to activation of plasma membrane transporters. *Mol. Cell Biol.*; **20**:7654-7661.

Kaur S. and Mishra P. (1991). Dimorphism associated changes in plasma membrane H⁺-ATPase activity of *Candida albicans*. *Arch. Microbiol.*; **156**:412-415.

Kühlbrandt W., Aver M. and Scarborough G. (1998). Structure of the P-type ATPases. *Curr. Op. Struct. Biol.*; **8**:510-516.

Kwon-Chung K.J., and Bennett J.E. (1992). *Medical Mycology*. Lea & Febiger, p 707. Pennsylvania, USA.

Lavalle P. (1979). "Esporotricosis" en: Simposio Syntex Desarrollo y estado actual de la micología en México. Instituto Syntex, p 115. México D.F.

Lingrel J.B. (2001). Transport ATPase trafficking. J. Biol. Chem.; **276**:29611.

Lutsenko S. and Kaplan J.H. (1995). Organization of P-type ATPases: significance of structural diversity. Biochemistry; **34**:15607-15613.

Marchesini N. and Docampo R. (2002). A plasma membrane P-type H⁺-ATPase regulates intracellular pH in *Leishmania mexicana amazonensis*. Mol. Biochem. Parasitol.; **119**: 225-236.

Mason A.B., Kardos T. and Monk B. (1998). Regulation and pH-dependent expression of bilaterally truncated yeast plasma membrane H⁺-ATPase. Biochim. Biophys. Acta; **1372**:261-271.

Miranda M., Allen K.E., Pardo J.P. and Slayman C. (2001). Stalk segment 5 of the yeast Plasma Membrane H⁺-ATPase. Mutational evidence for a role in glucose regulation. J. Biol. Chem.; **276**:22485-22490.

Moller J.V., Juvi B. and Maire M. (1996). Structural organization, ion transport and energy transduction of P-type ATPases. Biochim. Biophys. Acta; **1286**: 1-51.

Monk B.C., Montesinos C., Ferguson C., Leonard K. and Serrano R. (1991) Immunological approaches to the transmembrane topology and conformational changes of the carboxyl-terminal regulatory domain of yeast plasma membrane H⁺-ATPase. J. Biol. Chem.; **266**:18097-18103.

Monk B.C., Niimi M. and Shepherd G. (1993). The *Candida albicans* plasma membrane and H⁺-ATPase during yeast growth and germ-tube formation. J. Bacteriol.; **175**:5566-5574.

Morsomme P., Slayman C. and Goffeau A. (2000). Mutagenic study of structure function and biogenesis of the yeast plasma membrane H⁺-ATPase. *Biochim. Biophys. Acta*; **1469**:133-157.

Na S., Perlin D.S., Seto-Young D., Wang G. and Haber J.E. (1993). Characterization of yeast plasma membrane H⁺-ATPase mutant pma1-A135V and its revertants. *J. Biol. Chem.*; **268**: 11792-11797.

Nakamoto R., Verjovski-Almeida S., Allen K., Ambesi A., Rao R. and Slayman C. (1998). Substitutions of aspartate 378 in the phosphorylation domain of the yeast PMA1 H⁺-ATPase disrupt protein folding and biogenesis. *J. Biol. Chem.*; **273**:7338-7344.

Palmgren M.G. and Christensen G. (1994). Functional comparisons between plant plasma membrane H⁺-ATPase isoforms expressed in yeast. *J. Biol. Chem.*; **269**:3027-3033.

Petrov V. and Slayman C. (1995). Site-directed mutagenesis of the yeast PMA1 H⁺-ATPase. Structural and functional role of cysteine residues. *J. Biol. Chem.*; **270**:28535-28540.

Portillo F. (1997). Characterization of dominant lethal mutations in the yeast plasma membrane H⁺-ATPase gene. *FEBS Letters*; **402**:136-140.

Portillo F. (2000). Genetic characterization of the 534DPPR motif of the yeast plasma membrane H⁺-ATPase. *Biochim. Biophys. Acta*; **1468**:99-106.

Rippon J.W. (1990). *Medical Mycology: The pathogenic fungi and the pathogenic actinomycetes*. W.B. Saunders Company, p. 325. Philadelphia Pennsylvania, USA.

Scarborough G.A. (1975). Isolation and characterization of *Neurospora crassa* plasma membranes. J. Biol. Chem.; **250**:1106-1111.

Scarborough G.A. and Hennessey J.P Jr. (1990) Identification of the major cytoplasmic regions of the *Neurospora crassa* plasma membrane H⁺-ATPase using chemical technique. J. Biol. Chem.; **265**:16145-16149.

Scarborough G.A. (1999). Structure and function of the P-type ATPases. Curr. Opin. Cell Biol.; **11**:517-522.

Schlesser A., Ulaszewski S., Ghislain M. and Goffeau A. (1988). A second transport ATPase gene in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Biol. Chem.; **263**:19480-19487.

Serrano R. (1983). *In vivo* glucose activation of the yeast plasma membrane ATPase. FEBS Letters; **156**:11-14.

Serrano R. (1988). Structure and function of proton translocating ATPase in plasma membranes of plants and fungi. Biochim. Biophys. Acta; **947**:1-28.

Serrano R., Portillo F., Monk B.C. and Palmgren M.G. (1992). The regulatory domain of fungal and plant plasma membrane H⁺-ATPase. Acta Physiol. Scand.; **146**:131-136.

Serrano R. (1993). Structure, function and regulation of plasma membrane H⁺-ATPase. FEBS Letters; **325**:108-111.

Soteropoulos P., Vaz T., Santangelo R., Paderu P., Huang D.Y., Tamas M.J. and Perlin D.S. (2000). Molecular characterization of the plasma membrane H⁺-ATPase, an antifungal target in *Cryptococcus neoformans*. Antimicrob. Agents Chemother.; **44**:2349-2355.

Souza M.A., Trópia M.J. and Brandao R.L. (2001). New aspects of the glucose activation of the H⁺-ATPase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology*; **147**:2849-2855.

Stewart E., Hawser S. and Gow N.A. (1989). Changes in internal and external pH accompanying growth of *Candida albicans*: studies of non-dimorphic variants. *Arch. Microbiol.*; **151**:149-153.

Struck C., Hahn M. and Mendgen K. (1996). Plasma membrane H⁺-ATPase activity in spores germ-tubes, and haustoria of the rust fungus *Uromyces viciae-fabae*. *Fungal Genet. Biol.*; **20**:30-35.

Tang X., Halleck M.S., Schleger R.A. and Williamson P. (1992). A subfamily of P-type ATPase with aminophospholipid transporting activity. *Science*; **272**:1495-1497.

Toledo M., Levery S., Stratus A. and Takahashi H. (2000). Dimorphic expression of cerebroside in the mycopathogen *Sporothrix schenckii*. *J. Lipid. Res.*; **41**:797-806.

Toyoshima C., Nakasako M., Nomura H. and Ogawa H. (2000). Crystal structure of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum at 2.6 Å resolution. *Nature*; **405**:647-655.

Ulaszewski S., Van Herck J-C., Dufour J-P., Kulpa J., Nieuwenhuis B. and Goffeau A. (1987). A single mutation confers vanadate resistance to the plasma membrane H⁺-ATPase from the yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Biol. Chem.*; **262**:223-228.

Velasco O. y González A. (1976). "La esporotricosis en un pequeño poblado de Puebla". *Rev. Inv. Salud Pública*; **36**:133-137.

Wach A., Ahlers J. and Gräber P. (1990). The H⁺-ATPase of the plasma membrane from yeast kinetics of ATP hydrolysis in native membranes isolated and reconstituted enzymes. *Eur. J. Biochem.*; **189**:675-682.

Wach A., Supply P., Dufour J-P. and Goffeau A. (1996). Amino acid replacements at seven different histidines in the yeast plasma membrane H⁺-ATPase reveal critical positions at His285 and His 701. *Biochemistry*; **35**:883-890.

Willsky G.R. (1979). Characterization of the plasma membrane Mg²⁺-ATPase from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*; **254**:3326-3332.

Zhang P., Toyoshima C., Yonekura K., Green N.M. and Stokes D.L. (1998). Structure of the calcium pump from sarcoplasmic reticulum at 8°A resolution. *Nature*; **392**:835-839.

MEDIOS DE CULTIVO

Medio YEPD-Agar

Extracto de levadura	1%
Peptona de caseína	2%
Dextrosa anhidra	2%
Agar	2%

Disolver en 100 ml de agua destilada y esterilizar.

Medio RV, pH 7.2

	gr/l
Glucosa	20
Na ₂ HPO ₄	1.6
KH ₂ PO ₄	0.5
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.25
Arginina	1
NH ₄ HCO ₃	1
*Sol. de oligoelementos	10 µl
Biotina 100µg/ml	10 µl
Tiamina 100µg/ml	10 µl

Se ajusta el pH a 7.2 con HCl concentrado y se esteriliza por filtración.

*Se preparó de acuerdo a Rodríguez del Valle 1979.

Medio RV, pH 5.5

La preparación de este medio se hizo de acuerdo a lo descrito para el medio RV pH 7.2 ajustando el pH a 5.5 con HCl concentrado.

AMORTIGUADORES Y SOLUCIONES

Todos los reactivos utilizados a lo largo del estudio fueron adquiridos en Sigma Chemical y a J.T.Baker, México.

Amortiguador de Rompimiento Celular (BR)

EDTA	2.5 mM
PMSF	1 mM
Tris pH 7.5	50 mM
Glucosa	4%

Esterilizar por filtración y almacenar a 4°C.

Amortiguador de glicerol (BG)

Glicerol	20%
EGTA	1 mM
PMSF	1 mM
Tris pH 7	10 mM

Esterilizar por filtración.

Floruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF)

Este reactivo se prepara al momento a una concentración 100 mM y se disuelve en dimetilsulfóxido.

Sacarosa 53.5%

Sacarosa	53.5gr
EDTA	1 mM
Tris pH 7	10 mM

Esterilizar por filtración. Mantener a 4°C.

Sacarosa 43.5%

Sacarosa	43.5 gr
EDTA	1 mM
Tris pH 7	10 mM

Esterilizar por filtración. Mantener a 4°C.

EGTA pH 7.2

EGTA 1 mM

Ajustar el pH 7.2 con Tris-base (reactivo).

ATP

ATP 250 mM

Ajustar el pH a 6.5 con Tris-base (reactivo). Almacenar a -20°C.

Carbonilcianil-m-clorofenil-hidrozona (CCCP)

CCCP 1000 μ M

Disolver en etanol absoluto. Almacenar a -20°C en condiciones de oscuridad.

Poliacetileno 20 cetil eter (BRIJ58).

Brij 58 1%

Mantener a -20°C.

Mes-BTP pH 6.5

Ácido monohidratado 2-N-morfolino-etanol-sulfónico (Mes) 30 mM

Ajustar el pH a 6.5 con 1,3-bis-tris hidroximetilamino propano. Almacenar a temperatura ambiente.

MgCl₂

MgCl₂ 100 mM

Almacenar a -20°C.

Vanadato (Na₃VO₄)

Na₃VO₄ 5 mM

Ajustar el pH a 13 con NaOH. Almacenar a -20°C.

Azida de sodio (NaN₃)

NaN₃ 150 mM. Almacenar a -20°C

Nitrato de potasio (KNO_3)

KNO_3 1 M

Mantener a -20°C .

Fosfoenolpiruvato

Fosfoenolpiruvato 250 mM

Almacenar a -20°C .

Piruvato cinasa

Se utilizó un extracto crudo de músculo de conejo (Sigma).

Piruvato cinasa 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$

Almacenar a 4°C .

Determinación de proteína por el método de Lowry (modificado por Peterson 1977).

Reactivos y Soluciones

1.- Desoxicolato de Na (DOC) 0.15%.

2.- Dodecil sulfato de sodio (SDS) 10%

3.- Hidroxido de sodio (NaOH) 0.8 N

4.- Reactivo Folin-Ciocalteu. Mezclar un volumen del reactivo con cinco volúmenes de agua.

5.- Solución de carbonato-tartrato-cobre (CTC). Se compone de Na_2CO_3 al 10% CuSO_4 al 0.1% y de tartrato de Na K al 0.2%.

6.- Reactivo A. Mezclar una parte igual de las soluciones CTC, NaOH, SDS y H_2O .

7.- Albúmina sérica bovina (BSA). Hacer una solución de 1 mg/ml en agua destilada. Congelar hasta su uso.

Procedimiento:

1.- De la solución concentrada de BSA colocar en tubos de ensaye de 10 a 60 μg y aforar a 900 μl .

2.- Poner en tubos de ensaye 6 μl de la muestra problema y aforar a 900 μl

3.- Añadir 100 μl de NaDOC. Agitar.

- 4.- Agregar 1 ml de la solución A. Agitar.
- 5.- Añadir 500 μ l de reactivo B. Agitar
- 6.- Esperar 30 min a temperatura ambiente.
- 7.- Leer a 750 nm.

Determinación del fosfato inorgánico liberado (Pi)

Preparación de las soluciones:

- 1.- Las soluciones que se requieren deben ser preparadas y almacenadas en recipientes libres de fosfatos; para esto el material se debe lavar con Dextran y sumergirlo en una solución de ácido sulfúrico por lo menos dos días antes de su uso (este tiempo dependerá de la concentración y calidad del ácido sulfúrico).
- 2.- En la preparación de las soluciones se debe usar agua bidestilada.
- 3.- Solución K_2HPO_4 . 1 mM. Se prepara a partir de la sal previamente secada por calor, poniendo aproximadamente 5 gr de sal en un horno a 100°C por 12 horas con el fin de deshidratarla. Después se toma la cantidad necesaria para hacer una solución concentrada 10 mM y con ésta, se hace una dilución para tener una solución de 1 mM de fosfatos con la que se hace una curva patrón.
- 4.- Solución A. Se compone de dodecil sulfato de sodio (SDS) al 24%. Es muy importante usar el reactivo con alto grado de pureza. Otros SDS con menor pureza dan blancos muy azules.
- 5.- Solución de HCl 1 N. Deber ser preparada de acuerdo a su densidad y pureza.
- 6.- Solución B. Se compone de ácido ascórbico al 12% disuelto el HCl 1 N.
- 7.- Solución C. Se compone de molibdato de amonio al 2% en HCl 1 N.
- 8.- Solución B-C. Se compone de la mezcla de la solución B-C en relación 1:1 (v/v). Se debe tener cuidado de añadir la solución B a la C; la mezcla se tornará amarilla.
- 9.- Solución E. Se compone de citrato de sodio al 2%, metaarsenito de sodio al 2% y ácido acético al 2% en agua bidestilada.

Procedimiento:

- 1.- De la solución concentrada de K_2HPO_4 1 mM se añaden de 1 a 100 nmolas a los tubos de la curva patrón y el volumen se afora a 150 μ l con agua bidestilada.

- 2.- Añadir 150 μl de la solución A. Agitar
- 3.- Añadir 300 μl de la solución B-C. Agitar
- 4.- Esperar de 3 a 7 min a temperatura ambiente.
- 5.- Añadir 450 μl de la solución E. Agitar.
- 6.- El volumen final es de 1050 μl .
- 7.- Esperar 20 minutos a temperatura ambiente. El color es estable hasta 5 hrs.
- 8.- Leer la absorbancia a 850 nm.