

Glucosa-6-fosfatasa de envoltura nuclear de hígado de rata.

Freddy González-Mujica.

Sección de Bioquímica Médica, Instituto de Medicina Experimental, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela. Apartado 50.587, Sabana Grande, Caracas, Venezuela.

Palabras clave: Glucosa-6-fosfatasa, envoltura nuclear, microsomas, floricina.

Resumen. Se comparó la actividad de la glucosa-6-fosfatasa (G-6-Pasa) de envoltura nuclear (EN) con la microsomal. Los microsomas intactos fueron incapaces de hidrolizar manosa-6-fosfato (M-6-P); por el contrario, la EN intacta fue capaz de hidrolizar dicho sustrato. La galactosa-6-fosfato mostró ser un buen sustrato tanto para la enzima de EN como microsomal, con una latencia similar a la obtenida para M-6-P utilizando microsomas, por lo cual galactosa-6-fosfato fue usado para medir el porcentaje de EN intactas. Los parámetros cinéticos (K_{ii} y K_{is}) de la inhibición por floricina de la G-6-Pasa de EN intactas, utilizando glucosa-6-fosfato (G-6-P) y M-6-P como sustrato, fueron aproximadamente iguales. El transportador T1 de EN fue más sensible a la amiloride que el microsomal. Por el contrario, el sistema microsomal fue más sensible al efecto de N-etilmaleimida (NEM) que el de EN y este último, fue prácticamente insensible a los inhibidores de transporte aniónico DIDS y SITS, los cuales afectan fuertemente la enzima microsomal. Los resultados anteriores permiten sugerir que en la EN existe un transportador de hexosas-6-fosfato, capaz de transportar G-6-P y M-6-P y quizás otras hexosas-6-fosfato y que, o es diferente al T1 microsomal, o si es igual es influenciado por las características del sistema membranoso en el cual está incluido. La capacidad superior de hidrólisis de PP_i de la G-6-Pasa de EN intacta, en comparación con la de microsomas intactos, sugiere diferencias en el transportador de P_i/PP_i (T2) de ambos sistemas. La menor sensibilidad de la G-6-Pasa de EN al NEM sugiere que la subunidad catalítica de este sistema también podría tener algunas diferencias con la isoforma microsomal.

Glucose-6-phosphatase from nuclear envelope in rat liver.
***Invest Clin* 2008; 49(2): 169 - 180**

Key words: Glucose-6-phosphatase, nuclear envelope, microsomes, phlorizin.

Abstract. Nuclear envelope (NE) and microsomal glucosa-6-phosphatase (G-6-Pase) activities were compared. Intact microsomes were unable to hydrolyze mannose-6-phosphate (M-6-P), on the other hand, intact NE hydrolyzes this substrate. Galactose-6-phosphate showed to be a good substrate for both NE and microsomal enzymes, with similar latency to that obtained with M-6-P using microsomes. In consequence, this substrate was used to measure the NE integrity. The kinetic parameters (K_{ii} and K_{is}) of the intact NE G-6-Pase for the phlorizin inhibition using glucose-6-phosphate (G-6-P) and M-6-P as substrates, were very similar. The NE T1 transporter was more sensitive to amiloride than the microsomal T1. The microsomal system was more sensitive to N-ethylmaleimide (NEM) than the NE and the latter was insensitive to anion transport inhibitors DIDS and SITS, which strongly affect the microsomal enzyme. The above results allowed to postulate the presence of a hexose-6-phosphate transporter in the NE which is able to carry G-6-P and M-6-P, and perhaps other hexose-6-phosphate which could be different from that present in microsomes or, if it is the same, its activity could be modified by the membrane system where it is included. The higher PP_i hydrolysis activity of the intact NE G-6-Pase in comparison to the intact microsomal, suggests differences between the P_i/PP_i transport (T2) of both systems. The lower sensitivity of the NE G-6-Pase to NEM suggests that the catalytic subunit of this system has some differences with the microsomal isoform.

Recibido: 27-06-2006. Aceptado: 13-09-2007.

INTRODUCCIÓN

La existencia de la enzima glucosa-6-fosfatasa (G-6-Pasa; EC 3.1.3.9) en núcleos y envoltura nuclear (EN) fue reportada en 1964 por Widnell y Tata (1) y representa entre el 15 y el 20% del total de la enzima hepática; el 80% restante está ubicado en la fracción microsomal (2). La G-6-Pasa microsomal está constituida por varios polipéptidos (3): una subunidad catalítica, cuyo centro activo mira el lumen del retículo endoplasmático y es capaz de hidrolizar varias hexosas-6-fosfato y pirofosfato; una proteína estabilizadora (SP) unida a la subunidad catalítica, manteniendo a esta última activa;

un transportador altamente específico (T1) para glucosa-6-fosfato (G-6-P) el cual permite al sustrato, producido en el citosol, atravesar la membrana microsomal para ponerse en contacto con el centro activo de la subunidad catalítica y dos sistemas de transporte T2 y T3, que permiten la salida del microsoma de los productos de la reacción, fosfato y glucosa respectivamente.

La fracción microsomal obtenida por centrifugación diferencial está constituida por una mezcla de vesículas intactas y rotas, y el porcentaje de microsomas intactos se establece ensayando la G-6-Pasa con manosa-6-fosfato (M-6-P) como sustrato. La M-6-P es sustrato de la G-6-Pasa en vesícu-

las microsomas rotas, pero no es transportada al interior del lumen de las vesículas microsomas intactas por T1. En consecuencia, el porcentaje de hidrólisis de M-6-P por vesículas rotas que no se expresa en vesículas no tratadas puede ser usado para estimar que tan intacta es la fracción microsomal obtenida (4). Según se ha reportado, una diferencia importante entre la EN y la fracción microsomal es que la primera es menos intacta que la segunda (5).

Aun cuando la actividad de la G-6-Pasa de EN representa sólo una quinta parte de la actividad total de la G-6-Pasa hepática, los pocos estudios previos sobre la caracterización de la enzima de EN han sido realizados presumiendo que es idéntico al sistema microsomal (5).

Entre las moléculas que modifican la actividad catalítica de la G-6-Pasa microsomal se encuentran la floricina que es un inhibidor competitivo de T1 (6); el bloqueador de grupos sulfidrilos, N-etilmaleimida (7), el cual produce una inhibición no competitiva tanto de T1 como de la subunidad catalítica; la amiloride (8), la cual se comporta fundamentalmente como un activador de T1, y los inhibidores del transporte de aniones: ácido 4,4'-diisotiocianoestilbena 2,2' disulfónico (DIDS) y ácido 4-acetamino-4-isociano-estilbena 2,2' disulfónico (SITS) (9), que ejercen una inhibición mixta sobre T1.

En el presente trabajo se reportan algunas de las propiedades catalíticas y de transporte del sistema G-6-Pasa de EN que no han sido investigadas previamente y que permiten establecer diferencias con la enzima microsomal.

MATERIALES Y MÉTODOS

Químicos

Histonas (tipos IIA y IIAS), G-6-P, M-6-P, trehalosa-6-fosfato, ácido 6-fosfogluconico, galactosa-6-fosfato, glucosamina-6-

fosfato, fructosa-6-fosfato, pirofosfato (PPi), N-acetilglucosamina-6-fosfato, floricina, N-etilmaleimida (NEM), ácido 4,4'-diisotiocianoestilbena 2,2' disulfónico (DIDS), ácido 4-acetamino-4-isociano-estilbena 2,2' disulfónico (SITS) y amiloride, fueron adquiridos de Sigma (St Louis MO, USA). Todos los otros reactivos fueron de grado analítico.

Preparación de EN y Fracción microsomal

Se usaron ratas macho de la cepa Sprague-Dawley, mantenidas en ayuno durante la noche y con un peso corporal de 200-250 g. Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical y los núcleos hepáticos fueron aislados como describieron Widnell y Tata (1). La fracción post-nuclear fue centrifugada a 20.000g por 20 min a 4°C; el sobrenadante obtenido fue centrifugado de nuevo a 105.000g por 1 h a 4°C y el sedimento fue usado como la fracción microsomal. A partir de la fracción nuclear purificada como se mencionó antes, la EN fue obtenida por el método de la doble digestión con desoxiribonucleasa y separada en un gradiente de densidad de sacarosa 36-52% p/p en 0,1 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl pH 7,5 (10). Las fracciones microsomal y de EN, fueron resuspendidas en 0,25 M sacarosa, 1 mM MgCl₂, 5 mM HEPES pH 6,5, a una concentración aproximada de proteínas de 20 mg/mL y fueron conservadas a -80°C hasta su uso.

Ensayo de G-6-Pasa

La actividad de G-6-Pasa microsomal y de EN fue determinada usando como substratos G-6-P, M-6-P, PPi, glucosamina-6-fosfato, fructosa-6-fosfato, N-acetilglucosamina-6-fosfato y galactosa-6-fosfato, de acuerdo a Burchell y col. (11). En un volumen de 0,1 mL las concentraciones finales fueron para los substratos entre 0,5 y 7,5 mM de PPi o entre 1 y 30 mM de G-6-P o M-6-P, 2 mM EDTA, 16 mM amortiguador cacodilato (para los ensayos con PPi) ó 16

mM HEPES (para todos los otros substratos) pH: 6,5; para romper la integridad de las membranas de EN y microsomas se adicionó 0,8 mg/mL de histonas (11). La reacción se inició por la adición de 15-25 μg de proteínas de EN o microsomas; luego de 10 min a 30°C la reacción se detuvo y el fosfato liberado se cuantificó por la adición de 0,9 mL de 1,11% ácido ascórbico, 1,11% SDS, 0,28% molibdato de amonio en 0,33 M ácido sulfúrico recientemente preparado. El color se dejó desarrollar por 20 min a 45°C y la absorción se leyó a 820 nm (11).

Los valores del K_M y de la V_{MAX} fueron calculados a partir de las gráficas de Michaelis y Menten, utilizando el programa de computación Enzfitter

La actividad enzimática se expresó: como actividad específica (nmol de Pi liberado /min/mg de proteína) en las determinaciones puntuales con los diferentes substratos; la V_{MAX} se expresó en nmol de Pi liberado/min cuando el substrato utilizado fue una hexosa fosfato, y en nmol de PPI hidrolizado/min cuando el substrato fue PPI y el K_M en mM.

Latencia y proporción de vesículas intactas

La latencia es una característica común de las enzimas asociadas a membrana y se define como el porcentaje de la actividad presente en vesículas membranosas totalmente rotas que no se expresa en las no tratadas.

Las fracciones microsomal y de EN están constituidas por una mezcla de vesículas con membranas intactas y otras con membranas rotas y se denominan preparaciones no tratadas. Cuando a las preparaciones se les adiciona histonas la integridad de la vesícula se pierde, el substrato tiene libre acceso a la subunidad catalítica y la preparación se denomina rota. La actividad de la enzima en las vesículas intactas se puede estimar sustrayendo la actividad del

componente roto de la actividad de las vesículas no tratadas, utilizando la siguiente ecuación:

$$V_{in} = V_{no} \frac{V_{ro} \frac{M_{no}}{M_{ro}}}{1 + \frac{M_{no}}{M_{ro}}}$$

En la cual V corresponde a la velocidad de la reacción usando G-6-P como substrato y M a la velocidad de la enzima con M-6-P como substrato; los subíndices: in, no y ro corresponden a preparaciones intactas, no tratadas y rotas, respectivamente (11). Esta ecuación permite obtener el valor teórico de la actividad de la G-6-Pasa (V_{in}) en preparaciones 100% intactas y, en consecuencia, permite comparar la actividad de fracciones con diferentes proporciones de vesículas intactas.

Adiciones al ensayo de G-6-Pasa

Floricina: un volumen apropiado de una solución madre de floricina (5 mM), mantenida a 47°C, fue transferido al ensayo de G-6-Pasa justo antes de la adición de las proteínas de EN o microsomas (6). La concentración final de floricina estuvo entre 0,5-2,0 mM; todas las otras condiciones fueron como se indicó antes.

NEM: Entre 3,5-9,0 mg/mL de proteínas de EN o microsomas fueron incubadas con 5mM NEM en 0,25 M sacarosa, 1 mM MgCl_2 , 5 mM HEPES pH: 6,5 por 15 min a 30°C, luego de lo cual se diluyó 10 veces con el mismo amortiguador frío (7). La EN y los microsomas así tratados fueron usados para realizar el ensayo de G-6-Pasa, tal como se describió previamente.

Amiloride: Fue adicionado antes de iniciar la reacción con las proteínas de EN o microsomas. Las reacciones controles y con amiloride contenían 1% dimetilsulfoxido. La concentración final de amiloride en el ensayo fue 5 mM (8); todas las demás condiciones se mantuvieron como fue indicado.

DIDS y SITS: Entre 0,7-2,0 mg de proteínas de EN o microsomas fueron incubadas con 0,1 mM DIDS o 1,0 mM SITS en 0,25 M sacarosa, 1 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl pH 7,4 por 5 min a 30°C (9) luego de lo cual la reacción fue diluida con igual volumen de solución fría de 0,25 M sacarosa, 1 mM MgCl₂, 5 mM HEPES pH 6,5. La EN y los microsomas así tratados fueron usados para realizar el ensayo enzimático tal como fue descrito.

Es importante destacar que el efecto de las moléculas referidas antes, fue medido utilizando como sustratos G-6-P y M-6-P a concentraciones entre 1 y 30 mM, siendo la más alta una concentración saturante para la G-6-Pasa tanto de EN y de microsomas intactos y rotos.

Las proteínas fueron medidas siguiendo una modificación del método de Lowry (12).

Los resultados se expresan como el promedio \pm la desviación estándar y la comparación estadística se realizó, cuando corresponde, utilizando la prueba "t" de Student.

RESULTADOS

La fracción microsomal obtenida de hígados, estuvo constituida por vesículas intactas y solamente una pequeña proporción de estructuras rotas; en consecuencia, cuando la G-6-Pasa microsomal fue ensayada con 1 mM de M-6-P como sustrato en preparaciones no tratadas se observó una muy baja actividad (Tabla I) lo cual signifi-

TABLA I
ACTIVIDAD DE FOSFOHIDROLASA DE G-6-PASA DE ENVOLTURA NUCLEAR Y MICROSOMAL CON VARIOS SUBSTRATOS

Envoltura nuclear	No tratados	Rotas	Latencia (%)
Sustrato			
Glucosa-6-P	102 \pm 8	198 \pm 16	49
Glucosamina-6-P	52 \pm 8	88 \pm 18	41
Fructosa-6-P	52 \pm 11	104 \pm 21	50
N-acetil glucosamina-6-P	9 \pm 2	29 \pm 4	69
Manosa-6-P	81 \pm 7	181 \pm 8	52
Manosa-6-P + 1mM Floricina	34 \pm 12	175 \pm 30	81
Galactosa-6-P	8 \pm 2	49 \pm 13	84
Microsomas			
Glucosa-6-P	53 \pm 4	205 \pm 13	74
Manosa-6-P	3 \pm 1	99 \pm 6	97
Glucosamina-6-P	11 \pm 3	105 \pm 6	90
Fructosa-6-P	15 \pm 1	96 \pm 5	84
N-acetil glucosamina-6-P	8 \pm 2	30 \pm 4	73
Galactosa-6-P	7 \pm 2	96 \pm 7	94

La actividad de fosfohidrolasa de la G-6-Pasa de EN y microsomas fue ensayada con 1 mM de los sustratos indicados en ausencia (no tratados) o en presencia de 0,8 mg/mL de histonas (rotos). Los resultados se expresan en nmol de Pi liberados/min/mg de proteínas y corresponden al promedio \pm la desviación estándar de al menos 3 experimentos en los cuales se usó el hígado de 2-4 ratas.

có una alta latencia. Por el contrario, las preparaciones no tratadas de EN presentaron una mayor actividad con 1 mM de M-6-P como sustrato, resultando en una menor latencia (Tabla I).

Se ensayó una variedad de sustratos potenciales alternativos de la enzima G-6-Pasa: trehalosa-6-fosfato, ácido 6-fosfogluconico, fructosa 1,6 bifosfato, y glucosa 1,6 bifosfato no fueron hidrolizados de manera significativa por la enzima G-6-Pasa de EN ni microsomal (resultados no mostrados). Por el contrario, se encontró que glucosamina-6-fosfato, fructosa-6-fosfato, n-acetil glucosamina-6-fosfato y galactosa-6-fosfato fueron hidrolizados por la enzima de preparaciones rotas de EN y microsomas (Tabla I). La latencia con glucosamina-6-fosfato, N-acetil glucosamina-6-fosfato y fructosa-6-fosfato como sustratos de la enzima de EN fue muy similar a la observada con G-6-P como sustrato (Tabla I). Sin embargo, cuando se usó galactosa-6-fosfato, a una concentración de 1 mM, como sustrato se observó una alta latencia tanto en EN como en microsomas, muy similar a la obtenida con microsomas cuando se usó 1 mM M-6-P como sustrato y con EN cuando se usó 1 mM M-6-P como sustrato, en presencia de 1 mM floridicina (Tabla I). En consecuencia, en el resto de este trabajo se usó 1 mM galactosa-6-fosfato para calcular el porcentaje de vesículas intactas en las preparaciones de EN.

En las figuras secundarias que resultaron de comparar la pendiente y el intercepto en "Y" contra la concentración de floridicina al ensayar la G-6-Pasa microsomal con G-6-P (entre 1 y 30 mM) como sustrato, se observó que en los microsomas intactos la pendiente cambió linealmente con el incremento de la concentración de floridicina (Fig. 1). Por el contrario, el intercepto en microsomas intactos y rotos y la pendiente en microsomas rotos no fueron afectados por la presencia del inhibidor. Las constan-

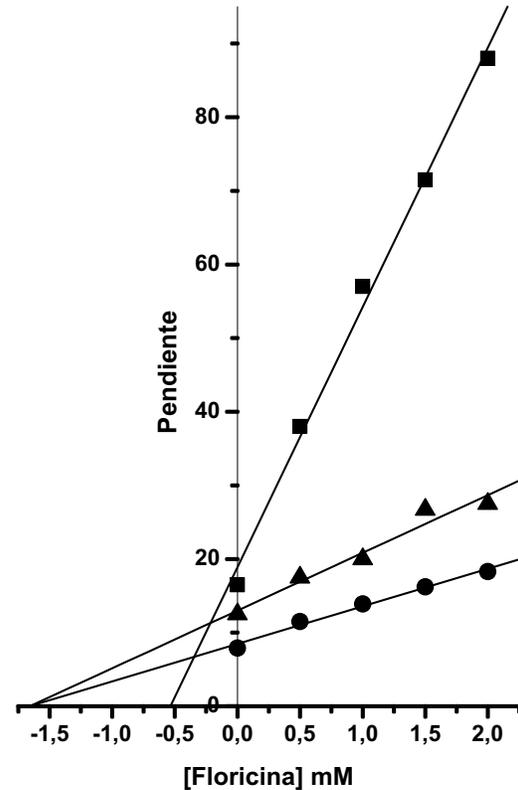


Fig. 1. Inhibición por floridicina de la G-6-Pasa microsomal y de envoltura nuclear. La actividad de la G-6-Pasa de microsomas y de EN intactas fue ensayada en presencia de cantidades crecientes de floridicina (0-2 mM). Para los microsomas se usó G-6-P como sustrato (—■—) y para la EN se usaron como sustrato: G-6-P (—●—) y M-6-P (—▲—). Luego de calcular los parámetros cinéticos, como se indicó en la Tabla II, se graficó la pendiente (K_M/V_{MAX}) contra la concentración de floridicina, de acuerdo a lo descrito por Cleland (15). A partir del intercepto en el eje X se calculó K_{is} .

tes cinéticas para la inhibición por floridicina en microsomas intactos con G-6-P como sustrato fueron: $K_{ii} = 4,44 \pm 0,18$ mM y $K_{is} = 0,54 \pm 0,10$. El efecto de la floridicina sobre la actividad de la enzima G-6-Pasa de EN, usando G-6-P y M-6-P como sustrato, se muestran en la Fig. 1. De manera similar a lo observado con microsomas (Fig. 1), sólo la pendiente de las gráficas de EN in-

tactas mostraron una relación lineal con la concentración del inhibidor. Los valores cinéticos para la inhibición con floricina de EN intactas con G-6-P como sustrato, fueron: $K_{ii} = 5,65 \pm 0,21$ y $K_{is} = 1,66 \pm 0,34$ y con M-6-P como sustrato, fueron: $K_{ii} = 4,90 \pm 0,36$ y $K_{is} = 1,66 \pm 0,46$.

Los valores de K_{ii} para la inhibición por floricina de EN (G-6-P y M-6-P como sustrato) y microsomas (G-6-P como sustrato) no mostraron diferencias estadísticamente significativas; sin embargo, los valores de K_{is} observados en EN fueron aproximadamente 3 veces más altos que los encontrados en la enzima microsomal.

De los valores presentados en la Tabla II se calculó que la latencia de la actividad de la G-6-Pasa microsomal utilizando G-6-P o PPI como sustrato, fue del 37-39% y se observó una disminución en el K_M de aproximadamente 3,5 veces cuando los microsomas fueron rotos por la presencia de histonas. La latencia de la G-6-Pasa de EN, cuando se usó G-6-P o PPI como sustrato fue muy baja; sin embargo, fue relativamente alta (26%) cuando se usó M-6-P como

sustrato. Cuando la EN fue rota por la adición de histonas, el K_M disminuyó cerca de 7 veces cuando se usó G-6-P o M-6-P como sustrato y unas 4 veces cuando PPI fue el sustrato. Un aspecto importante de destacar es que el valor de la V_{MAX} para la actividad de la G-6-Pasa cuando se usó PPI como sustrato, prácticamente duplicó el valor observado cuando se usó G-6-P como sustrato, tanto en EN intactas como rotas (Tabla II). Por el contrario, la V_{MAX} de la G-6-Pasa microsomal, usando PPI como sustrato fue sólo 1,3 veces el valor observado cuando el sustrato fue G-6-P (Tabla II).

En la Tabla III se muestra el efecto de NEM sobre la actividad de G-6-Pasa de EN y microsomal. La preincubación de los microsomas con 5 mM NEM por 15 min a 30°C redujo drásticamente (88%) la V_{MAX} e incrementó el K_M del sistema intacto con una pequeña disminución de la V_{MAX} de los microsomas rotos. En las mismas condiciones NEM disminuyó la V_{MAX} de la EN, tanto intactas como rotas, con ambos sustratos (G-6-P y M-6-P), siendo el efecto discreta-

TABLA II
PARÁMETROS CINÉTICOS DE G-6-Pasa DE ENVOLTURA NUCLEAR Y MICROSOMAL
CON DIFERENTES SUBSTRATOS

Sustrato	Intactas		Rotas	
	V_{MAX}	K_M	V_{MAX}	K_M
Envoltura nuclear				
G-6-P	228 ± 59	1,63 ± 0,64	244 ± 29	0,24 ± 0,07
PPI	450 ± 73	1,56 ± 0,39	476 ± 72	0,39 ± 0,16
M-6-P	170 ± 23	2,37 ± 0,65	230 ± 33	0,35 ± 0,10
Microsomas				
G-6-P	238 ± 5	2,71 ± 0,21	391 ± 21	0,76 ± 0,25
PPI	314 ± 15	1,76 ± 0,33	501 ± 9	0,54 ± 0,10

La actividad de la G-6-Pasa de envoltura nuclear y microsomal fue medida utilizando G-6-P, PPI o M-6-P como sustrato, para la primera y sólo G-6-P o PPI como sustrato, para la segunda. Los parámetros cinéticos fueron calculados a partir de las gráficas de Michaelis y Menten utilizando el programa Enzfitter (15) y se expresan como nmol de Pi liberado/min para la V_{MAX} y en mM para el K_M . Cada valor representa el promedio de 3-4 experimentos diferentes ± la desviación estándar. En cada experimento se utilizaron de 2-4 ratas y en cada ensayo el equivalente a 1mg de proteínas de EN o microsomales.

TABLA III
EFECTOS DE N-ETILMALEIMIDA SOBRE LA G-6-PASA DE ENVOLTURA NUCLEAR Y MICROSOMAL

Sustrato	Intactas		Rotas	
	V_{MAX}	K_M	V_{MAX}	K_M
Envoltura nuclear				
G-6-P control	236 ± 6 ^a	1,1 ± 0,1	317 ± 4 ^e	0,2 ± 0,0
5 mM NEM	113 ± 4 ^a	1,0 ± 0,1	168 ± 2 ^e	0,2 ± 0,0
M-6-P control	284 ± 20 ^b	2,8 ± 0,5	320 ± 10 ^d	0,3 ± 0,0
5 mM NEM	112 ± 13 ^b	2,1 ± 0,1	170 ± 8 ^d	0,3 ± 0,1
Microsomas				
G-6-P control	147 ± 20 ^e	3,1 ± 0,8	323 ± 9 ^f	0,5 ± 0,1
5 mM NEM	18 ± 4 ^e	5,0 ± 1,6	251 ± 6 ^f	0,5 ± 0,1

Entre 3,5 y 9,0 mg/mL de proteínas de EN o microsomas fueron incubadas con 5 mM de NEM, como se indicó en Materiales y Métodos. Los parámetros cinéticos fueron calculados y expresados como se indica en la Tabla II y corresponden al promedio ± la desviación estándar de 3 experimentos diferentes, en los cuales se procesó el hígado de 2-4 ratas y en cada ensayo el equivalente a 1mg de proteínas de EN o microsomas. La concentración final de NEM en el ensayo fue de 0,1 mM. Las diferencias entre controles y tratadas con NEM, que comparten las mismas letras (^{a-f}), fueron estadísticamente significativas a $p < 0,005$. El porcentaje de membranas intactas para EN y microsomas fue entre 81-83% y 95%, respectivamente, en todos casos.

mente mayor en el sistema intacto. Por otro lado, el K_M para ambos sustratos, tanto en EN intactas como rotas, no fue afectado por NEM.

La adición de amiloride al ensayo de la G-6-Pasa disminuyó discretamente la V_{MAX} de microsomas intactos (13%) y rotos (18%) pero disminuyó aproximadamente un 50% el K_M del sistema intacto (Tabla IV). En presencia de amiloride, la G-6-Pasa de EN se comportó de manera muy similar a la enzima microsomal (Tabla III) con la excepción de que no hubo cambio en la V_{MAX} para G-6-P en el sistema roto y que el K_M para ambos sustratos, G-6-P y M-6-P, disminuyó cerca de 4 veces en la EN. La presencia de amiloride rompió en igual proporción las vesículas de EN y de microsomas (20%).

El tratamiento *in vitro* de los microsomas con DIDS redujo drásticamente la V_{MAX} e incrementó ligeramente el K_M del sistema intacto, con muy poco efecto sobre los microsomas rotos (Tabla V). Por otro lado, la adición de SITS afectó tanto los microsomas

intactos como rotos; en los primeros, disminuyó la V_{MAX} aproximadamente 3 veces e incrementó el K_M cerca de 3,5 veces y en los segundos, incrementó la V_{MAX} con muy poco efecto sobre el K_M . La actividad de la G-6-Pasa de EN intactas y rotas, usando G-6-P y M-6-P como sustrato, no fue alterada por la presencia de DIDS ni SITS (Tabla V).

DISCUSIÓN

El hecho de que M-6-P sea un buen sustrato para la G-6-Pasa de los microsomas hepáticos rotos, pero un mal sustrato para los microsomas intactos condujo a Arion y col. (14) a proponer que la latencia para la M-6-P podía ser usada para medir el porcentaje de microsomas hepáticos intactos.

En estudios previos sobre la actividad de la G-6-Pasa de EN se reportó que la latencia para la M-6-P fue del 58% (2) y del 52% (5), valores muy cercanos a los encontrados en el presente trabajo (Tabla I). En el pasado se usó, como método alternativo

TABLA IV
EFECTOS DE AMILORIDE SOBRE LA G-6-PASA DE ENVOLTURA NUCLEAR Y MICROSOMAL

Sustrato	Intactas		Rotas	
	V _{MAX}	K _M	V _{MAX}	K _M
Envoltura nuclear				
G-6-P control	232 ± 13 ^c	1,1 ± 0,2 ^a	236 ± 9	0,1 ± 0,0
5 mM Amiloride	207 ± 4 ^c	0,3 ± 0,0 ^a	231 ± 9	0,2 ± 0,1
M-6-P control	275 ± 15 ^b	2,3 ± 0,4 ^a	291 ± 26	0,3 ± 0,1
5 mM Amiloride	220 ± 9 ^b	0,6 ± 0,1 ^a	239 ± 20	0,3 ± 0,1
Microsomas				
G-6-P control	170 ± 20	1,1 ± 0,4	214 ± 3	0,4 ± 0,0
5 mM Amiloride	148 ± 13	0,6 ± 0,2	178 ± 8	0,3 ± 0,1

La actividad de la G-6-Pasa de EN y microsomas fue ensayada en la ausencia y presencia de 5 mM amiloride. Los parámetros cinéticos fueron calculados y expresados como se indica en la Tabla II y representan el promedio ± la desviación estándar de tres experimentos separados, en cada uno de los cuales se utilizó el hígado de 2-4 ratas y en cada ensayo se usó el equivalente a 1 mg de proteínas de EN o microsomas. ^{a, b, c} significa, diferencias entre controles y tratados, estadísticamente significativas a valores de $p < 0,005$; 0,01 y 0,05 respectivamente. En las preparaciones de EN, la proporción de membranas intactas en controles fue de 85% y en las tratadas con amiloride fue de 68%. Por otro lado, en microsomas controles, el porcentaje de membranas intactas fue de 98% y en las tratadas con amiloride fue de 78%.

TABLA V
EFECTOS DE DIDS Y SITS SOBRE LA G-6-PASA DE ENVOLTURA NUCLEAR Y MICROSOMAS

Sustrato	Intactas		Rotas	
	V _{MAX}	K _M	V _{MAX}	K _M
Envoltura nuclear				
G-6-P control	370 ± 12	1,2 ± 0,1	492 ± 12	0,2 ± 0,0
0,1 mM DIDS	336 ± 12	1,3 ± 0,3	519 ± 18	0,3 ± 0,1
1 mM SITS	325 ± 34	1,8 ± 0,4	462 ± 5	0,4 ± 0,0
M-6-P control	416 ± 14	2,2 ± 0,3	558 ± 12	0,3 ± 0,0
0,1 mM DIDS	471 ± 52	3,8 ± 0,9	498 ± 26	0,3 ± 0,1
1 mM SITS	410 ± 10	3,4 ± 0,2	468 ± 17	0,3 ± 0,1
Microsomas				
G-6-P control	149 ± 15 ^a	2,1 ± 0,5 ^a	293 ± 16	0,7 ± 0,1
0,1 mM DIDS	24 ± 7 ^a	3,3 ± 1,8	278 ± 24	0,6 ± 0,2
1 mM SITS	51 ± 17 ^a	7,5 ± 2,9 ^a	437 ± 51	1,5 ± 0,4

Entre 0,7 y 2 mg/mL de proteínas de EN o de microsomas fueron incubadas con DIDS 0,1 mM o SITS 1 mM a pH 7,4 por 5 min a 30°C, luego se llevó a pH 6,5 antes de realizar el ensayo enzimático. Los parámetros cinéticos fueron calculados y expresados como se indica en la Tabla II y representan el promedio ± la desviación estándar de tres experimentos separados, en cada uno de los cuales se utilizó el hígado de 2-4 ratas y en cada ensayo se usó el equivalente a 1 mg de proteínas de EN o microsomas. ^a significa, diferencias entre controles y tratados, estadísticamente significativas a $p < 0,005$. El porcentaje de membranas intactas para EN y microsomas fue de 82% y 95%, respectivamente, en todos los casos.

para medir el porcentaje de vesículas intactas de EN, la formación de precipitados de fosfato de plomo con EDTA (5); sin embargo, el uso de este quelante de iones divalentes reduce las concentraciones de Mg^{++} interfiriendo con la integridad de las membranas de la EN.

Los resultados del presente estudio muestran que la M-6-P no es un buen sustrato para medir el porcentaje de vesículas intactas presentes en las preparaciones de EN. Si la M-6-P estuviese alcanzando la subunidad catalítica de la G-6-Pasa simplemente a través de soluciones de continuidad de las membranas de la EN, entonces el K_M para la hidrólisis de M-6-P sería el mismo para las EN no tratadas y rotas. Por el contrario, se encontró una disminución de 6,8 veces en el K_M para M-6-P cuando la EN fue rota por la presencia de histonas (Tabla II). Así mismo, en preparaciones no tratadas de EN, la hidrólisis de M-6-P fue inhibida fuertemente por la presencia de floridina (Tabla I) con lo cual la latencia se incrementó de 52 al 81%, alcanzándose un valor similar al observado con galactosa-6-fosfato.

Los valores de las constantes cinéticas para la inhibición por floridina (K_{ii} y K_{is}), en microsomas intactos con G-6-P como sustrato (Fig. 1), concuerdan con los previamente reportados (6). En el caso de la EN intactas, los valores de las constantes cinéticas para la inhibición por floridina (K_{ii} y K_{is}), usando G-6-P y M-6-P como sustratos, fueron muy similares (Fig. 1). De estos resultados se puede concluir que la hidrólisis de ambos sustratos por la enzima G-6-Pasa de EN intactas fue inhibida de manera similar por la floridina.

Estos resultados sugieren que en la EN el transportador T1 no sólo es capaz de transportar G-6-P sino también M-6-P. Por lo anterior, en el presente trabajo se utilizó galactosa-6-fosfato para medir el porcentaje de vesículas intactas en las preparaciones de EN.

La latencia, y los cambios en la V_{MAX} y en el K_M de la G-6-Pasa microsomal utilizando G-6-P o PPi como sustrato (Tabla II), cuando los microsomas son rotos por la presencia de histonas, fueron similares a lo reportado por otros autores (13). De igual manera, la latencia de la G-6-Pasa de EN cuando se usó G-6-P o PPi como sustrato fue muy similar a lo previamente publicado (5).

Al comparar la V_{MAX} de microsomas utilizando G-6-P y PPi como sustrato, se observó que con el PPi se alcanzó un valor 1,3 veces mayor que con G-6-P (Tabla II); por el contrario, en la EN la V_{MAX} para PPi casi duplica la obtenida con G-6-P. La mayor actividad de PPasa de la EN intacta en comparación con la de los microsomas intactos (Tabla II), probablemente esté relacionado con la hidrólisis del PPi generado en los procesos nucleares de transcripción y replicación, y esta diferencia posiblemente se debe a que la EN posee mayor cantidad del transportador de Pi/PPi (T2) o una isoforma más eficiente que los microsomas.

Con la intención de establecer otras características diferenciales entre los transportadores T1 de EN y microsomas, se estudió el efecto de compuestos los cuales, según se ha demostrado previamente, afectan la capacidad transportadora de T1 microsomal. Se encontraron varias diferencias: el transportador para G-6-P y M-6-P de EN fue más sensible a la amiloride que el T1 microsomal (Tabla IV). Por otro lado, el sistema microsomal fue más sensible a los bloqueadores de grupos sulfidrilos (Tabla III) que la EN, y esta última fue prácticamente insensible al efecto de DIDS y SITS (Tabla V), los cuales afectaron fuertemente a la enzima microsomal.

Es interesante mencionar que, la NEM la amiloride y los inhibidores del transporte de aniones afectaron la actividad de la G-6-Pasa microsomal de manera similar a lo reportado previamente (7-9).

Los valores cinéticos de la G-6-Pasa de EN para G-6-P y M-6-P y el efecto de varios inhibidores, permiten postular la presencia de un transportador para hexosas-6-fosfato en la EN capaz de transportar G-6-P y M-6-P, y quizás otras hexosas-6-fosfato y que, o es diferente al transportador T1 presente en microsomas, o si es igual es influenciado por las características del sistema membranoso en el cual está incluido.

Otra posible función de la G-6-Pasa de EN podría ser la de impedir la entrada de G-6-P al núcleo, con lo cual jugaría un papel protector de los ácidos nucleicos ya que se ha demostrado (17) que la G-6-P es un agente glucante mucho más potente que la glucosa para el ADN y el ARN.

La menor sensibilidad de la EN al efecto de inhibidores de grupos sulfhídricos que los microsomas (Tabla II), hacen pensar que el transportador de G-6-P (T1) y probablemente la subunidad catalítica de EN tienen algunas diferencias con la isoforma presente en microsomas.

REFERENCIAS

1. **Widnell CC, Tata JR.** A procedure for the isolation of enzymically active rat liver nuclei. *Biochem J* 1964; 92:313-317.
2. **Gunderson HM, Nordlie RC.** The fully-active nature of synthetic and hydrolytic activities of glucose-6-phosphatase of intact nuclear membrane. *Biochem Biophys Res Commun.* 1973; 52: 601-607.
3. **Burchell A, Waddell ID.** The molecular basis of the hepatic microsomal glucose-6-phosphatase system. *Biochim Biophys Acta* 1991; 1092:129-137.
4. **Arion WJ, Ballas LM, Lange AJ, Wallin BK.** Microsomal membrane permeability and the hepatic glucose-6-phosphatase system. Interactions of the system with D-mannose 6-phosphate and D-mannose. *J Biol Chem* 1976; 251: 4891-4897.
5. **Arion WJ, Schulz LO, Lange AJ, Telford JN, Walls HE.** The characteristics of liver glucose-6-phosphatase in the envelope of isolated nuclei and microsomes are identical. *J Biol Chem* 1983; 258:12661-12669.
6. **Arion WJ, Lange AJ, Walls HE.** Microsomal membrane integrity and the interactions of phlorizin with the glucose-6-phosphatase system. *J Biol Chem* 1980; 255:10387-10395.
7. **Vakili B, Banner M.** The effects of N-alkylmaleimides on the activity of rat liver glucose 6-phosphatase. *Biochem J* 1981; 194: 319-325.
8. **Pears J, Jung RT, Burchell A.** Amiloride activation of hepatic microsomal glucose-6-phosphatase; activation of T1? *Biochim Biophys Acta* 1989; 993: 224-227.
9. **Zoccoli MA, Karnovsky ML.** Effect of two inhibitors of anion transport on the hydrolysis of glucose 6-phosphate by rat liver microsomes. Covalent modification of the glucose 6-P transport component. *J Biol Chem* 1980; 255: 1113-1119.
10. **de Marcucci OL, Gonzalez-Mujica F, Perez-Ayuso E.** Alterations of liver nuclear envelopes accompanying thioacetamide administration in rats. *Acta Cient Venez.* 1983; 34:109-117.
11. **Burchell A, Hume R, Burchell B.** A new microtechnique for the analysis of the human hepatic microsomal glucose-6-phosphatase system. *Clin Chim Acta.* 1988; 173:183-191.
12. **Markwell MAK, Hass SM, Bieber LL, Tolbert NE.** A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal Biochem.* 1978; 87:206-210
13. **Blair JN, Burchell A.** The mechanism of histone activation of the hepatic microsomal glucose-6-phosphatase system: a novel method to assay glucose-6-phosphatase activity. *Biochim Biophys Acta* 1988; 964:161-167.
14. **Arion WJ, Lange AJ, Ballas LM.** Quantitative aspects of relationship between glucose 6-phosphate transport and hydrolysis for liver microsomal glucose-6-phosphatase system. Selective thermal inactivation of catalytic component in situ at acid pH. *J Biol Chem* 1976; 251:6784-6790.
15. **Leatherbarrow RJ.** *Enzfitter.* Amsterdam: Elsevier Science Publisher BV; 1987.

-
16. **Cleland WW.** The kinetics of enzyme-catalyzed reactions with two or more substrates or products. II. Inhibition: nomenclature and theory. *Biochim Biophys Acta* 1963; 67: 173-187.
 17. **Bucala R, Model P, Cerami A.** Modification of DNA by reducing sugars: a possible mechanism for nucleic acid aging and age-related dysfunction in gene expression. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 1984; 81: 105-109.