

24.20



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES**

**"ZARAGOZA"**

**"FOSFORILACION OXIDATIVA EN LAS  
MITOCONDRIAS DE TESTICULO DE RATA A  
TRAVES DE LA DIFERENCIACION DEL  
EPITELIO GERMINAL"**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE**

**QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

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

**VICTOR MANUEL IZQUIERDO REYES**

**MEXICO, D. F.**

**FEBRERO, 1988**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



## **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 está 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.

## ABREVIATURAS USADAS EN ESTA TESIS

ADF:	Adenosin difosfato
ADF/O:	Moles de ADF consumido por átomo de oxígeno
ATP:	Adenosin trifosfato
ATPasa:	Adenosin trifosfatasa
BSA:	Albúmina de suero de bovino
CAT:	Acetil carnitina transferasa
C.R.:	Control respiratorio
CTE:	Cadena transportadora de electrones
DNA:	Acido desoxirribonucleico
DNP:	2,4-dinitrofenol
EDTA:	Sal tetrasódica del ácido etilén dinitrilo tetraacético
F <sub>0</sub> :	Región F <sub>0</sub> de la ATPasa
F <sub>1</sub> :	Región F <sub>1</sub> de la ATPasa
FCCP:	Carbonilcianuro-p-trifluorometoxifenilhidrazona
K <sub>m</sub> :	Constante de Michaelis (afinidad enzima-sustrato)
LDH-X:	Lactato deshidrogenasa "X"
MDH:	Malato deshidrogenasa
NAD <sup>+</sup> :	Nicotinamida adenin dinucleótido (forma oxidada)
NADH:	Nicotinamida adenin dinucleótido (forma reducida)
NADP <sup>+</sup> :	Fosfato de nicotinamida adenin dinucleótido (forma oxidada)
PDH:	Piruvato deshidrogenasa
"q":	Indice de "acoplamiento" de las mitocondrias
O <sub>2</sub> :	Consumo de oxígeno
SDH:	Succinato deshidrogenasa
TCA:	Ciclo de los ácidos tricarbóxicos
TCO:	Clorhidrato de trietanolamina

**TMPP:** N,N,N',N'-tetrametil-p-fenilendiamina

**Tris:** Tris(hidroxi metil)amino metano

# I N D I C E

	Página
1. INTRODUCCION	
1.1. Antecedentes.....	1
1.2. Fundamento.....	12
1.3. Objetivos.....	13
2. MATERIALES Y METODOS	
2.1. Reactivos.....	14
2.2. Equipo y Aparatos.....	15
2.3. Métodos	
2.3.1. Preparación del homogeneizado total de testículo y obtención de la fracción mitocondrial.....	15
2.3.2. Medición del consumo de oxígeno.....	16
2.3.3. Medición de la actividad de la ATP sintetasa, de la relación ADP/O y del control respiratorio (C.R.).....	19
2.3.4. Medición de la actividad de la citocromo c oxidasa.....	20
2.3.5. Purificación de la albúmina de suero de bovino.....	21
3. RESULTADOS	
3.1. Efecto de la variación en la concentración de ADP sobre la velocidad de respiración.....	22
3.2. Efecto de la variación en la concentración de los sustratos oxidables sobre la velocidad de respiración.....	23
3.2.1. Succinato.....	23
3.2.2. Malato.....	23

3.2.3. Piruvato.....	23
3.3. Efecto de los agentes desacoplantes sobre la velocidad de respiración en ausencia y en presencia de BSA....	24
3.3.1. Efecto del 2,4-dinitrofenol.....	24
3.3.2. Efecto del FCCP.....	25
3.4. Fosforilación oxidativa a través de la diferenciación del epitelio germinal.....	26
3.4.1. Estudio de la fosforilación oxidativa en presencia y en ausencia de BSA.....	26
3.4.2. Efecto del 2,4-dinitrofenol sobre la respiración en ausencia y en presencia de BSA.....	29
3.4.3. Actividad de la citocromo c oxidasa.....	30
4. DISCUSION.....	32
5. RESUMEN.....	52
6. CONCLUSIONES.....	54
7. BIBLIOGRAFIA	

## 1. INTRODUCCION

### 1.1. Antecedentes.

El testículo es el órgano del aparato reproductor masculino cuyas funciones principales son la de producir andrógenos (función endócrina) y la de generar gametos (función exócrina). Este órgano está constituido por los túbulos seminíferos y por el tejido intersticial, cubiertos por una capa gruesa llamada túnica albugínea.

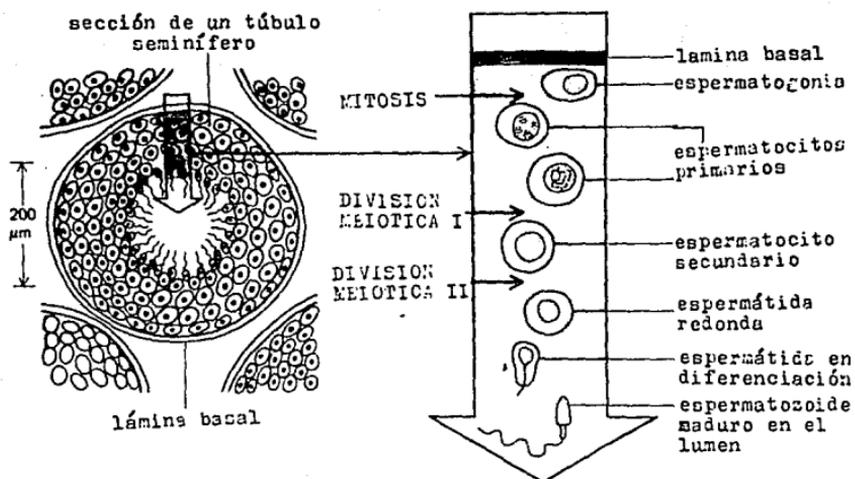
El tejido intersticial contiene tejido conectivo y una red vascular acompañada de fibroblastos, macrófagos, nervios pequeños, vasos linfáticos y células de Leydig. En éstas últimas reside la función endócrina del testículo y representan el 3 % de la población celular del órgano (69).

Los túbulos seminíferos constituyen la parte exócrina del órgano y ocupan el mayor volumen del tejido testicular. Los túbulos están limitados por el complejo lamelar basal y en ellos se localizan las células del epitelio germinal. Debido a que carecen tanto de vasos sanguíneos como de vasos linfáticos se crea un ambiente de hipoxia relativa en las células intratubulares (29,45,49), acentuándose más conforme éstas se alejan de la membrana basal.

En los túbulos seminíferos se producen los espermatozoides, que son el resultado de un complicado proceso de diferenciación celular, conocido como espermatogénesis (Fig.1), cuya cronología es sumamente precisa, definida para cada especie, e inclusive, para cada capa estudiada (27,28,84).

Las células del epitelio germinal reciben diversos nombres

Fig. 1



de acuerdo con su estadio de diferenciación. En los vertebrados, las células más primitivas son las espermatogonias tipo A, localizadas junto a la membrana basal (48). Estas dan origen a espermatogonias diferenciadas, que experimentan una serie de mitosis subsecuentes, dando lugar a la formación de espermatogonias tipo B, que son precursoras inmediatas de los espermatocitos primarios preleptotenos. Después de esta mitosis final, un ajuste complejo de cambios tiene lugar a partir de los espermatocitos diploides preleptotenos al llevarse a cabo la primera división meiótica reductiva. La prolongada profase de este proceso se divide en cuatro estadios: leptoteno, zigoteno, paquiteno y diploteno, definidos de acuerdo con las características morfológicas del núcleo. Durante la profase meiótica, que dura aproximadamente 16 días en la rata, los cromosomas homólogos están íntimamente apareados, después se forma el complejo sinaptonémico, seguido de la aparición del quiasmato, lo que facilita el proceso de la recombinación genética.

Después de completar la primera meiosis, se producen dos espermatocitos secundarios diploides; cada uno contiene la misma cantidad de DNA que el que se encuentra presente en las células somáticas. Una segunda división meiótica de los espermatocitos secundarios ocurre en veinticuatro horas (25,27,84), lo que resulta en la generación de cuatro espermátidas haploides, cada una conteniendo la mitad del DNA presente en las células somáticas. Por último, las espermátidas sufren una serie de cambios morfológicos al irse diferenciando; en la rata se han

descrito 19 fases (48,84). Este proceso es conocido con el nombre de espermiogénesis y culmina con la formación de los espermatozoides, que son el resultado final de la espermatogénesis. Estas células son expulsadas al lumen del túbulo seminífero por las células de Sertoli, en un fenómeno conocido como espermiación.

Durante la espermiogénesis ya no ocurre una división celular. Este proceso implica la reorganización del núcleo y del citoplasma, así como el desarrollo del flagelo del espermatozoide. Los cambios que se suceden en esta etapa se pueden dividir en las siguientes fases: transformaciones en el núcleo, que ocupa casi todo el volumen celular, redistribución y pérdida del citoplasma, desarrollo del acrosoma, formación del flagelo, y un arreglo especializado de las mitocondrias alrededor del flagelo, en la región media del espermatozoide. Este proceso requiere de aproximadamente 18 días en el testículo de rata (48). En esta especie, se requieren 4 ciclos del epitelio seminífero para la producción del espermatozoide maduro a partir de la espermatogonia tipo A (26,40). Cada ciclo dura 12 días.

Conforme se va dando el proceso de diferenciación, aquellas células germinales que están unidas entre sí por puentes intercitoplasmáticos, emigran sincrónicamente de la base hacia el lumen del epitelio; esto ha hecho pensar que existe un control riguroso por parte de las células de Sertoli, fijadas a la capa basal del túbulo seminífero. Durante la pubertad, estas células forman entre sí uniones herméticas, a las que se debe la formación de la llamada "barrera-hematotesticular", que divide funcionalmente al epitelio seminífero en dos compartimentos:

1) el compartimento basal, que es el más externo, donde se encuentran solamente las espermatogonias; 2) el compartimento adluminal, que es el interno, donde se encuentran el resto de las células germinales a partir de los espermatocitos primarios proleptotenos; estas células están aisladas de una irrigación directa (27,28).

Las células de Sertoli están íntimamente ligadas al metabolismo y al desarrollo de las células germinales; en un extremo están firmemente adheridas a la membrana basal de los túbulos seminíferos, y su citoplasma se extiende entre las células germinales más avanzadas (espermatocitos y espermátidas) (177,155), creándoles así un microambiente particular (89). En los últimos años se ha reportado que muy probablemente la producción de lactato por las células de Sertoli, es primordial para el metabolismo energético y para el desarrollo de las células germinales (53,74,109,118). Además, poseen una gran actividad fagocítica y posiblemente funciones endócrinas (80,81). Constituyen del 15 al 20 % de la población celular testicular (47).

Al estudiar la cinética de la espermatogénesis por diversos métodos, se ha podido establecer con precisión, en rata, la aparición de cada uno de los diferentes tipos celulares que constituyen el proceso (27,28,84).

Durante los primeros días de edad, los túbulos seminíferos son primitivos y sólo contienen células de soporte (precursoras de las células de Sertoli) y gonocitos (precursores de las espermatogonias); cinco días después del nacimiento se inicia la

proliferación de las células germinales, que consiste en una división mitótica diferente de las divisiones simples de las células germinales primordiales que ocurren durante la migración y establecimiento temprano en las gónadas.

A los 9 días de edad han desaparecido totalmente los gonocitos, y a los 12 aparecen los espermatoцитos más primitivos (espermatoцитos preleptotenos). En la rata, las células germinales predominantes a esta edad son las espermatogonias. Entre los 14 y los 16 días se inician los preámbulos de la pubertad (114).

En las ratas de 15 a 18 días las células de Sertoli ya no presentan mitosis (25,114) y se observan a los espermatoцитos en estadios más avanzados de maduración que culminan a los 23 días. Posteriormente, terminada la segunda división meiótica, se forman las primeras espermátidas redondas, iniciándose de esta manera la espermiogénesis, que finaliza alrededor de los 45 días de edad, cuando aparecen los primeros espermatozoides liberados al compartimento luminal del túbulo seminífero (25).

Esta precisión cronológica con que van apareciendo las diversas células del epitelio germinal de la rata permite seleccionar la edad más adecuada, en la cual se encuentra, en forma mayoritaria, alguna población celular en especial (TABLA I).

Si se consideran todas las características del proceso de la espermatogénesis descritas arriba, resulta evidente que el problema fundamental en el estudio del metabolismo testicular es la heterogeneidad de las poblaciones celulares presentes en el órgano (1,35). Este problema ha sido parcialmente resuelto al

**TABLA I**  
**DIFERENCIACION DEL TESTICULO DE RATA A LO LARGO DE LA ESPERMATOGENESIS**

Edad (Días)	Etapa fisiológica (Refs. 1, 40, 114)	Ubicación anatómica de la gónada (Ref. 73)	Temperatura de la gónada (°C) (Ref. 73)	Estadios más avanzados en la diferenciación (Refs. 1, 25, 40)	Morfología mitocondrial en las células germinales (Ref. 3)				
11	Prepubertad	Abdominal	37	Espermatogonias tipo B 					
14	Inicios de la pubertad	Empieza el descenso al escroto	36	Espermatocitos primarios: preleptotenos 					
16				zigotenos 					
				paquítenos tempranos 					
21	Pubertad	Escrotal	35	Espermatocitos primarios: paquítenos tardíos 					
24				Diacinesis 					
26				Espermátidas: etapas: 1-2 		33			
30							4-5 		
34							9-10 		
40							17-18 		
45	Adolescencia	Escrotal	33	Espermatozoides 					
60-90	Adultez	Escrotal	32-33	Espermatogénesis completa 					

eliminar algunas poblaciones celulares por medio de alguno de los métodos siguientes: 1) utilización de animales sexualmente inmaduros, en los cuales existe una población celular predominante (1,25,84); 2) utilización de animales con hipofisectomía; 3) utilización de animales con criptorquidia experimental y regresión del epitelio germinal; y 4) utilización de animales previamente expuestos a irradiaciones sobre los testículos (26,48,86).

Esto ha llevado a numerosos autores a considerar que las características metabólicas que se observan en un momento determinado, corresponden al tipo celular mayoritario que se encuentra presente en ese momento (35,47). En este laboratorio, al igual que en otros (1,25,27,40), se encontró que a ciertas edades definidas en la rata de la cepa Sprague-Dawley, el tipo de población celular más abundante corresponde al estadio más avanzado (TABLA I).

Hasta hoy, la mayor parte de la información en relación con el metabolismo energético testicular proviene principalmente de estudios llevados a cabo utilizando el órgano total o fragmentos de tejido testicular (47,48,). Algunos otros estudios se han realizado en poblaciones celulares aisladas de testículo de rata o ratón y en fracciones subcelulares del espermatozoide (48,106,111). Por otra parte, ha habido un interés creciente en explorar los senderos metabólicos del espermatozoide intacto, por encontrarse esta célula implicada en la posibilidad del control de la fertilidad masculina (44,48,62,150).

En los mamíferos, durante la madurez sexual, los testículos

se encuentran alojados en el escroto; esto hace que la temperatura sea de 3 a 5°C inferior a su temperatura corporal (28,45,79), factor de suma importancia en el metabolismo testicular.

El testículo de mamífero adulto utiliza a la glucosa como su principal fuente de energía, y puede metabolizarla tanto aeróbica como anaeróticamente (37,47,62,68,88,96,125). También se ha informado que, aunque en pequeñas cantidades (0.5% en el testículo de rata "in vitro", y hasta un 9% en el testículo de carnero "in vivo"), la glucosa puede ser oxidada por la vía de las pentosas (46,135). Los productos principales del metabolismo de la glucosa son el piruvato y el lactato.

El lactato es producido en grandes cantidades en los testículos de las ratas prepúberes, tanto en la glucólisis aeróbica como anaeróbica (88). Se había informado, como dato curioso, que la producción de  $^{14}\text{CO}_2$  a partir de glucosa uniformemente marcada no justifica más que el 30% del consumo total de oxígeno del órgano entero (47). Esto concuerda con la idea expresada arriba, en donde se indica que las células de Bertoli utilizan a la glucosa para producir sustratos que las células germinales aprovechan en la síntesis de ATP, el cual es necesario para su supervivencia (48,105).

En el testículo inmaduro, la glucosa produce un efecto Crabtree, que consiste en la inhibición del consumo de oxígeno ( $\text{O}_2$ ) debido a la adición de glucosa al medio de incubación (47,88,105,143).

Estudios "in vitro" utilizando el órgano maduro total, han demostrado que en ausencia de glucosa, decaen rápidamente tanto

los niveles de ATP como los niveles de oxígeno consumido, mismos que pueden ser recuperados si se adiciona glucosa al medio de incubación (44,47,68,105). Esta recuperación no se observa en el testículo inmaduro.

Recientemente se ha informado que es necesaria la presencia de lactato para mantener los niveles de ATP testicular, que llegan a ser casi tan altos como en el hígado o como en el músculo esquelético: 1.5, 2.5 y 4.5  $\mu\text{mol}$  de ATP/gramo de tejido seco respectivamente (105).

En años recientes, se ha podido definir que son las células de Sertoli quienes utilizan preferentemente a la glucosa; a partir de ésta producen piruvato y lactato, que al parecer son los nutrientes principales de las células germinales más avanzadas (53,54,74,109,118), siendo ambos sustratos utilizados en el ciclo de Krebs para la producción de ATP (47).

Todos estos datos apuntan a la importancia del piruvato como un metabolito central para la producción de energía en el metabolismo testicular. Se sabe que el piruvato alimenta al ciclo de los ácidos tricarbónicos (TCA) no solamente a través de la piruvato deshidrogenasa (PDH) (91), sino también a través de una enzima mítica muy activa de localización mitocondrial y dependiente de  $\text{NADP}^+$  (46,94). Se ha postulado que esta enzima pudiera funcionar en el testículo en sentido inverso, es decir, convirtiendo al malato en piruvato, como se ha sugerido que sucede en mitocondrias aisladas de hepatomas de Morris (132). Por otra parte, Van Dop y cols. (149), han informado que en espermatozoides de epidídimo de bovino intacto, a pesar de estar

bloqueada la cadena respiratoria en presencia de rotenona, solamente el piruvato es capaz de apoyar la respiración y la motilidad del espermatozoide, dato que coincide con un estudio realizado por Ford y cols. (44), en donde se informa que en el espermatozoide eyaculado de humano, la concentración del ATP se mantiene elevada, a pesar de estar bloqueada la cadena respiratoria.

En la mayoría de los sistemas estudiados, el piruvato es incapaz de penetrar la membrana mitocondrial interna, a no ser que se asocie a un anión permeante como es el malato (23,82). En otros sistemas se sabe que el malato es oxidado pobremente. Este no es el caso en el testículo, donde se oxida en forma importante (34). También se ha demostrado que el malato es capaz de estimular la respiración apoyada por el piruvato en espermatozoide de conejo tratado hipotónicamente (76).

El succinato ha sido utilizado extensamente en muchos de los estudios relacionados con el proceso de la fosforilación oxidativa. La deshidrogenasa succínica (SDH) es una enzima que forma parte del ciclo de Krebs y está fuertemente adherida a la membrana mitocondrial interna, siendo casi imposible extraerla en forma soluble (87,129). Esta enzima presenta una actividad muy elevada a partir de los espermatozooides paquítenos (47,50,51,125).

Otras enzimas de localización mitocondrial que manifiestan una actividad elevada son: la deshidrogenasa isocítrica (IDH), la deshidrogenasa málica (MDH), y la deshidrogenasa láctica (LDH-X) (4,8,9,35,43); esta última tiene especial interés en el metabolismo del piruvato (24,35,71,149).

La acetil carnitina transferasa (CAT) también cobra

importancia en el metabolismo del piruvato (70,150). Esta enzima manifiesta una gran actividad cuando aparecen los espermatocitos primarios diplotenos y las espermátidas inmaduras (102,154).

La presencia de las enzimas de localización intramitocondrial es coherente con el hecho de que sus respectivos sustratos pueden ser oxidados por el testículo adulto (35,42,50,104,115,134).

Todo esto indica que en el testículo funciona el ciclo de los ácidos tricarboxílicos y la fosforilación oxidativa ligada a la cadena transportadora de electrones (CTE). La fosforilación oxidativa es un mecanismo mediante el cual la liberación de energía, que acompaña a la transferencia de electrones a lo largo de la cadena respiratoria, se acopla a la síntesis de ATP a partir de ADP y fosfato inorgánico (87,146). De este modo se conserva la mayor parte de la energía liberada por la CTE, la cual es aprovechada para las actividades celulares de los organismos aeróbicos.

La membrana mitocondrial interna es el eje central del sistema de transducción de energía. En ella se encuentran todas las enzimas encargadas del transporte de electrones, la succinato deshidrogenasa (SDH), parte de la ATPasa sensible a oligomicina, y la acetil carnitina transferasa (CAT).

Los componentes de la CTE de las mitocondrias de testículo no han sido estudiados con detalle; sin embargo, cabe señalar la existencia de un citocromo c distinto al de las células somáticas (77).

En este laboratorio se encontró que en las mitocondrias de

testículo, la ATPasa ligada a la fosforilación oxidativa presenta características peculiares. Su porción F<sub>1</sub> se encuentra en parte dislocada de la porción membranal F<sub>0</sub> y es insensible a la acción de los desacoplantes de la fosforilación oxidativa, así como a la oligomicina; no obstante, esta enzima es capaz de sintetizar ATP en presencia de succinato (151).

Por otra parte, desde hace algunos años muchos investigadores han utilizado la albúmina durante la obtención de sus preparaciones mitocondriales, ya sea adicionando ésta al medio de aislamiento o al medio de ensayo. Con esto han obtenido mejores controles respiratorios (73,74,92,122,136,141). En este laboratorio anteriormente se encontró que con la adición de albúmina de suero de bovino (BSA) al 1% al medio de aislamiento, era posible obtener cierta estimulación en la actividad de la ATPasa mitocondrial al utilizar agentes desacoplantes (151). La adición directa de BSA al medio de ensayo, también produce un aumento de la respiración en el estado 3 y una disminución en el estado 4; esto se traduce en un mejor acoplamiento de las mitocondrias, que se refleja en los controles respiratorios.

El conjunto de datos anteriormente resumidos en relación con el metabolismo energético del testículo, sugiere que durante la espermatogénesis las mitocondrias de las células germinales sufren una diferenciación funcional, concomitante a la diferenciación morfológica que ha sido descrita con detalle (3,15,41,99). En las células germinales más primitivas las mitocondrias son escasas y de apariencia igual a la de otros tejidos; a partir de los espermatoцитos leptotenos empiezan a multiplicarse y a adquirir una apariencia muy peculiar: el

espacio intermembranal se va ensanchando, dándoles una apariencia vacuolada, con la matriz condensada y plegada hacia los bordes, estructura que mantienen hasta llegar a la formación del espermatozoide maduro, en donde se distribuyen en la región media del espermatozoide alrededor del flagelo (3,15,48,96,99,111). Esta forma que presentan las mitocondrias de las células germinales, no cambia a pesar de que sean incubadas en medios de diferente osmolaridad (96,99). Esta estructura "atípica" de estas mitocondrias, es similar a la que presentan las mitocondrias aisladas de tumores mamarios de ratón (136).

## 1.2. Fundamento.

En los últimos años, se ha hecho hincapié en la necesidad de enfocar el problema de la fertilidad masculina de una manera racional (48). Ha resultado evidente el escaso conocimiento que se tiene de los procesos metabólicos involucrados en el control de la diferenciación de las células germinales, fenómeno que culmina con la producción de los espermatozoides en el testículo.

Se ha definido la importancia del metabolismo energético del espermatozoide para su motilidad y supervivencia (37,44,149,150), y, sin embargo, no se conoce con precisión la evolución de ese metabolismo energético durante la espermatogénesis. Algunos investigadores han coincidido en señalar a la glucólisis como la principal vía generadora de ATP (47,88,123,125,156), en tanto que otros, afirman que es el mecanismo de la fosforilación oxidativa la principal vía metabólica encargada de su producción (37,44,48,111,140).

Se han estudiado algunos aspectos de la fosforilación

oxidativa, tanto en poblaciones de células germinales de composición conocida, así como en preparaciones mitocondriales de testículo adulto, pero no se ha realizado un estudio sistemático de la fosforilación oxidativa en mitocondrias de testículo a través de la diferenciación del epitelio germinal.

La fosforilación oxidativa ha sido ampliamente estudiada en las mitocondrias de hígado de rata, por lo que los resultados que se obtienen con organelos de tejidos no estudiados, suelen ser comparados con los de preparaciones hepáticas.

Dado que la cronología de la espermatogénesis en la rata es bien conocida, se utilizó a este animal como la especie de elección en los estudios sobre la diferenciación del epitelio germinal (27).

### 1.3. Objetivos.

Con base en lo anterior, nos proponemos:

1. Definir la capacidad oxidativa de las mitocondrias de testículo adulto asociada con la fosforilación, en relación con el succinato, el malato y el piruvato, en ausencia y en presencia de albúmina.
2. Estudiar el efecto de los agentes desacoplantes sobre la fosforilación oxidativa en ausencia y en presencia de albúmina.
3. Medir la actividad de la citocromo c oxidasa.
4. Comparar los parámetros arriba señalados con los obtenidos en las preparaciones mitocondriales de hígado.
5. Evaluar los objetivos 1, 2, y 3 en las mitocondrias de testículo durante la espermatogénesis.

## 2. MATERIALES Y METODOS

### 2.1. Reactivos.

1. Adenosin 5'-difosfato sal disódica, de músculo de equino Grado IX (ADP). Sigma Chemical Co.
2. Acido pirúvico sal disódica. Sigma Chemical Co.
3. Acido L-málico. Sigma Chemical Co.
4. Acido succínico, sal disódica hexahidratado. Sigma Chemical Co.
5. Acido láctico. Sigma Chemical Co.
6. 2,4-dinitrofenol Grado II (DNP). Sigma Chemical Co.
7. Tris(hidroximetil)aminometano, amortiguador Grado Bioquímico 7-9 (Tris). Sigma Chemical Co.
8. Trietanolamina/Cl (TEA). Sigma Chemical Co.
9. Acido L-ascórbico. Sigma Chemical Co.
10. N,N,N',N'-tetrametil-p-phenilendiamina/Cl (TMPD). Sigma Chemical Co.
11. Lubrol Tipo PX. Sigma Chemical Co.
12. Citocromo c de corazón de equino Tipo III. Sigma Chemical Co.
13. Reactivo de Folin-Dicolteau. Sigma de México, S.A.
14. Acido etilendinitrilo tetraacético (EDTA), sal disódica dihidratada. E. Merck. Darmstadt.
15. D-(-) Manitol, E. Merck, Darmstadt.
16. Sacarosa. J.T. Baker de México, S.A. de C.V.
17. Albúmina de suero de bovino fracción V (BSA). Calbiochem Behring Co.
18. Carbonilcianuro-p-trifluorometoxifenilhidrazona (FCCP), fue obtenido de Aldrich Chemical Co.

## **2.2. Equipo y Aparatos.**

1. Homogeneizador de vidrio tipo Potter-Elvehjem, con pistón de teflón.
2. Motor Caframo para homogeneizador modelo RZR1.
3. Centrifuga refrigerada Internacional PR-2.
4. Centrifuga refrigerada Sorvall RC-5B.
5. Rotor excéntrico # 296.
6. Rotor SS-34.
7. Oxígrafo Gilson KI-C.
8. Electrodo de oxígeno tipo Clark.
9. Cámara de incubación Gilson con capacidad máxima de 2.00 ml, provista con baño de agua.
10. Baño de agua Gilson con termostato y motor para circulación continua.
11. Espectrofotómetro tipo Pye-Unicam.
12. Liofilizador Labconco 5.
13. Potenciómetro Bechman.

## **2.3. Métodos.**

### **2.3.1. Preparación del homogeneizado total de testículo y obtención de la fracción mitocondrial.**

Los animales de experimentación fueron ratas albinas macho de la cepa Sprague-Dawley. Se utilizaron sin ayuno previo al sacrificio. Se sacrificó el número de ratas necesario para obtener entre 2 y 3 gramos de tejido testicular húmedo (TABLA II). Las ratas fueron sacrificadas por medio de un golpe en la nuca y enseguida se decapitaron. Se exanguinaron al máximo posible y se extrajeron los testículos rápidamente, recibiéndolos en 10 ml del medio de aislamiento, que contenía: sacarosa 250 mM,

**TABLA II**

**Número de animales utilizados en cada experimento para el estudio de la fosforilación oxidativa en mitocondrias aisladas del testículo de rata.**

Edad (Días)	Peso húmedo de cada testículo <sup>a</sup> (g)	Na. de animales <sup>b</sup>	Peso húmedo obtenido experimentalmente <sup>c</sup> (g)
11	0.015	50	1.59 ± 0.54
14	0.028	50	2.56 ± 0.19
16	0.041	38	3.12 ± 0.68
21	0.081	16	2.60 ± 0.12
24	0.169	15	5.08 ± 0.62
26	0.161	13	4.12 ± 0.95
30	0.168	8	2.70 ± 0.15
34	0.390	4	2.79 ± 1.16
40	0.483	3	2.90 ± 0.15
45	0.521	2	2.08 ± 0.72
60-90	1.010	1	3.18 ± 0.32

<sup>a</sup> Promedio de por lo menos 3 lotes diferentes de animales.

<sup>b</sup> Número de animales requerido para la obtención de aproximadamente 30g. tejido húmedo, a excepción de los lotes de 11 días de edad, en donde el número indicado correspondió a 1.5g.

<sup>c</sup> Promedio ± D.E. de por lo menos 3 lotes diferentes de animales.

TEA 3 mM, EDTA 1 mM, ajustado a un pH de 7.4 con NaOH 0.1 N. A continuación se desechó la tónica albugínea y la arteria espermática. Después, secando suavemente cada testículo con papel filtro Whatman No.40, se eliminó el exceso de líquido y se pesó el tejido obtenido; de inmediato se picó finamente y se pasó a un homogeneizador de vidrio tipo Potter-Elvehjem, provisto de un pistón de teflón. Se homogeneizó durante un minuto mediante 5 subidas y 5 bajadas del pistón a una velocidad media en un motor Caframo tipo RZR1, 64. El homogeneizado obtenido se filtró a través de lana de vidrio y se adicionó la cantidad necesaria del medio de aislamiento para obtener un homogeneizado total al 10% (F/V). Todas las operaciones anteriores se realizaron con la mayor rapidez posible.

El filtrado se colocó en tubos de centrifuga y se procedió a la obtención de la fracción mitocondrial (mitocondrias pesadas) mediante una centrifugación diferencial, según el protocolo esquematizado en la Fig. 2. Se utilizó una centrifuga refrigerada Internacional PR-2, provista de un rotor excéntrico # 296.

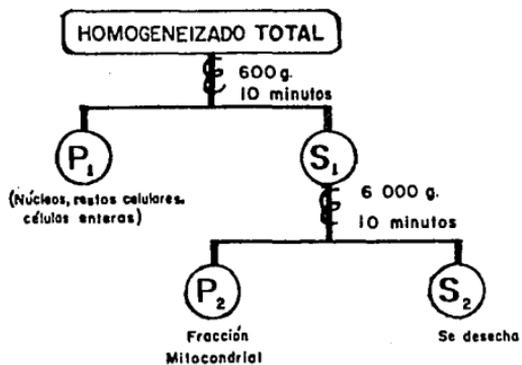
La pastilla final que se obtuvo fue resuspendida en 0.025 ml del medio de aislamiento y se mantuvo en frío hasta su uso. Todos estos procedimientos se realizaron a una temperatura de 2 a 4°C.

### 2.3.2. Medición del consumo de oxígeno.

La respiración de las mitocondrias se midió polarográficamente en un oxígrafo Gilson MI-C (Gilson Medical Electronics, Middleton, Wis., USA), provisto de un electrodo de oxígeno tipo Clark (Yellow Springs Instrument Co., Yellow Springs,

Fig. 2

ESQUEMA DE CENTRIFUGACION DIFERENCIAL



(Oh.,USA). La medición se efectuó a 0.8 V, que corresponde al potencial estándar de óxido-reducción del par  $O_2/H_2O$  (18,39,56).

Se utilizó una cámara de incubación de 1.74 ml provista de un agitador magnético y mantenida a 30°C mediante un baño de agua de circulación continua marca Gilson. En estas condiciones se calculó la concentración de oxígeno en el medio de ensayo, aplicando la ley de Henry sobre gases disueltos en líquidos:

$$1) \quad \alpha = \frac{n(RT)}{p}$$

en donde:  $\alpha$  = coeficiente de Bunsen ( $\alpha = 0.031$  a 293°K; 0.0285 a 298°K; 0.026 a 303°K);

$n$  = concentración de oxígeno en molaridad (moles/litro de solución).

$R$  = constante general de los gases (0.082 l. atm. mol<sup>-1</sup> °K<sup>-1</sup>).

$T$  = temperatura absoluta (°K).

$p$  = presión del gas (considerando una presión atmosférica promedio en la ciudad de México de 592.4 mm. de Hg = 0.766 atmósferas y un 21% de oxígeno en el aire; la presión parcial del oxígeno en el aire es de 0.160 atmósferas).

Despejando y sustituyendo en la ecuación 1), obtenemos:

$$n = \frac{\alpha p}{R T} = \frac{(0.026)(0.160)}{(0.082)(303)} = 167.3 \mu M \text{ a } 30^\circ C$$

Cuando  $T = 25^\circ C$ ,  $n$  es igual a 186  $\mu M$ .

La velocidad de respiración ( $Q_{O_2}$ ) se definió como el número de nanomoles de oxígeno consumido por minuto por mg. de proteína,

y los estados respiratorios correspondieron a los establecidos por Chance y Williams (19,20).

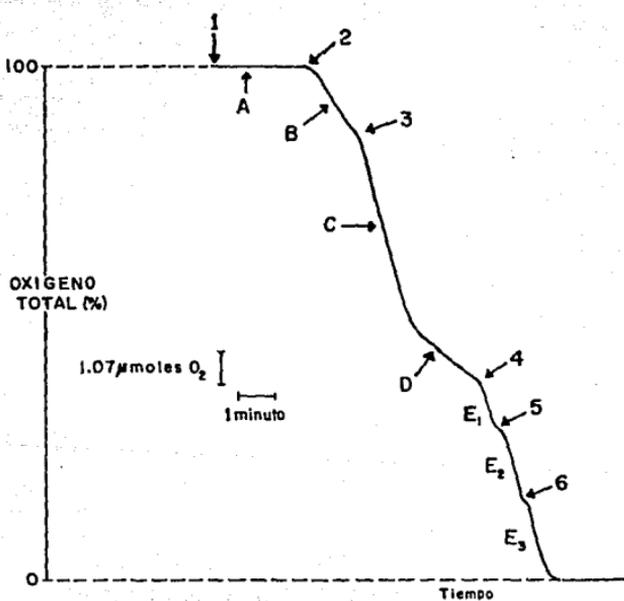
Después de lavar exhaustivamente con agua desionizada la cámara de incubación, se añadió el medio de fosforilación (medio de ensayo, medio de incubación o medio de respiración), que contenía: D-(-)manitol 225 mM, sacarosa 75 mM, Tris/Cl 2 mM, EDTA 0.05 mM, KCl 10 mM y  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  5 mM, ajustado a un pH de 7.4 con HCl 0.1 N. Con este medio se calibró el graficador del oxígrafo, con una velocidad de corrimiento del papel de 0.1 mm/segundo, eligiendo una línea basal que representó el 0% de oxígeno en el medio de incubación. Enseguida se procedió a elegir una línea superior del papel, entre 330 y 360 de sensibilidad del aparato, que nos representó el 100 % de oxígeno total disuelto en el medio de incubación.

Los sustratos y desacoplantes fueron agregados siguiendo como modelo el esquema adjunto (Fig.3), que se describe a continuación:

Posición 1, adición del sustrato oxidable añadido según la concentración y volúmenes necesarios (succinato, malato o piruvato-malato), mezclada y mantenida durante varios minutos para equilibrar con la temperatura del baño. Trazo A, consumo de oxígeno debido a la adición del sustrato. Posición 2, adición de 20 a 30  $\mu\text{l}$  de la suspensión mitocondrial (0.6-0.8 mg. de proteína por ml de medio de incubación). Trazo B, respiración basal en presencia de un sustrato oxidable y el ion fosfato en ausencia de ADP (respiración durante el primer estado 4:  $\text{O}_2$  (B)). Posición 3, adición de ADP según el volumen y concentración necesarios. Trazo C, respiración en presencia de ADP (respiración durante el

**Fig.3** Trazos obtenidos habitualmente durante la medición del  $Q_{O_2}$ . El medio de incubación contenía: D-(-)manitol 225 mM, sacarosa 75 mM, Tris/Cl 2 mM, EDTA 0.05 mM, KCl 10 mM y  $Na_2HPO_4$  5 mM, ajustado a un pH de 7.4. 1: Adición del sustrato oxidable. A: Consumo de oxígeno debido a la adición del sustrato. 2: Adición de la suspensión mitocondrial. B: Respiración durante el primer estado 4. 3: Adición de ADP. C: Respiración durante el estado 3. D: Respiración durante el segundo estado 4. 4, 5 y 6: Adiciones sucesivas del desacoplante.  $E_1$ ,  $E_2$  y  $E_3$ : Respiración desacoplada según las adiciones del desacoplante 4, 5 y 6 respectivamente.

Fig. 3



estado 3). Trazo D, respiración al agotarse el ADP (respiración durante el segundo estado 4). Posiciones 4, 5 y 6; adición del desacoplante a diversas concentraciones. Trazos E, respiración en presencia del desacoplante (respiración desacoplada;  $O_2$  (D)). El desacoplante fue agregado en forma sucesiva hasta alcanzar las concentraciones descritas en el texto (concentraciones acumulativas). Todas las sustancias utilizadas fueron agregadas a la cámara de incubación por medio de jeringas Hamilton.

Al término del experimento, la cámara de incubación se enjuagó varias veces con agua desionizada, y se conservó una alícuota de la suspensión mitocondrial a  $-20^{\circ}C$  para determinarle posteriormente su contenido de proteínas, siguiendo el método descrito por Lowry, modificado por Hartree (63). Se utilizó BSA fracción V purificada como la proteína estándar.

La medición de las velocidades de respiración se realizó en presencia y en ausencia de BSA a una concentración final de 1%, ya fuera agregada al medio de aislamiento o al medio de fosforilación.

### **2.3.3. Medición de la actividad de la ATP sintetasa, de la relación ADP/O y del control respiratorio (C.R.).**

La actividad de la ATP sintetasa se determinó a partir de los trazos del  $O_2$  en el estado 3; se definió como la velocidad de síntesis de ATP (nanomoles de ATP producidos por minuto por  $\mu g.$  de proteína), considerando que la relación molar de ADP consumido sobre ATP producido (ADP/ATP) fue 1:1. Para efectuar este cálculo, se consideró el tiempo de duración de la respiración de las mitocondrias durante el estado 3 (Trazo C de la Fig.3).

La relación ADP/O, se calculó según Chance y Baltscheffsky (21).

El control respiratorio, se calculó según el criterio establecido por Chance y Williams (19,20), definido como el cociente de la velocidad del consumo de oxígeno en el estado 3 entre la velocidad del consumo de oxígeno en el 2o. estado 4 (Fig.3).

#### 2.3.4. Medición de la actividad de la citocromo c oxidasa.

Para la medición de esta actividad enzimática se utilizó el método descrito por Bergmeyer (7), al cual se le hicieron algunas modificaciones. Este método mide la velocidad del consumo de oxígeno de mitocondrias previamente tratadas con un detergente, en un medio que consistía de:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  50 mM y EDTA 1 mM, ajustado a un pH de 7.7 con KOH 2M; el volumen final fue de 1.74 ml. La temperatura de incubación fue de 25°C, por lo que la concentración de oxígeno disuelto en el medio correspondió a 186  $\mu\text{M}$ . Bajo estas condiciones se calibró el oxígrafo de manera similar al descrito en el punto 2.1. Después de la calibración del oxígrafo, se añadieron, por medio de jeringas Hamilton y en forma sucesiva, los siguientes sustratos: ascorbato 7 mM, citocromo c 85  $\mu\text{M}$ , TMSD 0.7 mM, y se esperó de 2 a 3 minutos hasta que se estabilizara la pendiente obtenida. Enseguida se agregó la suspensión mitocondrial previamente diluida con lubrol (0.01 ml de lubrol al 1% por cada 0.09 ml de suspensión mitocondrial), y así se mantuvo hasta la anaerobiosis.

La actividad de la citocromo c oxidasa fue expresada como la velocidad de consumo de oxígeno por minuto por mg de proteína mitocondrial.

### 2.3.5. Purificación de la albúmina de suero de bovino (BSA).

Se purificó la albúmina de suero de bovino (BSA) fracción V mediante el siguiente procedimiento:

Se disolvió a temperatura ambiente una parte de la BSA fracción V con 4 partes de una solución salina isotónica (1:5,P/V), y en frío se agregó metanol gota a gota, de tal manera de obtener el rendimiento máximo. El precipitado obtenido se dejó reposar durante 24 horas en un cuarto frío y posteriormente se centrifugó en una centrifuga refrigerada Sorvall RC-5B provista de un rotor SS-34 a 6000g durante 5 minutos. Se resuspendió la pastilla en un volumen final de 10 ml de solución salina fisiológica y se pasó cuantitativamente a un saco de diálisis # 36. Se dializó contra agua desionizada durante 24 horas en el cuarto frío. Después de la diálisis, el contenido se vació en frascos viales y fue liofilizado en un liofilizador Labconco 5. La BSA purificada fue conservada a 4°C hasta su uso.

Todas las sustancias utilizadas se disolvieron con agua desionizada. Los sustratos (ADP, succinato, malato, piruvato, lactato) se ajustaron a un pH de 7.0, ya sea con NaOH o con HCl 0.1 N. Los desacoplantes fueron disueltos en etanol y agregados en un volumen pequeño, de tal modo que los controles de etanol no mostraran ningún efecto sobre la respiración.

### 3. RESULTADOS

Con el fin de estudiar la fosforilación oxidativa durante el proceso de la diferenciación del epitelio germinal del testículo, se procedió en primer término a establecer las condiciones adecuadas para realizar este estudio. Para ello, en mitocondrias de testículo adulto, se determinaron las concentraciones saturantes del sistema en lo que respecta a cada uno de los sustratos oxidables que se utilizaron, así como para el ADP.

Todos los resultados fueron comparados con los obtenidos en mitocondrias de hígado de rata adulta, bajo las mismas condiciones de experimentación que las de testículo.

Es importante señalar el hecho de que con las mitocondrias aisladas del testículo adulto, la respiración con los sustratos endógenos fue casi nula, a diferencia de la presentada con las mitocondrias de hígado. En cambio, cuando se utilizaron mitocondrias de ratas inmaduras, la respiración debida a sustratos endógenos fue elevada (Fig.4).

#### 3.1. Efecto de la variación en la concentración de ADP sobre la velocidad de respiración.

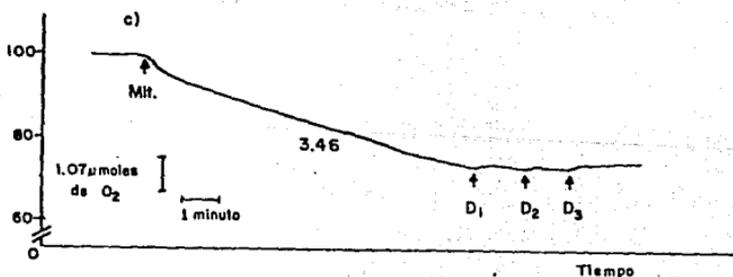
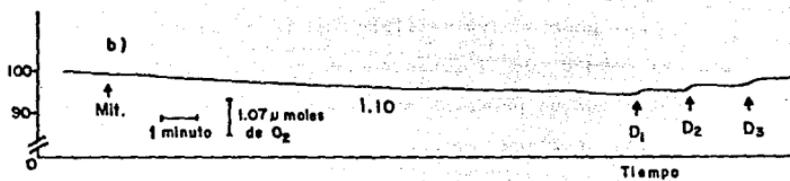
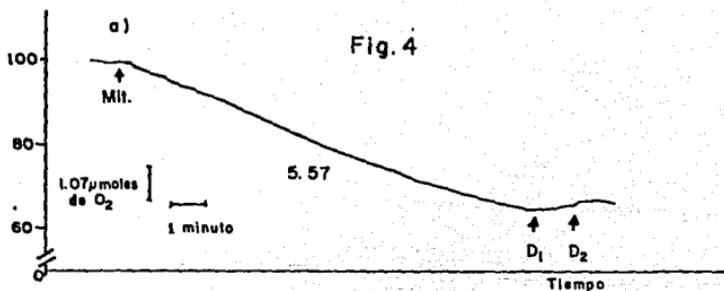
Utilizando succinato como el sustrato oxidable, se encontró que el ADP saturó al sistema desde concentraciones de 0.017 mM con las mitocondrias de hígado y de 0.08 mM con las de testículo, obteniendo una velocidad máxima de 63 y 47 nmoles de  $O_2$ /min/mg de proteína respectivamente (Fig.5A).

Para trabajar las preparaciones de ambos sistemas en forma similar, decidimos utilizar en adelante el ADP a una concentración de 0.3 mM. También se calculó el valor de la  $K_m$

**Fig.4 Respiración de las mitocondrias de hígado (a), de testículo adulto (b) y de testículo de 14 días de edad (c), en ausencia de sustratos exógenos.**

El medio de incubación fue descrito en la figura 3. La prueba se realizó a 30°C. Mit, indica las mitocondrias agregadas a una concentración de 0.6 a 0.8 mg/ml de proteína mitocondrial. Las concentraciones de DNF (D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub> y D<sub>3</sub>), fueron 10, 50 y 100  $\mu$ M respectivamente. El número representa el consumo de oxígeno expresado en nmoles de oxígeno/minuto/mg de proteína.

Fig. 4



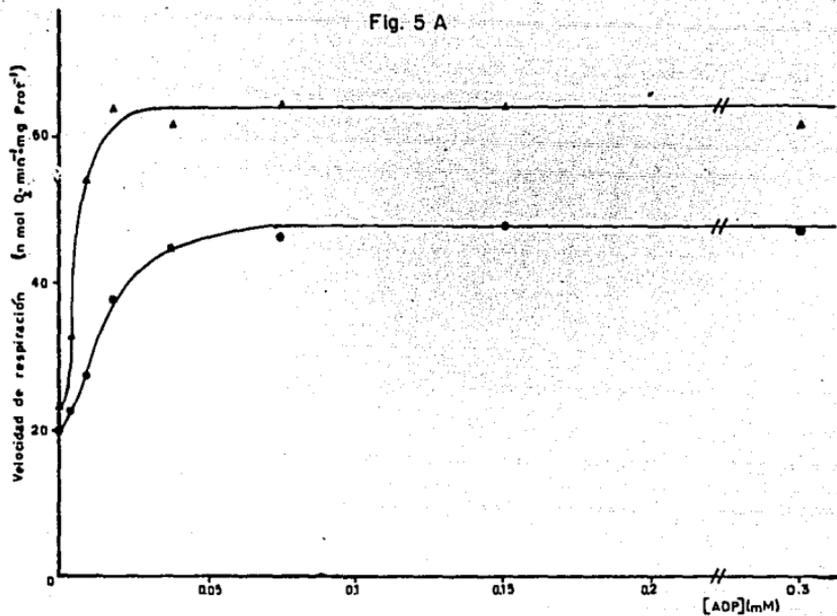
Oxígeno Total (%)

Fig.5 A). Efecto del ADP sobre la respiración de mitocondrias de testículo (●) y de hígado (▲).

La prueba fue realizada en la presencia de succinato 12 mM. El medio de incubación se describió en la figura 3. La concentración de proteína mitocondrial fue de 0.6 a 0.8 mg/ml.

B). Gráfica de Lineweaver-Burk de la respiración de las mitocondrias de testículo en presencia de ADP. Los valores corresponden a los de la Fig. 5A. La curva de regresión lineal fue calculada por el método de los mínimos cuadrados.

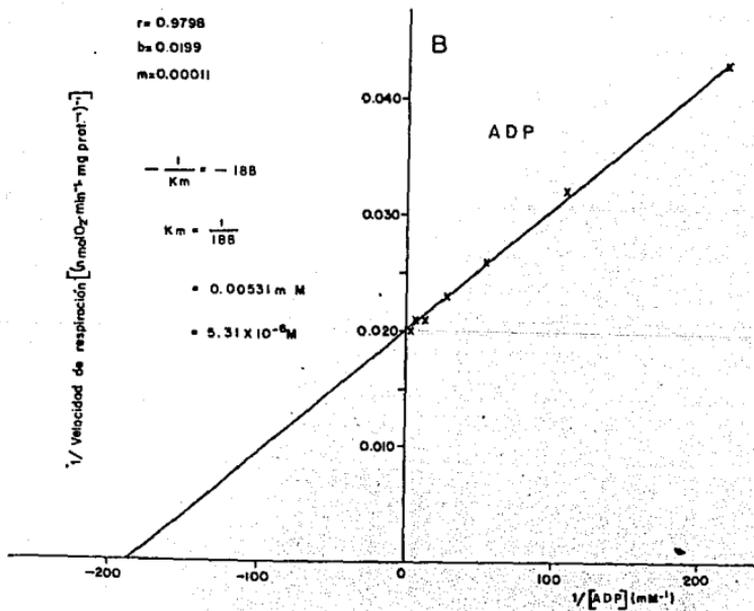
Fig. 5 A



$r = 0.9798$   
 $b = 0.0199$   
 $m = 0.00011$

$-\frac{1}{K_m} = -188$   
 $K_m = \frac{1}{188}$   
 $= 0.00531 \text{ m M}$   
 $= 5.31 \times 10^{-6} \text{ M}$

$1/\text{Velocidad de respiración} [\text{n mol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg prot.}^{-1}]^{-1}$



aparente. Este resultó ser de  $5.3 \times 10^{-4}M$  para las mitocondrias de testículo (Fig.5B), y de  $4.7 \times 10^{-4}M$  para las de hígado.

### **3.2. Efecto de la variación en la concentración de los sustratos oxidables sobre la velocidad de respiración.**

**3.2.1. Succinato.** Una vez elegida la concentración de ADP, se procedió a determinar la concentración a la que el succinato satura al sistema. Se encontró que tanto en el estado 4 como en el estado 3 fue mayor la velocidad de respiración en el hígado que en el testículo (Fig.6A). El sistema se saturó desde una concentración de 3 mM para el primero y de 6 mM para el segundo. Se decidió utilizar en adelante una concentración de 12 mM. El valor de la  $K_m$  aparente en el estado 3 para las mitocondrias de testículo fue de  $1.5 \times 10^{-3}M$  (Fig.6B), y de  $1.3 \times 10^{-4}$  para las de hígado, lo que implica un orden de magnitud de diferencia en la afinidad por el succinato.

**3.2.2. Malato.** En la figura 7A, se observa claramente cómo este sustrato fue oxidado pobremente por el hígado. En cambio, resultó ser un magnífico sustrato para apoyar la respiración de las mitocondrias de testículo; en éstas, los valores fueron cercanos a los que se obtuvieron con succinato. En ambos sistemas la velocidad máxima de respiración se alcanzó a partir de una concentración de 6 mM. Se eligió como concentración saturante 12 mM. El valor de la  $K_m$  aparente para el testículo en el estado 3 fue de  $2.3 \times 10^{-3}M$  (Fig.7B).

**3.2.3. Piruvato.** Se sabe que el piruvato es incapaz de penetrar libremente la membrana interna de las mitocondrias, de manera que se hace necesaria la presencia de un anión permeante, como es el

Fig. 6 A). Efecto del succinato sobre la respiración en mitocondrias de testículo (○, ●) y de hígado (△, ▲). Respiración en el 1<sup>er</sup> estado 4 (○, △) y en el estado 3 (●, ▲). Las condiciones experimentales, fueron las mismas de la figura 5A, con una concentración de ADP de 0.3 mM.

B). Gráfica de Lineweaver-Burk de la respiración de mitocondrias de testículo en presencia de succinato. Los valores corresponden a los de la Fig. 6A y se calcularon igual que en la Fig. 5B.

Fig. 6 A

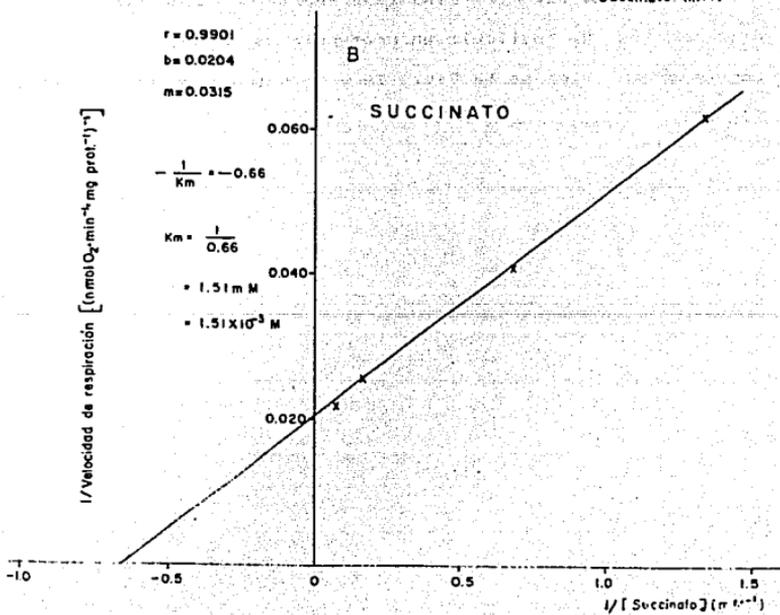
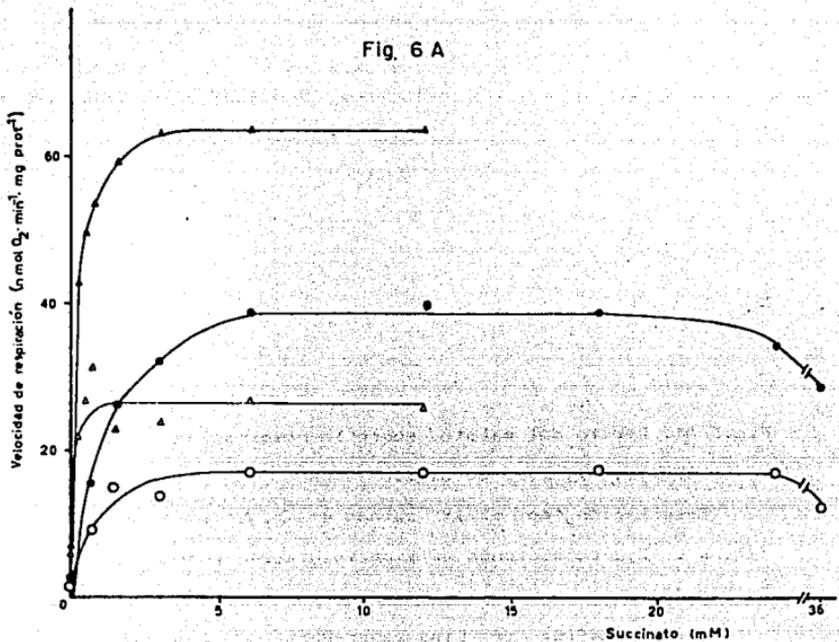
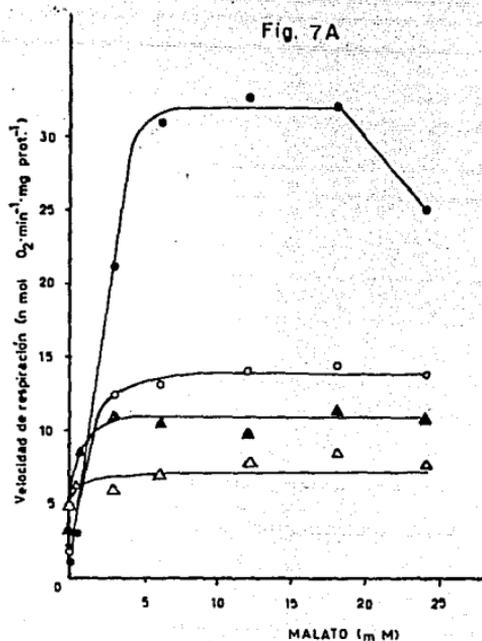


Fig. 7 A). Efecto del malato sobre la respiración en mitocondrias de testículo (O, ●) y de hígado (Δ, ▲).

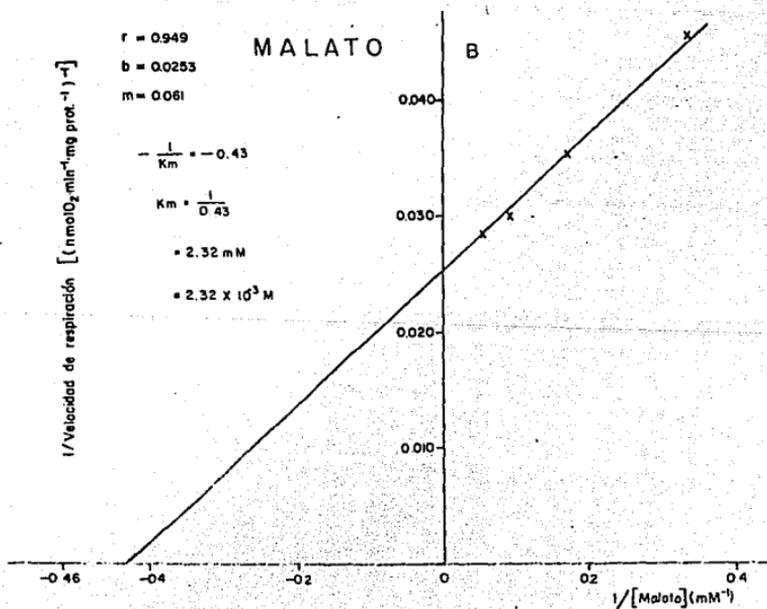
Respiración en el 1<sup>er</sup> estado 4 (O, Δ) y en el estado 3 (●, ▲). Las condiciones de experimentación fueron las mismas de la Fig. 6A.

B). Gráfica de Lineweaver-Burk de la respiración de mitocondrias de testículo en presencia de malato. Los valores corresponden a los de la Fig. 7A y se calcularon igual que en la Fig. 5B.

Fig. 7A



$r = 0.949$   
 $b = 0.0253$   
 $m = 0.061$   
 $-\frac{1}{K_m} = -0.43$   
 $K_m = \frac{1}{0.43}$   
 $= 2.32 \text{ mM}$   
 $= 2.32 \times 10^{-3} \text{ M}$



malato (23,82). Va que las mitocondrias de testículo mostraron una gran capacidad oxidativa para este sustrato, decidimos determinar, en primer término, la concentración máxima de malato que sirviera como anión permeante al piruvato sin contribuir significativamente a la velocidad de respiración. Para esto, se utilizaron concentraciones muy bajas de malato y se analizaron las velocidades de respiración, de tal manera que la estimulación debida a la adición de ADP (estado 3), no fuera significativamente diferente de la obtenida en el estado 4 (Tabla III). Con base en los resultados, se decidió utilizar una concentración de malato de 0.6 mM para medir la velocidad de respiración debida al piruvato.

En la Fig. 8A se muestra la respiración debida al piruvato; en esta se observa cómo este sustrato no es oxidado a una gran velocidad por ninguna de las dos preparaciones. Sin embargo, en ambos casos el sistema se saturó rápidamente desde concentraciones muy bajas. En las mitocondrias de hígado se alcanzó la velocidad máxima a partir de una concentración de 1.5 mM, y en las de testículo desde 3 mM, por lo que se decidió utilizar la combinación de piruvato 6 mM + malato 0.6 mM como la concentración saturante del sistema. El valor de la  $k_m$  aparente en el estado 3 fue de  $1.7 \times 10^{-4} M$  (Fig. 8B) para las mitocondrias de testículo, y de  $3 \times 10^{-4} M$  para las de hígado.

### 3.3. Efecto de los agentes desacoplantes sobre la velocidad de respiración en ausencia y en presencia de BSA.

3.3.1. Efecto del 2,4-dinitrofenol. De una titulación preliminar utilizando concentraciones variables de DNF, se eligió aquel rango de concentraciones que produjeron un efecto estimulatorio

**TABLA III**

**VELOCIDAD DE RESPIRACION DE MITOCONDRIAS DE TESTICULO DE RATA  
ADULTA EN PRESENCIA DE BAJAS CONCENTRACIONES DE MALATO.**

Edo. de respiración	Concentración de malato ( mM )				
	0.0	0.006	0.06	0.6	6
	( n mol O <sub>2</sub> / min / mg de proteína )				
Edo. 4	1.72	0.93	1.14	2.81	6.59
Edo. 3	1.10	1.17	0.86	2.91	18.07

El medio de incubación se describió en la Fig. 3.

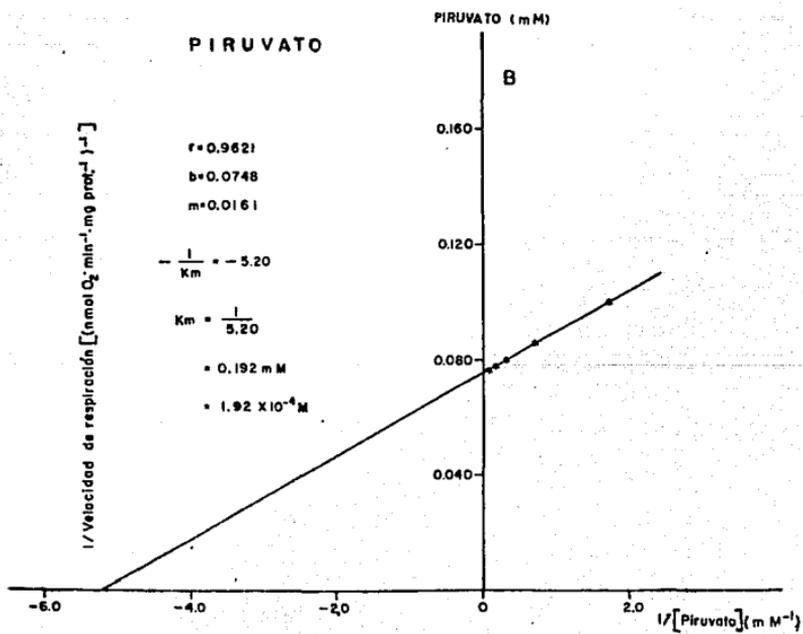
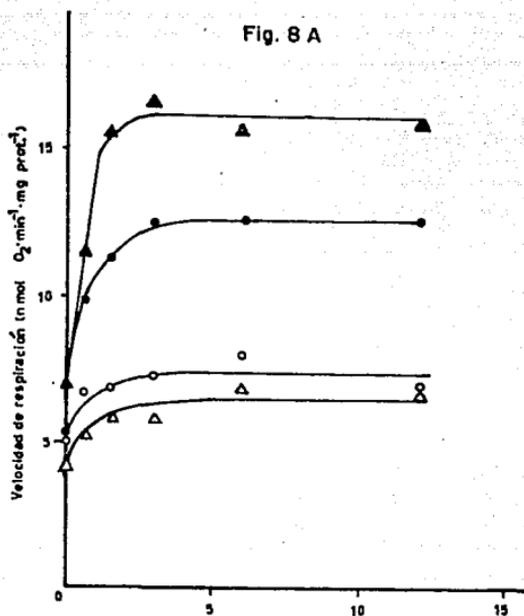
La concentración de proteína mitocondrial fue de 0.6 a 0.8 mg/ml. La respiración en el estado 3 se midió con ADP a una concentración de 0.3 mM.

Fig. B A). Efecto del piruvato sobre la respiración en mitocondrias de testículo (O, ●) y de hígado (Δ, ▲).

Respiración en el primer estado 4 (O, Δ) y en el estado 3 (●, ▲). Se adicionó malato 0.6 mM como anión permeante para el piruvato. Las condiciones de experimentación se mencionan en la Fig. 6A.

B). Gráfica de Lineweaver-Burk de la respiración de mitocondrias de testículo en presencia de piruvato. Los valores corresponden a los de la Fig. 6A y se calcularon igual que en la Fig. 5B.

Fig. 8 A



sobre la respiración en presencia de succinato 12 mM. Estas resultaron ser: 10, 50 y 100  $\mu$ M. Una vez elegidas se procedió a realizar el estudio del efecto de este desacoplante de la fosforilación oxidativa; sólo se utilizaron como sustratos oxidables al succinato y al malato, ya que cuando se utilizó piruvato, el DNP resultó tener un efecto inhibitorio sobre la respiración.

En ausencia de BSA, hubo un estímulo muy pobre del DNP sobre la respiración, a diferencia de lo que se obtuvo cuando las mitocondrias se prepararon con albúmina (Fig. 9A). El estímulo del desacoplante sobre la respiración fue en aumento al incrementarse la concentración del DNP. En la figura 9 se pueden apreciar sobre el lado derecho los valores de "q" (índice de acoplamiento de las mitocondrias) (90). Aquí se observa como la presencia de la BSA mejora considerablemente este índice. En la ausencia de albúmina, las mitocondrias mostraron estar pobremente acopladas, con un valor de "q" similar al informado para algunas partículas submitocondriales (90).

**3.3.2. Efecto del FCCP.** Este compuesto es uno de los desacoplantes más potentes, ya que actúa desde concentraciones tan bajas como 10 nM (144); sin embargo, en nuestro sistema, estimuló la respiración en forma apreciable sólo a partir de una concentración de 10  $\mu$ M. Este estudio se realizó en presencia de succinato. En la figura 9B, se observa que el efecto del FCCP sobre la respiración, al igual que el DNP, fue mayor en las mitocondrias preparadas en presencia de albúmina que en las carentes de ella; sin embargo, hay que hacer notar que, con la

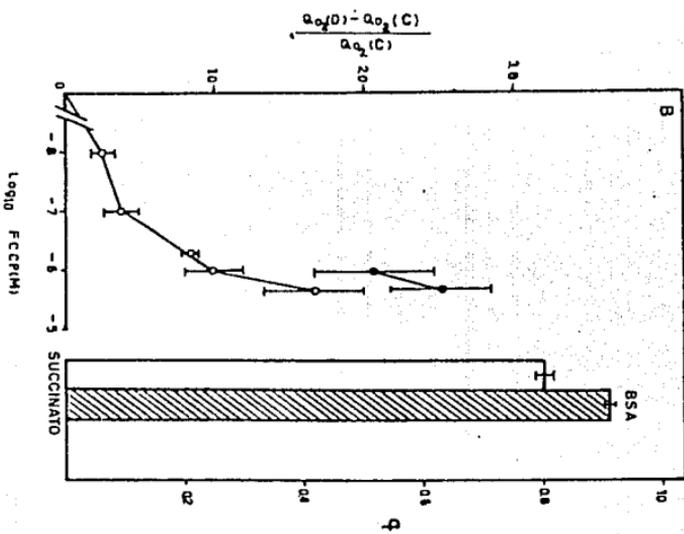
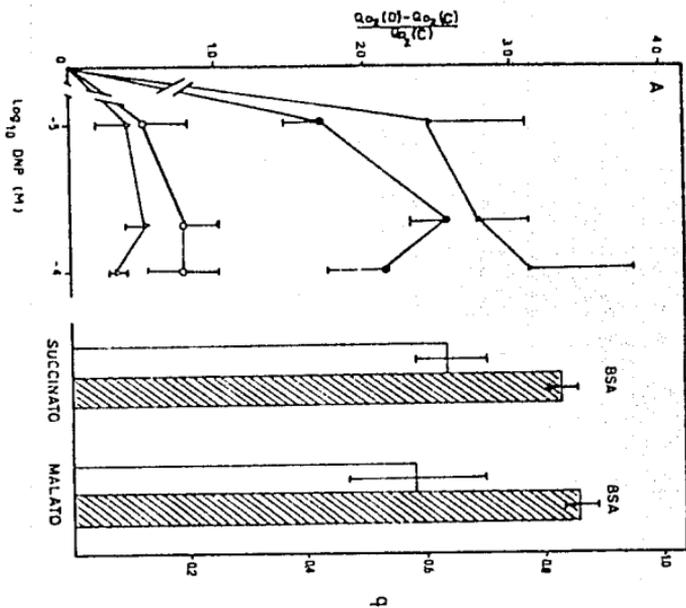
Fig. 9. Efecto del DNP (A) y del FCCP (B) sobre el consumo de oxígeno ( $Q_{O_2}$ ) en mitocondrias de testículo adulto, aisladas en ausencia ( $\circ, \Delta$ ) o presencia ( $\bullet, \blacktriangle$ ) de BSA al 1%.  $Q_{O_2}(D)$  y  $Q_{O_2}(C)$  representan respectivamente las velocidades de consumo de oxígeno con y sin desacoplante. Este fue agregado durante el 1<sup>er</sup> estado 4. Las condiciones experimentales fueron descritas en la Fig. 6A. Se utilizaron como sustratos oxidables al succinato ( $\circ, \bullet$ ) o al malato ( $\Delta, \blacktriangle$ ) a una concentración de 12 mM. Cada punto representa el promedio  $\pm$  D.E. de por lo menos 3 experimentos utilizando diferentes grupos de animales.

Los valores de  $Q_{O_2}(C)$  (nmoles de oxígeno/min/mg de proteína  $\pm$  D.E.; n=12) fueron: ( $\circ$ )  $23.2 \pm 5.0$ ; ( $\bullet$ )  $14.2 \pm 3.1$ ; ( $\Delta$ )  $11.2 \pm 2.6$ ; ( $\blacktriangle$ )  $4.3 \pm 0.4$ .  $\square$  y  $\text{■}$  representan los valores de "q" (índice de acoplamiento) en ausencia y en presencia de BSA respectivamente.

$$q = \sqrt{1 - \frac{1}{RCI}} \quad ; \quad RCI = \frac{Q_{O_2}(D)}{Q_{O_2}(C)}$$

$Q_{O_2}(D)$  representa la máxima respiración desacoplada.

PLG. 9



concentración máxima utilizada del desacoplante se siguió manifestando una estimulación en la velocidad de respiración. En la misma figura observamos nuevamente que el índice de acoplamiento "q" mejoró con la presencia de la albúmina en el medio de aislamiento.

### 3.4. Fosforilación oxidativa a través de la diferenciación del epitelio germinal.

Para este estudio se utilizaron mitocondrias de testículo obtenidas de grupos de ratas de diferentes edades. Estas se eligieron en función del grado máximo de diferenciación del epitelio germinal (TABLA I), de tal modo que la edad elegida correspondiera a una situación fisiológica definida. Consideramos que en cada grupo predominaron numéricamente las mitocondrias de las células del estado más avanzado en la diferenciación (1,25,27,80). En la TABLA I se clasifican los animales, dependiendo de su grado de madurez sexual alcanzado, en ratas prepúberes, púberes, adolescentes y adultas. En la TABLA II se muestra el número de animales utilizados en cada edad para el estudio en cuestión.

#### 3.4.1. Estudio de la fosforilación oxidativa en presencia y en ausencia de BSA.

La respiración de las mitocondrias de las ratas inmaduras en ausencia de sustratos exógenos fue más alta que la obtenida en los animales adultos (TABLA IV).

En presencia de sustratos exógenos, se observaron variaciones en el patrón de la velocidad de respiración con los tres sustratos utilizados. Estas variaciones fueron particularmente importantes en el estado 3, donde se presentó un

TABLA IV  
RESPIRACION EN AUSENCIA DE SUSTRATOS EXOGENOS

EDAD (Días)	Sin BSA (nmol O <sub>2</sub> /min/mg de proteína)	Con BSA 1%
11	4.96 ± 1.66 (2) <sup>a</sup>	3.99 ± 1.57 (2)
14	6.31 ± 0.63 (2)	4.60 ± 0.66 (2)
16	3.36 ± 1.53 (5)	N D
21	2.06 ± 1.09 (5)	2.87 ± 0.25 (2)
24	2.59 ± 0.8 (3)	2.62 ± 0.74 (2)
26	2.67 ± 1.32 (7)	3.29 ± 0.48 (2)
30	2.87 ± 0.17 (2)	2.54 ± 0.32 (2)
34	2.47 ± 0.15 (3)	2.97 ± 0.27 (2)
40	1.90 ± 0.96 (5)	1.73 ± 0.05 (2)
60-90	1.38 ± 0.08 (7)	N D
H <sup>b</sup>	4.46 ± 0.16 (7)	N D

<sup>a</sup> Los valores son el promedio ± la desviación estándar. El número de experimentos se indica entre parentesis.

<sup>b</sup> Hígado.

El medio de incubación se describió en la Fig. 3. La concentración de proteína mitocondrial fue de 0.6 a 0.8 mg/ml.

incremento muy marcado al inicio de la pubertad, que se mantuvo hasta los 21 días de edad. Posteriormente los valores fueron descendiendo en forma gradual a lo largo de la espermatogénesis. Este patrón respiratorio fue más notable cuando se utilizó succinato como el sustrato oxidable (Fig.10). Los valores de  $QO_2$  mostraron cambios menores en presencia de malato (Fig.11) o de la combinación piruvato + malato (Fig.12). En lo que toca a este último, cabe señalar que en todos los experimentos se realizó un control con malato 0.6 mM en ausencia de piruvato (Fig.13A). En esta misma figura (13B), se incluye la diferencia obtenida entre los valores de la combinación piruvato 6 mM + malato 0.6 mM y los obtenidos con malato 0.6 mM. De acuerdo con estos resultados, concluimos que sólo después de los 21 días de edad puede hablarse de una respiración debida al piruvato, ya que a edades menores no existe una diferencia significativa entre los valores de la combinación piruvato + malato y los obtenidos con el control de malato solo.

Dada la existencia de la LDH-X en las mitocondrias de testículo (24,95,159), como un dato adicional en relación con la utilización del piruvato, se efectuaron algunos experimentos preliminares sobre la oxidación del lactato (Fig.14). El patrón del consumo de oxígeno fue diferente al obtenido con los otros sustratos. El estado 3 mostró un incremento constante hasta los 40 días de edad; sin embargo al observar la respiración debida al malato 0.6 mM, que se utilizó como anión permeante, podemos decir que el lactato en realidad empezó a ser oxidado durante la espermiogénesis, cuando la LDH-X está presente. La presencia de

Fig.10 Actividad respiratoria de las mitocondrias de testículo a través de la diferenciación del epitelio germinal en ausencia (A) o en presencia (B) de BSA<sup>a</sup> al 1%, utilizando succinato 12 mM como el sustrato oxidable.

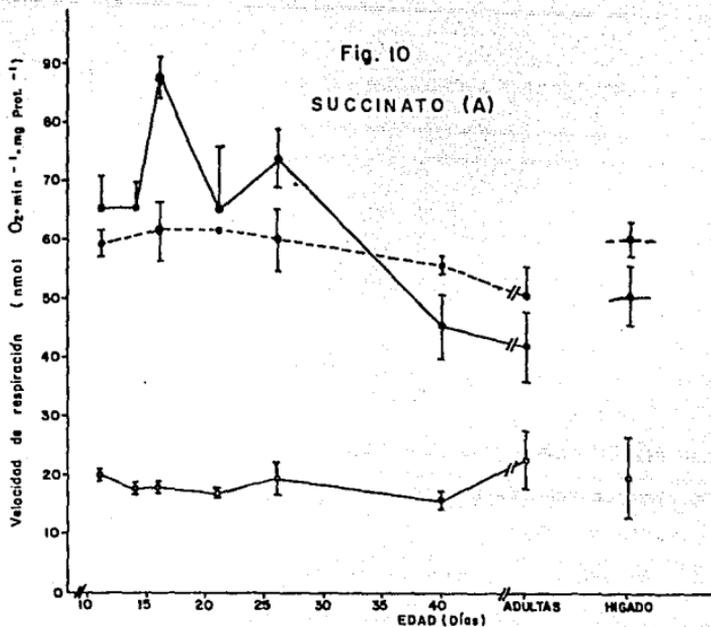
(O—O) 1<sup>er</sup> estado 4; (●—●) estado 3; (●—●) respiración desacoplada en presencia de DNP<sup>b</sup>. Cada punto representa el promedio  $\pm$  D.E. de por lo menos 4 experimentos diferentes. Las condiciones experimentales se describen en la Fig. 6<sup>a</sup>.

a La BSA se disolvió en el medio de ensayo antes de agregar la suspensión mitocondrial.-

b El desacoplante (100  $\mu$ M) se añadió durante el 2<sup>o</sup> estado 4.

Fig. 10

SUCCINATO (A)



SUCCINATO (B)

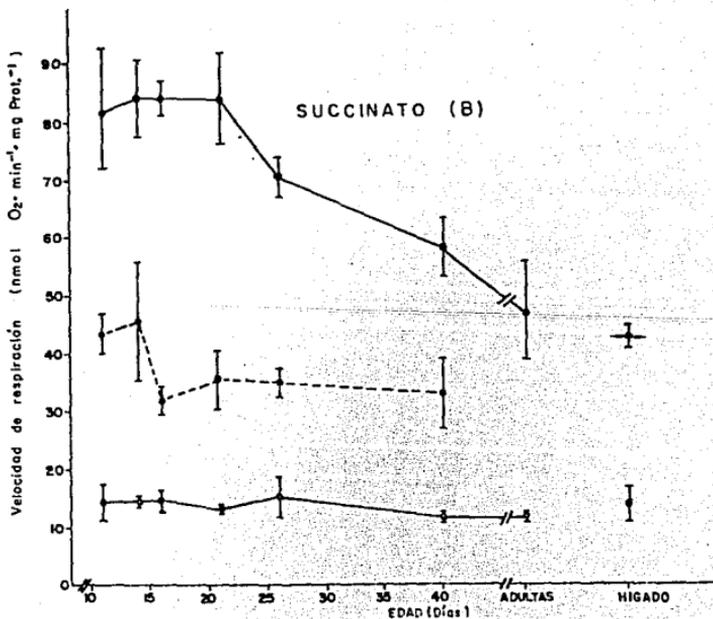


Fig.11 Actividad respiratoria de las mitocondrias de testículo a través de la diferenciación del epitelio germinal utilizando malato 12 mM en ausencia (A) o en presencia (B) de FSA al 1%.

(○—○) 1<sup>er</sup> estado 4; (●—●) estado 3; (●---●) respiración desacoplada en presencia de DNP. Cada punto representa el promedio de por lo menos 4 experimentos diferentes  $\pm$  D.E. Las condiciones experimentales se describen en la Fig. 6A. La BS<sub>4</sub> y el desacoplante se agregaron en condiciones idénticas a las de la Fig. 10.

Fig. II

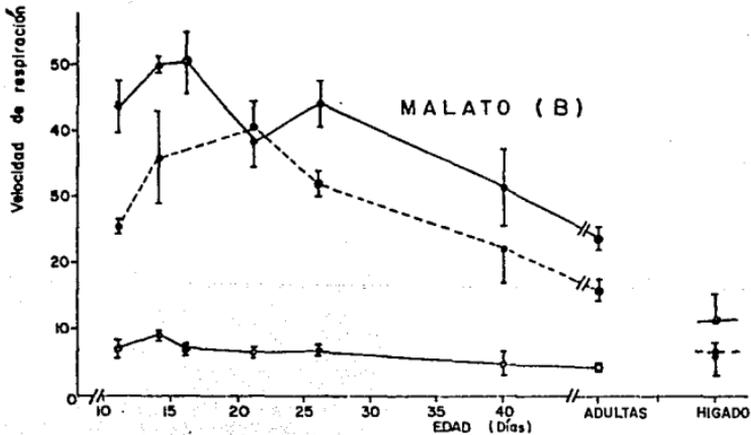
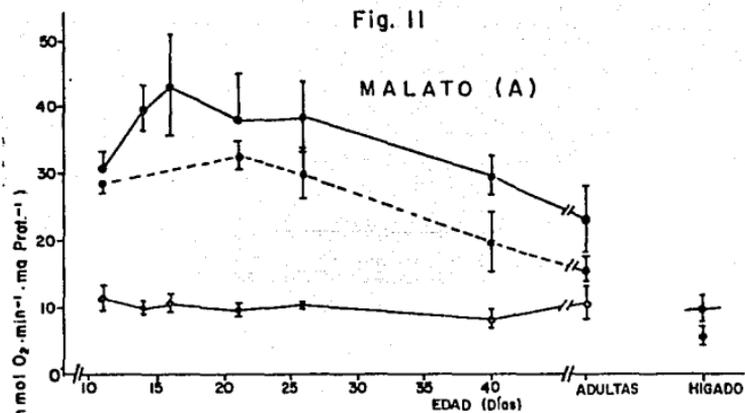
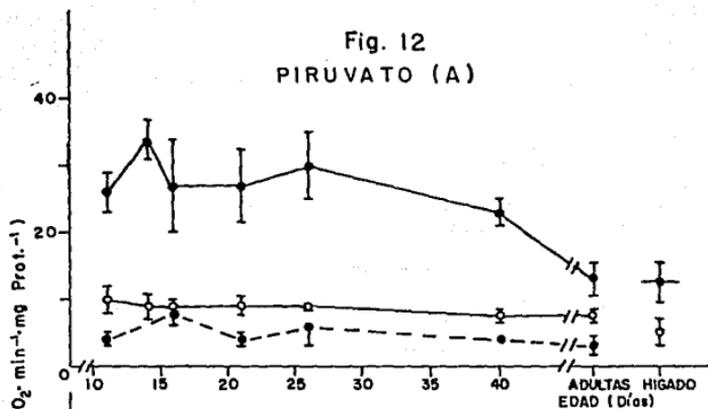


Fig.12 Actividad respiratoria de las mitocondrias de testículo a través de la diferenciación del epitelio germinal utilizando piruvato 6 mM + malato 0.6 mM, en ausencia (A) o en presencia (B) de BSA al 1%.

(○—○) 1<sup>er</sup> estado 4; (●—●) estado 3; (●---●) respiración desacoplada en presencia de DNP. Cada punto representa el promedio de por lo menos 4 experimentos diferentes  $\pm$  D.E. Las condiciones experimentales se describen en la Fig. 6A. La BSA y el desacoplante se agregaron en condiciones idénticas a las de la Fig. 10.

Fig. 12  
PIRUVATO (A)



PIRUVATO (B)

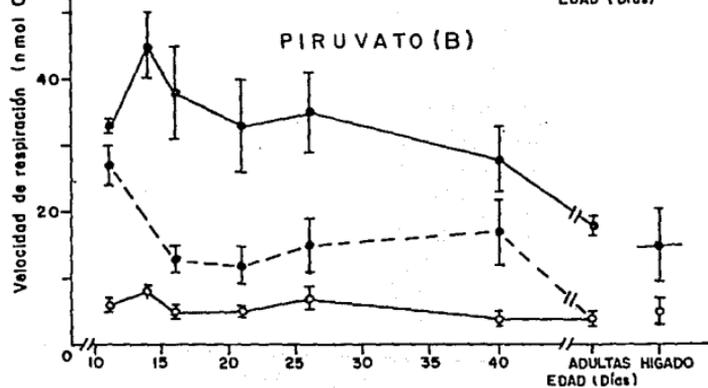


Fig.13 A). Actividad respiratoria de las mitocondrias de testículo a través de la diferenciación del epitelio germinal en presencia de piruvato 6 mM + malato 0.6 mM (línea continua), y de malato 0.6 mM (línea discontinua).

( O ) 1<sup>er</sup> estado 4; ( ● ) estado 3. Cada punto representa el promedio de por lo menos 4 experimentos diferentes  $\pm$  D.E. Las condiciones de experimentación se describen en la Fig. 6A.

B). Diferencia entre el  $O_2$  en presencia de piruvato 6 mM + malato 0.6 mM y el  $O_2$  en presencia de malato 0.6 mM.

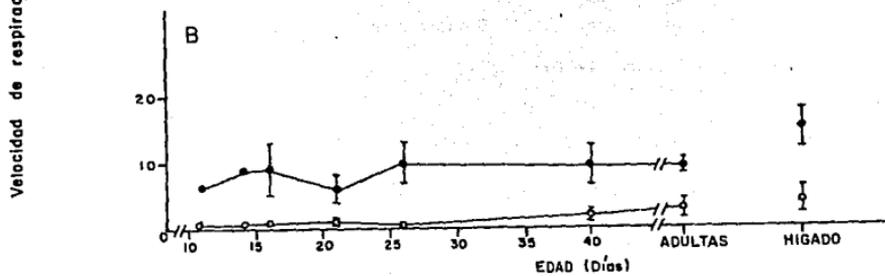
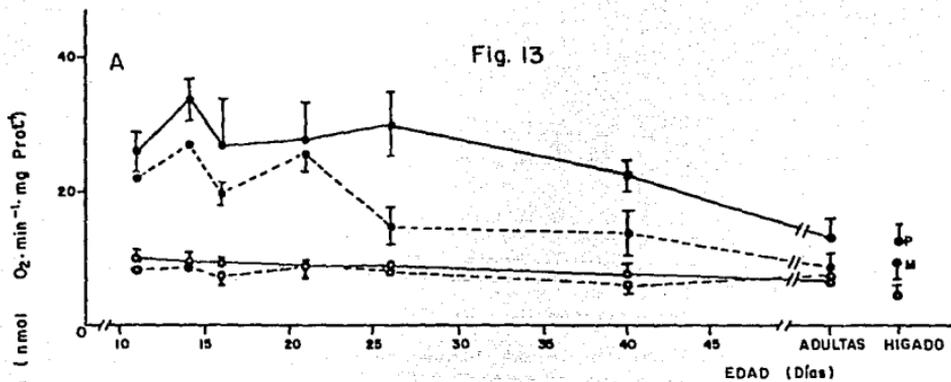
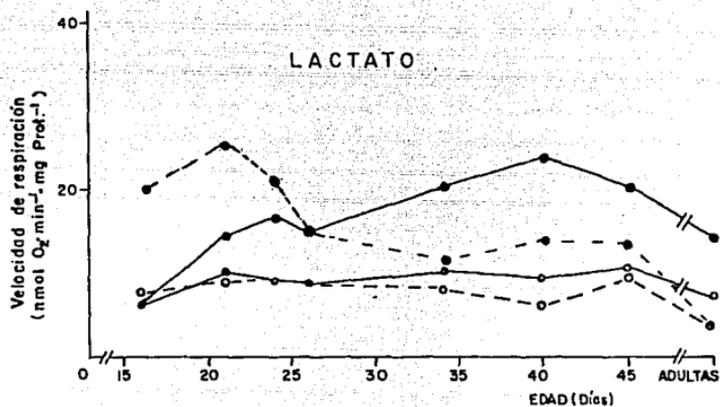


Fig. 14 Actividad respiratoria de las mitocondrias de testículo a través de la diferenciación del epitelio germinal, utilizando lactato 12 mM + malato 0.6 mM (línea continua) y malato 0.6 mM (línea discontinua).

(○) 1<sup>er</sup> estado 4; (●) estado 3. Las condiciones experimentales son idénticas a las de la Fig. 6A.

Fig. 14



lactato al parecer inhibió la oxidación debida al malato en las ratas inmaduras (Fig.14). Estos resultados pensamos que no son concluyentes, ya que el número de experimentos realizados fue insuficiente.

En lo que toca a los controles respiratorios, estos no parecieron seguir un patrón definido. En todas las preparaciones de testículo, los valores fluctuaron entre 2 y 4 (TABLA V). Si consideramos que en las determinaciones no se incluyó  $Mg^{2+}$ , los valores obtenidos estuvieron dentro del rango esperado.

Al adicionar albúmina al medio de incubación, se observó en la mayoría de los casos una disminución de la respiración durante el estado 4, y en algunas ocasiones, un incremento durante el estado 3, siendo muy notable este cambio en las mitocondrias de ratas prepúberes (Fig.10B, 11B y 12B). Sin embargo, los controles respiratorios no fueron afectados consistentemente.

Los valores de la actividad de la ATP sintetasa (Fig.15), fueron acordes con los de la respiración en el estado 3. Esta actividad resultó ser ligeramente más alta hasta los 26 días de edad, que corresponde a la aparición de la espermátidas. Posteriormente fue descendiendo en forma gradual hasta alcanzar cifras relativamente más bajas en la edad adulta.

La presencia de albúmina en el medio de ensayo incrementó ligeramente la actividad de la ATP sintetasa en las ratas prepúberes, sin cambio en las demás edades. Estos valores fueron máximos al utilizar succinato; en cambio con malato y con piruvato la actividad fue menor y similar en todas las edades estudiadas (Fig.15B).

En los mitocondrias de hígado, la actividad de la ATP

**TABLA V**  
**CONTROLES RESPIRATORIOS**

Edad (Días)	Succinato 12mM		Malato 12 mM		Piruvato (6 mM) + Malato (0.6mM)	
	* ±	II	* ±	II	* ±	II
11	4.0 ± 0.0(2)	2.66 0.66 (2)	2.53 0.03 (2)	1.37 -(1)	2.54 0.65(2)	1.76 0.09(2)
14	2.67 ± 0.0(2)	2.50 -(1)	4.80 -(1)	1.67 -(1)	1.75 0.08(2)	1.57 -(1)
16	3.23 ± 0.63(2)	2.30 0.47(4)	2.26 0.55(4)	1.63 0.04(3)	2.62 0.62(4)	1.58 0.18(4)
21	3.57 ± 0.96(7)	2.44 0.63(6)	2.50 0.58(7)	1.80 0.47(7)	3.28 1.01(6)	1.76 0.22(5)
26	3.19 ± 0.72(5)	2.41 0.63(7)	2.45 0.45(6)	1.76 0.26(5)	2.67 0.65(5)	2.68 0.64(6)
40	3.51 ± 0.55(5)	2.55 0.58(5)	2.40 0.35(5)	1.84 0.41(5)	4.10 0.64(4)	2.03 0.56(4)
60-90	2.84 ± 0.78(7)	2.12 0.85(5)	1.41 0.22(3)	1.22 0.08(2)	1.94 0.37(3)	2.90 0.45(4)
H <sup>o</sup>	4.34 ± 0.67(2)	8.27 0.96(3)	4.06 1.36(2)	6.18 0.61(2)	12.65 0.15(2)	3.25 -(1)

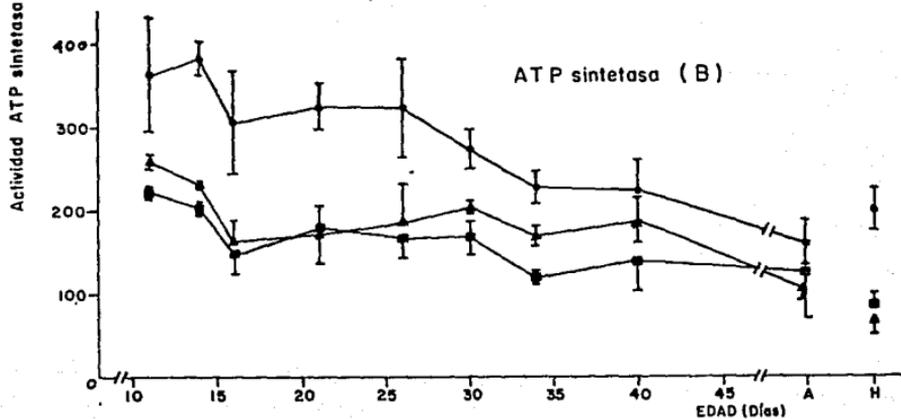
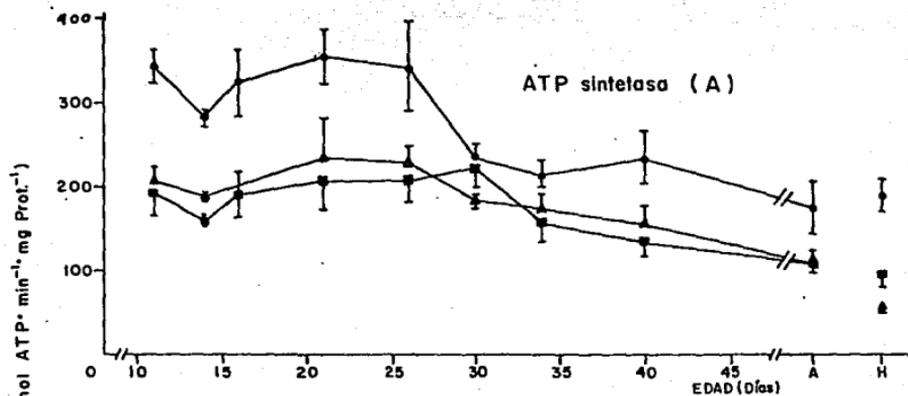
\* En ausencia de BSA.  
 II En presencia de BSA al 1% en el medio de incubación, en las condiciones detalladas en la fig. 6A.  
 Los valores son el promedio del número de experimentos indicados entre parentesis ± desviación estándar.  
 o Hígado.

**Fig.15 Actividad de ATP sintetasa a través de la diferenciación del epitelio germinal en ausencia (A) y en presencia (B) de BSA al 1%.**

La actividad se calculó a partir del  $DO_2$  en el estado 3, y de los experimentos presentados en la las Figs. 10, 11, 12.

(●) actividad en presencia de succinato 12 mM; (▲) actividad en presencia de malato 12 mM; (■) actividad en presencia de piruvato 6 mM + malato 0.6 mM.

Fig. 15



sintetasa fue más baja en la presencia de malato, de manera congruente con el consumo de oxígeno obtenido en este sistema. En proporción menor, se observó lo mismo con el piruvato.

La presencia de albúmina no modificó consistentemente la relación ADP/O a lo largo de la espermatogénesis (TABLA VI), y se obtuvieron valores de acuerdo con los sustratos utilizados.

#### 3.4.2. Efecto del 2,4-dinitrofenol sobre la respiración en ausencia y en presencia de BSA.

En ausencia de BSA, la velocidad de respiración desacoplada fue menor en las preparaciones mitocondriales de rata adulta con cualquiera de los tres sustratos utilizados. En presencia de succinato se obtuvieron valores muy bajos en las mitocondrias de rata adulta, en comparación con los correspondientes de ratas jóvenes, en las que el valor máximo correspondió a los 14 días de edad (Fig. 16A). La presencia de albúmina en el medio de ensayo modificó el patrón de la velocidad de respiración desacoplada. Los valores máximos se presentaron hacia los 11 días de edad y descendieron gradualmente hasta llegar al estado adulto. A pesar de que el efecto del DNP sobre la respiración fue estimulatorio, sus valores fueron relativamente más bajos que los obtenidos en ausencia de BSA en todas las edades estudiadas (Fig. 16B).

Al utilizar malato, el DNP incrementó la toma de oxígeno. Esta fue máxima durante la pubertad (Fig. 17A). La BSA incrementó la velocidad de respiración desacoplada y nuevamente los valores máximos correspondieron a la pubertad, con un decremento posterior (Fig. 17B). Cabe hacer notar que la presencia de albúmina en el medio de incubación aumentó la velocidad de

TABLA VI

VALORES DE LA RELACION ADP/O

Edad (Días)		Malato (12m M)		Piruvato (6m M) + Malato (0.6m M)	
		*	†	*	†
11	$\bar{x}^a$	3.22	2.32	2.84	3.22
	$\pm D.E.^b$	0.10 (2)	0.72 (2)	0.12 (2)	0.10 (2)
14	$\bar{x}$	2.28	2.28	2.38	2.26
	$\pm D.E.$	0.03 (2)	0.14 (2)	0.06 (2)	0.24 (2)
16	$\bar{x}$	2.21	2.06	2.89	1.97
	$\pm D.E.$	0.27 (4)	0.31 (3)	0.52 (4)	0.24 (4)
21	$\bar{x}$	2.99	2.05	3.07	2.42
	$\pm D.E.$	0.51 (7)	0.35 (7)	0.55 (5)	0.38 (7)
26	$\bar{x}$	2.84	1.92	3.25	2.31
	$\pm D.E.$	0.51 (7)	0.40 (7)	0.66 (7)	0.61 (6)
40	$\bar{x}$	2.85	2.19	3.03	2.53
	$\pm D.E.$	0.39 (5)	0.52 (5)	0.13 (4)	0.37 (5)
60-90	$\bar{x}$	2.48	1.88	3.70	2.17
	$\pm D.E.$	0.28 (3)	0.33 (2)	1.10 (5)	0.51 (4)
H <sup>a</sup>	$\bar{x}$	3.50	2.55	3.13	2.64
	$\pm D.E.$	0.72 (3)	0.06 (3)	0.19 (3)	0.50 (3)

\* En ausencia de BSA.

† En presencia de BSA al 1%.

a Hígado.

b Promedio  $\pm$  desviación estándar.

Fig.16 Efecto de diferentes concentraciones de DNF sobre la respiración en mitocondrias de testículo a través de la diferenciación del epitelio germinal en ausencia (A) o en presencia (B) de BSA al 1%, utilizando como sustrato oxidable succinato 12 mM.

(□) 1<sup>er</sup> estado 4. DNF: (⊗; 10 μM), (▨; 50 μM), (■; 100 μM).  
Cada barra indica el promedio de por lo menos 4 experimentos diferentes ± D.E. Las condiciones de experimentación son las especificadas en la Fig. 10.

Fig. 16

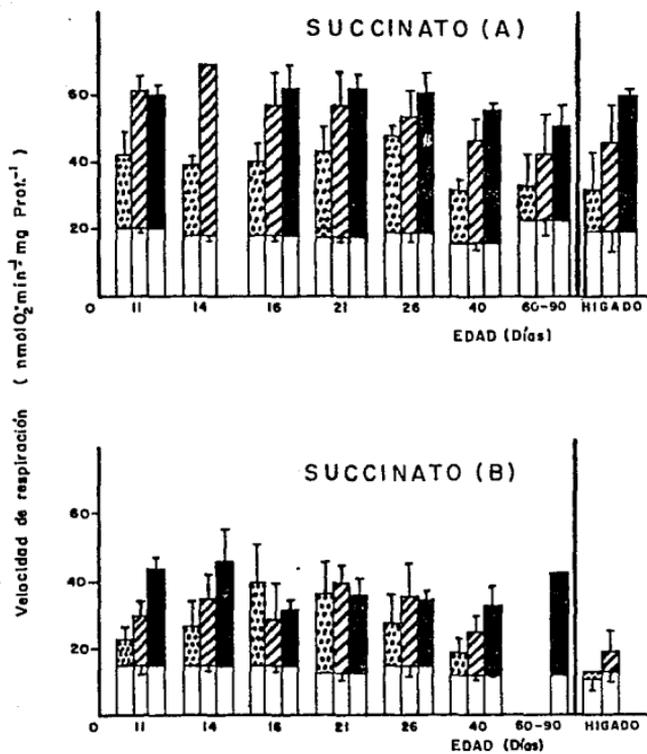
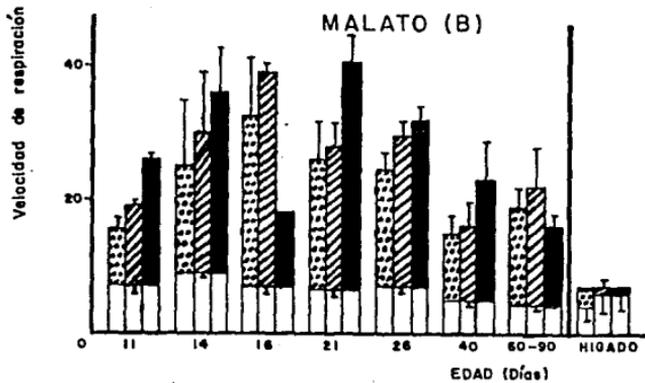
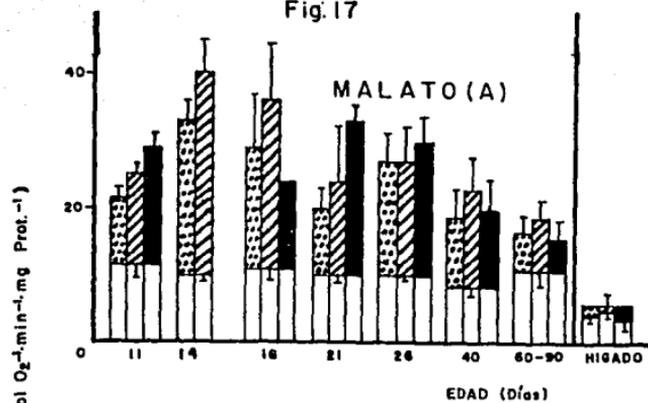


Fig.17 Efecto de diferentes concentraciones de DNF sobre la respiración en mitocondrias de testículo a través de la diferenciación del epitelio germinal en ausencia (A) o en presencia (B) de BSA al 1%, utilizando como sustrato oxidable malato 12 mM.

(□) 1<sup>er</sup> estado 4. DNF: (▣; 10 μM), (▨; 50 μM), (■; 100 μM).  
Cada barra indica el promedio de por lo menos 4 experimentos diferentes ± D.E. Las condiciones de experimentación son las especificadas en la Fig. 11.

Fig. 17



respiración desacoplada, sobre todo en las mitocondrias obtenidas de animales adultos, siendo comparativamente más altos que los obtenidos en su ausencia (Fig.17).

Por último, en presencia de piruvato 6mM + malato 0.6 mM, aunque la tendencia del patrón de respiración fue similar al encontrado con los otros dos sustratos, el DNP mostró un efecto claramente inhibitorio sobre la respiración a concentraciones de 50 y 100  $\mu$ M; sin embargo, a la concentración más baja utilizada (10  $\mu$ M), se observó una pequeña estimulación sobre el  $CO_2$  basal (Fig.18A). La respuesta inhibitoria desapareció cuando la BSA estuvo presente en el medio de ensayo a todas las concentraciones utilizadas del DNP (Fig.18B).

Se obtuvo un mejor índice de acoplamiento "q" (Fig.19) en las mitocondrias de ratas inmaduras que en las de los animales adultos, en ausencia de BSA.

La adición de DNP en presencia de lactato 12 mM + malato 0.6 mM, produjo también un efecto inhibitorio sobre la respiración (TABLA VII); sin embargo, nuevamente hay que considerar estos resultados como preliminares, dado el bajo número de veces que se realizó cada experimento.

### 3.4.3. Actividad de la citocromo c oxidasa.

En vista de que los datos obtenidos en 3.4.1. y en 3.4.2. nos sugirieron la existencia de un proceso de diferenciación funcional de la fosforilación oxidativa en las mitocondrias de testiculo, decidimos determinar la actividad de la citocromo c oxidasa, ya que es el último intermediario enzimático en la cadena transportadora de electrones.

Como puede observarse en la figura 20, la actividad de esta

Fig.18 Efecto de diferentes concentraciones de DNP sobre la respiración en mitocondrias de testículo a través de la diferenciación del epitelio germinal, en ausencia (A) o en presencia (B) de BSA al 1%, utilizando como sustrato oxidable piruvato 6 mM + malato 0.6 mM.

(□) 1er estado 4. DNP: (▨; 10 μM), (▩; 50 μM), (■; 100 μM).

Cada barra indica el promedio de por lo menos 4 experimentos diferentes ± D.E. Las condiciones de experimentación son las mismas de la Fig. 12.

Fig. 18

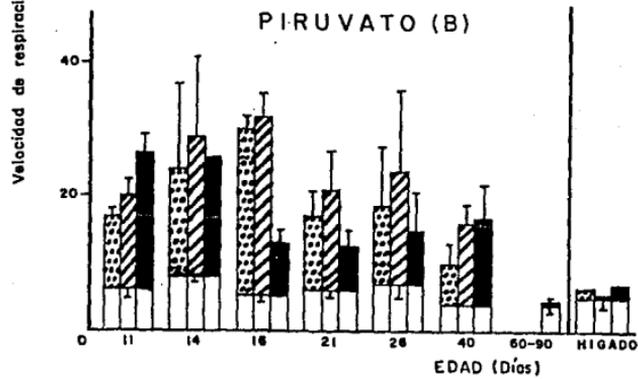
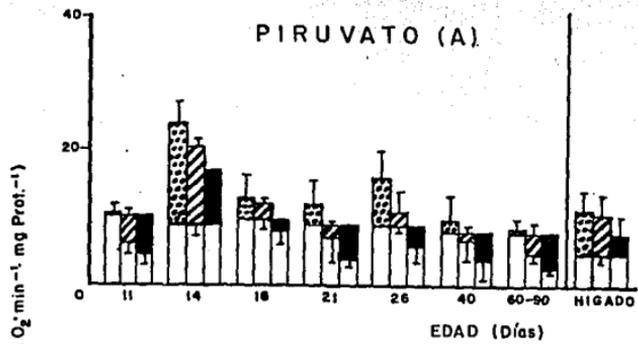


Fig.19 Índice de acoplamiento "q", calculado según se indica en la Fig. 9, a partir de los datos de las Figs. 10, 11, 16 y 17. (□) valores en presencia de succinato 12 mM; (▨) valores en presencia de malato 12 mM.

Fig. 19

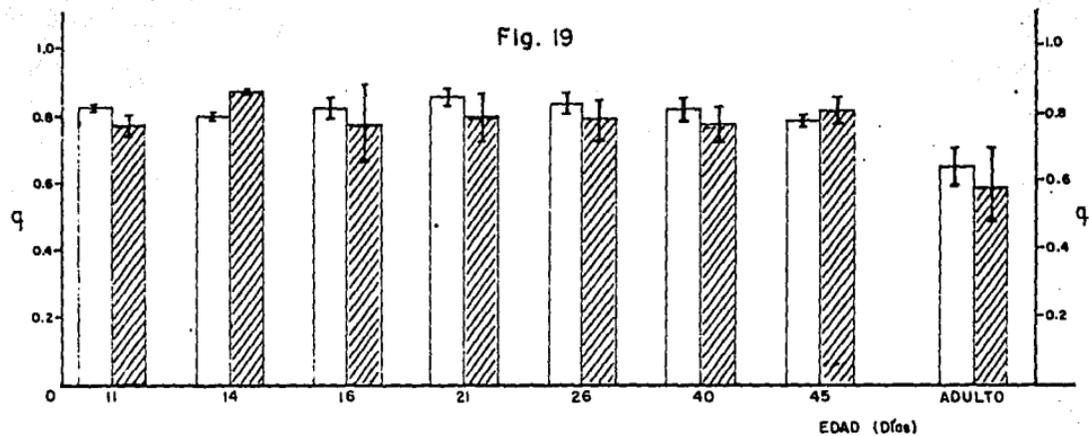


TABLA VII

EFFECTO DEL 2,4-DINITROFENOL SOBRE LA RESPIRACION DE MITOCONDRIAS DE TESTICULO EN PRESENCIA DE LACTATO\*

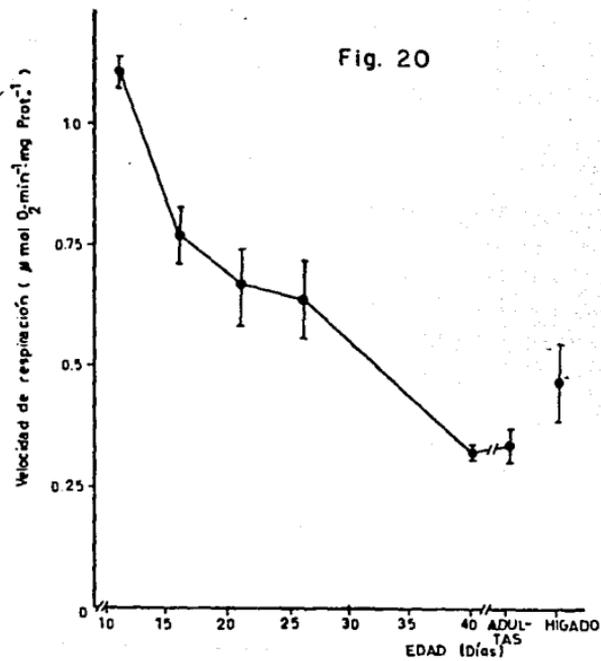
EDAD(Días)	2,4 - dinitrofenol		
	10 $\mu$ M	50 $\mu$ M	100 $\mu$ M
	(nmol O <sub>2</sub> /min/mg. prot.)		
26	6.25	1.08	1.39
34	7.68	6.25	6.72
40	12.62	6.33	3.84

- \* Lactato 12 mM.  
El medio de incubación se describió en la Fig 3.  
La concentración de proteína mitocondrial fue de 0.6 a 0.8 mg/ml. La respiración en el estado 3 se midió con ADP a una concentración de 0.3 mM

Fig.20 Actividad de la citocromo c oxidasa en las mitocondrias de testículo durante el desarrollo del epitelio germinal.

Cada punto representa el promedio de por lo menos 3 experimentos diferentes  $\pm$  D.E. La técnica empleada se describe en la sección de MATERIALES Y METODOS. La medición se realizó a 25°C, en estas condiciones la concentración de oxígeno en el medio de incubación fue de 166  $\mu$ M. El medio de incubación consistía de:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  50 mM, EDTA 1 mM, ascorbato 7 mM, citocromo c 25  $\mu$ M, TMEFD 0.7 mM. Las mitocondrias se agregaron después de diluirse con lubrol al 1% (10:1), y la concentración de proteína mitocondrial en el medio de incubación fue de 0.6 a 0.6 mg/ml.

Fig. 20



enzima fue máxima en las ratas prepúberes (11-14 días), descendió bruscamente durante la pubertad y después disminuyó gradualmente hasta llegar al estado adulto.

La diferencia tan marcada entre las pendientes negativas de los distintos patrones arriba descritos, sugiere que durante la espermatogénesis se lleva a cabo un proceso de diferenciación funcional de las mitocondrias.

#### 4. D I S C U S I O N

El estudio del metabolismo testicular es complejo, ya que en este órgano se encuentra presente una población celular heterogénea, que no sólo involucra a las células del epitelio germinal, sino también a las células de Sertoli y a las células del tejido intersticial. Por otra parte, "in vivo", el metabolismo testicular se encuentra bajo un control hormonal estricto, relacionado principalmente con las gonadotropinas secretadas por la hipófisis (LH, hormona luteinizante; y la FSH, hormona estimulante del folículo), y con los andrógenos, secretados principalmente por las células de Leydig, al ser estimuladas por la LH (48,114,139).

Es necesario considerar esta complejidad al analizar cualquier estudio sobre los procesos implicados en el metabolismo energético, del cual depende la supervivencia y diferenciación de las células germinales. Además, en el caso particular de las preparaciones utilizadas en este estudio, no hay que olvidar que se trata de fracciones mitocondriales crudas, con una contaminación variable de restos celulares, especialmente de fragmentos de flagelos provenientes de los espermatozoides y de las espermátidas tardías, en las edades más avanzadas. Esto se ha evidenciado en microfotografías de trabajos anteriores realizados en este laboratorio (151).

Se ha discutido mucho acerca de los procesos relacionados con la obtención de energía durante la espermatogénesis. Algunos autores señalan a la glucólisis como la principal vía metabólica encargada de la producción de la mayor parte de la energía para

los requerimientos celulares (47,88,123,125,156), mientras que otros afirman que es el mecanismo de la fosforilación oxidativa la encargada de apoyar en mayor grado estas necesidades (37,44,48,111,140).

En un trabajo anterior de este laboratorio (151), y en trabajos de otros autores (44,98,99,111), se demostró que estas mitocondrias, a pesar de que su morfología es diferente a la que presentan las de hígado (3,41,96,99) (TABLA I), son capaces de producir ATP vía el mecanismo de la fosforilación oxidativa.

En algunos estudios realizados con mitocondrias de diferentes fuentes, se ha sugerido que durante su obtención, es posible que sufran daño, debido al tratamiento físico y mecánico al cual son expuestas; como resultado de esto, una parte de ellas se encuentra en condiciones de desacoplamiento, con lo cual se acelera su velocidad de respiración (38). Este fenómeno se ha observado sobre todo en organelos muy lábiles, tales como las mitocondrias de tumores de rata y de ratón (136). En las mitocondrias de testículo de rata, se ha informado que la actividad de la ATPasa presenta ciertas características peculiares (151,152), además, se ha sugerido la posibilidad de que la porción F<sub>1</sub> de la ATPasa este laxamente unida a la membrana mitocondrial (151); por lo tanto, en estas preparaciones no es de extrañar que, al parecer, una buena parte de ellas se encuentren desacopladas. No obstante esta situación, los resultados de este trabajo aportan evidencias sobre el funcionamiento de la fosforilación oxidativa en las mitocondrias de testículo de rata a través de la maduración de la gónada.

Bucci y cols. (14), han reportado que el tiempo de manipulación de los testículos de ratas pequeñas (hasta los 21 días aproximadamente), hace que se reduzca la viabilidad celular, con lo cual es relativa la interpretación de los resultados en los estudios bioquímicos. En nuestro caso particular, el tiempo de manipulación fue considerable en las ratas de 11 y 14 días de edad, donde se utilizó un gran número de animales (TABLA II). Aunque no podemos extrapolar lo que ocurre en las células completas a lo que pueda suceder en las mitocondrias, el tiempo entre el sacrificio y la medición del  $O_2$  no fue más allá de los límites reportados como óptimos para evitar la muerte de las células germinales (5-6 hrs.) (14).

Estudios realizados con espermatozoides enteros (71,99,123, 149), con fragmentos de la región media (111) y con mitocondrias aisladas de las células germinales (98,99), han demostrado una gran capacidad oxidativa asociada con una fosforilación eficiente utilizando succinato, malato y piruvato, que se ha visto son los metabolitos del ciclo de los Ácidos tricarbóxicos que más contribuyen a la obtención del ATP en estas células (111).

En la caracterización de nuestro sistema, los valores de  $K_m$  aparente mostraron una afinidad del ADP en las mitocondrias de testículo similar a la del hígado. Martino y cols. (98,99), reportaron un  $K_m$  del mismo orden de magnitud en mitocondrias aisladas directamente de células germinales provenientes de testículo adulto, donde la curva de saturación es similar a la obtenida por nosotros; sin embargo, a diferencia de nuestras condiciones, esos autores incluyeron BSA al 1% en el medio de aislamiento de las mitocondrias.

En relación con la elección de los sustratos oxidables para realizar el presente trabajo, fue necesario descartar al glutamato, que es usado frecuentemente en estudios sobre la fosforilación oxidativa en mitocondrias de diversos tejidos, tales como el hígado (85), ya que desde hace tiempo atrás se sabe que en las mitocondrias de testículo adulto, que tanto la deshidrogenasa glutámica (GDH), así como la deshidrogenasa  $\beta$ -OH-butírica ( $\beta$ -OH-BDH), tienen una actividad específica muy baja, de 0.07 y 0.05 nmoles de NADH formado/min/mg de proteína, respectivamente (85). No es de extrañar, por lo tanto, que en una serie de experimentos preliminares llevados a cabo en nuestro laboratorio, estos sustratos no sustentaron un  $Q_{O_2}$  por encima del correspondiente a los sustratos endógenos. En cambio, se sabe que la SDH es la deshidrogenasa más activa en las mitocondrias de testículo (0.78 nmoles de NADH formado/min/mg de proteína) (85). Además, también se sabe que esta enzima se encuentra fuertemente adherida a la membrana mitocondrial interna (87,129), y está asociada con el sitio II de la cadena transportadora de electrones, en donde se ha observado un aumento en la velocidad de flujo (87). Peterson y cols., reportaron una respiración aumentada en espermatozoides de humano (123), y según nuestros datos, en las mitocondrias de testículo la situación no es diferente; inclusive, en espermatozoides de epidídimo de bovino, se ha postulado que la fosforilación a nivel de sustrato por medio de la succinato tiocinasa es suficiente para mantener una motilidad moderada en el flagelo, a pesar de tener bloqueada la cadena respiratoria con rotenona (71,140).

Nuestros datos y los de otros autores (50,99,123), muestran que el succinato es el sustrato que apoya en mayor medida la respiración. Sin embargo, es de hacer notar que el Km aparente que obtuvimos para el succinato fue de un orden de magnitud superior al del sistema hepático. Esto se reflejó también en los valores de la velocidad máxima del  $QO_2$  en el estado 3, que fueron un 50% más altos en hígado que en testículo.

En cuanto al malato, pudimos comprobar la baja capacidad oxidativa que presenta el hígado, a diferencia del testículo, en donde se ha descrito una isoenzima málica específica (4,94,117). Además, la actividad de la deshidrogenasa málica es alta en las mitocondrias de testículo adulto (0.70 nmoles de NADH formado/min/mg de proteína) (85). Con los valores de las mitocondrias de hígado, como era de esperarse, no se pudo calcular el Km aparente, ya que mostró una pendiente negativa en la gráfica de Lineweaver-Burk (Dato no mostrado).

La presencia de malato 0.6 mM fue indispensable para obtener una respuesta lineal del  $QO_2$  en la oxidación del piruvato, al igual que lo reportado por Hutson (71) y VanDop (149) en espermatozoides de epidídimo de bovino; en ese estudio, lo utilizaron a una concentración de 0.8 mM sin que interfiriera en la oxidación del piruvato. En éstas células, previamente permeabilizadas con el antibiótico llamado filipina, se reportó que la velocidad de respiración en el estado 3 fue la misma cuando utilizó 1.4 mM o 10 mM de piruvato (71). En las mitocondrias de testículo la saturación del sistema se alcanzó a partir de una concentración de 3 mM, y en hígado de 1.5 mM. Los valores de Km aparente fueron del mismo orden de magnitud para

ambos tejidos y cercanos a los valores de  $K_m$  reportados en otros trabajos para la entrada del piruvato a las mitocondrias de hígado, que van de 0.6 mM (120) hasta 1.1 mM (59). Dado que la velocidad de entrada del piruvato a las mitocondrias hepáticas, según Papa y cols. (120) es de 32 nmoles de piruvato/min/mg de proteína a 0°C, no parece que el translocador sea un factor limitante para la oxidación de este sustrato. En nuestras condiciones, la  $V_{m\acute{a}x}$  de  $O_2$  a 30°C fue de 32 nátomos de oxígeno/min/mg de proteína en hígado y de 25 en testículo.

En cuanto a los desacoplantes, habitualmente sus acciones se deben a que median la transferencia de protones a través de la membrana mitocondrial (protonóforos), y disipan el  $\Delta pH$  y el  $\Delta \Psi$ , componentes del gradiente electroquímico (110). Asimismo, liberan el control respiratorio y estimulan tanto la actividad de la ATPasa sensible a oligomicina como la respiración, e inhiben la síntesis de ATP (144).

En un trabajo anterior en este laboratorio, se demostró que la ATPasa mitocondrial de testículo es insensible a los agentes desacoplantes clásicos (FCCP y DNP) (152), aunque se obtiene cierta estimulación cuando las mitocondrias se preparan en presencia de BSA al 1%. Se ha encontrado esta misma insensibilidad hacia el DNP en ciertas células tumorales (75,78,121), en hígado fetal de rata y en cerebro adulto (65), a menos que las mitocondrias sean aisladas en la presencia de BSA.

Estos hallazgos nos llevaron a estudiar el efecto de los desacoplantes sobre la respiración en las mitocondrias de testículo.

En presencia de succinato o de malato, al comparar las curvas dosis-respuesta para el DNP y para el FCCP sobre el consumo de oxígeno de mitocondrias preparadas sin y con BSA, fue evidente que en las primeras la estimulación de la respiración basal fue mucho menor que en las segundas. Esta observación puede implicar que en ausencia de albúmina, las mitocondrias de testículo estuvieron pobremente acopladas y que la presencia de ésta mejoró su estado de acoplamiento. De hecho, los índices "q" de acoplamiento fueron acordes con esta interpretación, como lo es también el grado de actividad de la ATPasa en presencia de los desacoplantes (152). Aún más, existen evidencias que sugieren que el hecho de que las mitocondrias testiculares tengan por lo menos una parte de su ATPasa laxamente unida a la membrana (151), puede resultar en la existencia de cierto número de canales de protones ( $F_o$ ) abiertos (152). A través de ellos podría darse un flujo de protones al interior de la mitocondria, con el consecuente colapso del potencial electroquímico. De alguna manera aún no definida, parecería que la albúmina ejerce una protección contra este estado de apertura de canales de protones; de ahí que haya sido capaz de incrementar la síntesis de ATP, medida directamente por la incorporación de  $^{32}P$  a la posición  $\gamma$  del ADP (152), de propiciar la respuesta de la ATPasa a agentes desacoplantes (152), y de afectar la respiración y la actividad de la ATP sintetasa en los experimentos informados en este trabajo.

Aún cuando el efecto del DNP sobre las mitocondrias de testículo fue limitado, las concentraciones a las que se observó la estimulación máxima de la respiración fueron similares a

aquellas reportadas para otros tejidos (100  $\mu$ M) (83,116,144,148), así como para espermatozoides enteros o fragmentados (71,111,150). En cambio, al utilizar FCCP, éste no llegó a inhibir la respiración, a pesar de haber utilizado concentraciones del orden de  $10^{-6}$ M, siendo que en mitocondrias de hígado de rata se ha reportado como concentración de estimulación máxima media  $70 \text{ nM}$  ( $7 \times 10^{-8}$ M) (144,148).

Además de las acciones de los desacoplantes sobre la fosforilación oxidativa arriba detallados, también se ha informado que pueden llegar a inhibir algunas enzimas mitocondriales, tales como la  $\beta$ -OH-butirato deshidrogenasa y la malato deshidrogenasa (157). En particular, se ha reportado una estimulación de la actividad de la piruvato deshidrogenasa en mitocondrias de hígado (142). En las mitocondrias de testículo, no sabemos de la existencia de algún trabajo que nos informe si estas enzimas se ven afectadas en su actividad. Lo que sí sabemos es que, en presencia de piruvato, se observó una inhibición de la respiración cuando se adicionó DNP al medio de incubación a partir de  $5 \times 10^{-6}$ M. Esta misma observación se ha reportado en espermatozoides de epidídimo de bovino (107,150) y en fragmentos de la región media del espermatozoide (111), atribuyéndose este fenómeno a una inhibición del sistema transportador del piruvato (150). Estas mismas características se han descrito en mitocondria de levaduras (12), de células tumorales (137) y en eritrocitos humanos (58). En estos sistemas, además, se ha sugerido la presencia de un acarreador común para el transporte de piruvato y de lactato. Nuestros estudios preliminares del

efecto del DNP sobre la respiración en la presencia de lactato comparten las mismas características sugeridas para los anteriores sistemas (TABLA VII), en donde se observa una inhibición de la respiración, al igual que sucede con el piruvato. En cambio, en las mitocondrias de hígado y de corazón, se ha observado que el inhibidor del transportador de piruvato  $\alpha$ -ciano-3-hidroxicinamato, inhibe la entrada del piruvato, pero no afecta la entrada del lactato (59,60).

En mitocondrias de testículo observamos cómo este efecto inhibitorio del DNP sobre la respiración sustentada por el piruvato desapareció en la presencia de albúmina, tal como ocurre en los eritrocitos humanos (60) al utilizar un inhibidor específico del transportador del piruvato ( $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinamato). La BSA no elimina el efecto de este inhibidor en mitocondrias de hígado o de corazón (60).

Vandop y cols. (150) al comparar los efectos del DNP y del FCCP sobre la respiración en los espermatozoides de epidídimo de bovino en la presencia de piruvato, observaron que aún a grandes concentraciones de FCCP (hasta 5  $\mu$ M), siempre había una estimulación, a diferencia del efecto inhibitorio producido en la presencia del DNP desde concentraciones de 20  $\mu$ M, por lo que sugirieron que este efecto del 2,4-dinitrofenol está relacionado con el de los inhibidores específicos del translocador del piruvato. Además, al igual que otros (53), han llegado a la conclusión de que el DNP no afecta la piruvato deshidrogenasa tal como se ha reportado en otros sistemas (142). Nosotros, al hacer un estudio preliminar del efecto del FCCP sobre la respiración en las mitocondrias de testículo de rata adulta, observamos que aún

a concentraciones del orden de  $10^{-4}M$ , en presencia de piruvato no logró estimular la respiración basal, a menos que se agregara BSA al medio de incubación (Datos no mostrados).

Al considerar el comportamiento de las preparaciones mitocondriales de testículo en etapas diversas de la espermatogénesis, es fundamental no perder de vista que durante el crecimiento del animal se ha llevado a cabo un cambio anatómico en la ubicación del testículo, que pasa del abdomen al escroto; esta migración se acompaña de una modificación importante en la temperatura a que está expuesto el órgano; de 37 a 33°C (28,45,79). Además, se ha reportado el desarrollo simultáneo de la red vascular que irriga al tejido intersticial, y a pesar de que alcanza su máximo desarrollo en la edad adulta, el tejido intratubular se encuentra en condiciones hipóxicas (47).

El patrón de respiración de las preparaciones mitocondriales obtenido por nosotros en ausencia de sustratos exógenos durante la espermatogénesis, concuerdan con los obtenidos en el tejido testicular completo (42,98,138,143), donde se reportó un  $Q_{O_2}$  mucho mayor en los animales inmaduros. Se ha sugerido que "in vivo", los cambios sobre el consumo de oxígeno están asociados a los niveles de gonadotropinas secretados por la pituitaria (138).

Fukui (50) informó que el testículo inmaduro consume oxígeno a una mayor velocidad que el adulto en la presencia de succinato. En mitocondrias aisladas por nosotros, hemos confirmado esta observación, en donde la velocidad máxima de respiración se dió siempre durante la pubertad con cualquiera de los tres sustratos

utilizados. Sin embargo, la diferencia más marcada se obtuvo con succinato (Fig.10A); esto coincide con el patrón histoquímico y bioquímico de la actividad de la SDH (24,51,125), en donde manifiesta una gran actividad durante la aparición de los espermatozoides primarios y decae durante la espermiogénesis.

En lo que toca al malato, confirmamos la gran capacidad oxidativa por parte de las mitocondrias de testículo. En espermatozoides, la presencia de malato incrementa el porcentaje de piruvato convertido a lactato como un resultado del aumento en la producción de NADH debido a la MDH y un ligero incremento en el flujo del piruvato a través del ciclo de los ácidos tricarbónicos (TCA) (71). Por otro lado, se podría pensar en la posibilidad de que una parte del malato sea transformado a piruvato vía la isoenzima málica, dependiente de NADP<sup>+</sup> específica del testículo, y la dependiente de NAD<sup>+</sup> o NADP<sup>+</sup>, características de tejidos en diferenciación, que también se han encontrado en el testículo (94,117,132). Sin embargo, la relación entre la actividad de la MDH y la enzima málica puede no ser la misma a través de la diferenciación, ya que Aruldhas encontró que a los 60 días de edad, la MDH incrementa en un 50% la actividad encontrada en los animales de 25 días, y baja alrededor de un 30% en los adultos (4). En cambio, la enzima málica fluctúa muy poco. En nuestro estudio, fue evidente que el O<sub>2</sub> sustentado por el malato, mostró un incremento significativo durante la pubertad, y fue descendiendo paulatinamente hasta la edad adulta, lo cual apoyaría la predominancia cuantitativa de la MDH informada por Aruldhas y cols. (4), aunque estos autores midieron las actividades en sobrenadantes de 10 500 g.

El metabolismo del malato está estrechamente relacionado con el del piruvato, no sólo por las vías mitocondriales ya señaladas. Puesto que la MDH se encuentra tanto en el citosol como en la mitocondria, esta enzima se encuentra involucrada en la transferencia de los equivalentes reductores del citosol hacia la mitocondria (13,23,85,153) y en la utilización del oxaloacetato (94), regulando el metabolismo mitocondrial y la oxidación del piruvato a través de modificar la relación extramitocondrial  $NAD^+/NADH$  (71). Sin embargo, la interrelación entre el metabolismo del malato y del piruvato en nuestro estudio también pareció variar durante la diferenciación. Es de subrayar la importancia de la oxidación del malato hasta los 21 días de edad, ya que, aún a concentraciones de 0.6 mM (utilizada para favorecer la entrada del piruvato), se observó un consumo de oxígeno tan considerable, que enmascaró la oxidación del piruvato durante esa etapa (Figs.13A y 13B).

Repetidas veces se ha hablado del papel central del piruvato en la producción de energía por los gametos masculinos en condiciones diversas. En el semen de toro este sustrato se encuentra en grandes cantidades (100). También se sabe que es necesario para la capacitación "in vitro" de los espermias de cobayo (130) y para mantener la viabilidad de los gametos de rata y de ratón (53,145), e indispensable para el desarrollo de las células germinales (14,53,74,109,118). No obstante todos estos datos que señalan la importancia del piruvato, en nuestro trabajo éste fue el sustrato que sustentó en menor medida la respiración.

En las mitocondrias de testículo se han descrito varias opciones para su oxidación sin involucrar el ciclo de los ácidos tricarboxílicos. Estas vías alternas dependen del estado funcional y de los requerimientos energéticos de las células (53,71,111,149). Una de las rutas metabólicas del piruvato de interés especial es su conversión a lactato, donde cobra relevancia la isoenzima LDH-X (lactato deshidrogenasa-X) específica de testículo y de localización intramitocondrial, presente en las mitocondrias pesadas de aspecto atípico a partir de los espermatoцитos primarios paquitenos (24,96,106,159).

En los últimos años, se ha informado que el lactato y el piruvato son esenciales para el desarrollo y la viabilidad de las células germinales (53,54,74,109,118), en donde las células de Sertoli al parecer producen estos metabolitos a partir de la glucosa, liberando éstos al microambiente que rodea a las células germinales (53,74,109).

Existen varios informes que sugieren una competencia entre la reacción catalizada por la LDH-X y el ciclo de los ácidos tricarboxílicos. Por un lado, la isoenzima compete exitosamente por los equivalentes reductores generados por la oxidación del piruvato a través del ciclo (71,140), y por otro, es inhibida por algunos metabolitos del ciclo del TCA, especialmente por el malato y el succinato (6,123). También parece ser que la actividad de esta isoenzima se encuentra regulada por la relación  $NAD^+/NADH$  intramitocondrial (71).

En el presente trabajo no se determinó la actividad de la LDH-X; sin embargo, los experimentos preliminares utilizando lactato, muestran que el patrón de  $O_2$  a través de la

diferenciación, no fué idéntico al del piruvato; sufrió un incremento constante hasta los 40 días de edad, y en edades inferiores a los 24 días, el lactato pareció ejercer un efecto inhibitorio sobre el consumo de oxígeno sustentado por el malato 0.6 mM. Aunque no se llevó a cabo un número suficiente de experimentos utilizando lactato, los valores que se presentan en relación al consumo de oxígeno, fueron menores que los correspondientes de piruvato.

Por otra parte, hay que señalar que además de los caminos arriba detallados, el piruvato es capaz de incorporarse a la carnitina a través de la acetil-Coenzima A para producir acetil carnitina por medio de una reacción catalizada por la CAT (70,71,149). enzima que se manifiesta en forma importante a partir de los 24 días de edad, coincidiendo con la aparición de las espermátidas redondas (101,154).

Esta diversidad de vías metabólicas accesibles al piruvato, podrían explicar los valores bajos del consumo de oxígeno que obtuvimos en nuestros resultados, en comparación con los hallados en la presencia de malato o succinato.

En relación con el efecto del DNP sobre la respiración, los patrones de la respiración desacoplada siguieron de cerca a los de la respiración en el estado 3, sin embargo no alcanzaron consistentemente a éstos últimos. Este fenómeno, pudiera estar asociado con la presencia de canales abiertos  $F_0$ , informada en los mitocondrias de animales adultos (152). Cabe señalar que los valores de "q" (índice de acoplamiento) a través de la diferenciación, fueron más altos que los obtenidos con las

mitocondrias de animales adultos en ausencia de BSA. Todo esto sugiere un proceso de diferenciación funcional de las mitocondrias a lo largo de la espermatogénesis.

Nos parece de interés particular que la inhibición de la respiración sustentada por el piruvato en presencia del DNP se observara en todas las edades, excepto a los 14 días de edad. Este dato apuntaría a la presencia ostensible del acarreador de piruvato, sobre todo a partir de la pubertad, en concierto con el patrón de respiración debida a la oxidación del piruvato ya discutida anteriormente.

Los controles respiratorios que se obtuvieron a través de la diferenciación fluctuaron entre 2.0 y 4.0 sin mostrar un patrón definido. Martino y cols. (99) reportaron valores similares. Las mitocondrias de las células germinales más primitivas parecieron estar más acopladas que las mitocondrias que se obtienen en la edad adulta. Esta afirmación se ve apoyada al observar los valores de "q" (Fig.19), en donde a pesar de que en las mitocondrias de ratas inmaduras se obtuvieron valores de "q" superiores a los de las adultas, nunca se alcanzó el valor de 1.0 reportado para sistemas fuertemente acoplados (90).

En cuanto al efecto de la albúmina sobre el consumo de oxígeno, sólo fue apreciable una pequeña inhibición sobre el estado 4 cuando el sustrato fue el succinato. En cambio, no hubo ninguna acción consistente sobre el estado 3, a excepción de las preparaciones de animales prepúberes.

Ya que la albúmina ha mostrado tener un efecto acoplante en algunos sistemas a través de unir ácidos grasos libres y fosfolípidos (11,17,131), es posible que en el testículo de

animales prepúberes, que se sabe es capaz de utilizar lípidos como fuente de energía (47,91), la albúmina funciona a través de este mecanismo, sin que sea excluyente el efecto protector que se sabe ejerce contra la peroxidación de los lípidos en algunos sistemas (2).

El ATP, sea cual fuese el mecanismo encargado de producirlo, tiene una alta concentración en el testículo (44,105). A través de este trabajo hemos confirmado por medición indirecta, la actividad de la ATP sintetasa en todas las edades estudiadas. Como era de esperarse, su patrón fue similar al del estado 3 de la respiración, obteniendo los valores más altos con succinato como sustrato. En presencia de éste y de malato, la actividad máxima se presentó durante la pubertad, justo cuando existe una gran actividad de síntesis de ácidos nucleicos y de proteínas (1,30,52,66,112). Los valores de la relación ADP/O estuvieron de acuerdo con las cifras teóricas esperadas (116). Los valores correspondientes a los sustratos del sitio I, mostraron a veces desviaciones del valor teórico; estas diferencias podrían explicarse si consideramos que las mitocondrias sufren daños durante su aislamiento. Por otro lado, la heterogeneidad de las preparaciones obtenidas de diversas poblaciones de animales, también podría explicar estas diferencias (38).

La albúmina no modificó la relación ADP/O, lo cual indica que la presencia de ésta no afectó mayormente la entrada ni el metabolismo mitocondrial de los sustratos utilizados.

La afinidad de las mitocondrias de testículo por el ADP ( $K_m = 5.3 \times 10^{-4} M$ ), parece indicar, al igual que en otros

sistemas, que este metabolito juega un papel importante en la regulación de la actividad mitocondrial (19,31,72,113).

En lo que respecta al control de la respiración, en otros sistemas se sabe que en él participa en forma importante la relación ATP/ADP (32,72). En mitocondrias de hígado se demostró que la velocidad de la respiración está determinada por la velocidad de entrada del ADP al interior de la misma, y que se encuentra regulada por la relación extramitocondrial ATP/ADP (32,72). En espermatozoides el control viene a ser ejercido por la motilidad del flagelo y por la producción mitocondrial de ATP. En este sistema, el recambio energético está limitado por la actividad de la ATPasa de la dincina, más que por la capacidad de ejercer la fosforilación oxidativa (10,57). Aún cuando en estas células no ha sido estudiada directamente la participación de la adenín translocasa, se sabe que en las mitocondrias de hígado el control de la respiración está ligado estrechamente tanto con la disponibilidad del ADP, así como con la cinética del acarreador específico (31,32,59,113).

En el sistema testicular se observó un descenso en los valores del control respiratorio sólo en la edad adulta. Pensamos que este descenso puede deberse principalmente al desacoplamiento parcial que presentan estas mitocondrias discutido anteriormente. Sin embargo, no podemos descartar la idea de que pudiera presentarse una falla en la translocasa de adenín nucleótidos, ya que su cinética no ha sido aún estudiada en las mitocondrias de testículo; de hecho, en trabajos futuros será importante definir si en la pendiente negativa que muestran los patrones respiratorios en el estado 3, después de la pubertad, participa

como factor limitante la translocasa de adenin nucleótidos.

Otra posibilidad de control de la velocidad de la respiración es el flujo a través de la cadena respiratoria (64). La citocromo c oxidasa es un complejo enzimático clave en este flujo. Se trata de una proteína ubicua en todas las células aeróbicas. Esta enzima se encuentra insertada en la bicapa lipídica, de la que sólo puede ser liberada por tratamientos con detergentes. Su interacción con los lípidos, particularmente con la cardiolipina, es esencial para su actividad (36,49,67). Se le ha asociado con la velocidad del consumo de oxígeno en algunas mitocondrias en las que la fluidez de la membrana se encuentra alterada (110). Además de estar involucrada en la transferencia de electrones (16), la citocromo c oxidasa funciona como bomba de protones (158), y ambas funciones están acopladas entre sí. Contiene 13 subunidades en las mitocondrias de corazón y 8 en las de levadura, y se ha postulado que requiere de por lo menos 8 subunidades para transferir electrones del citocromo c al oxígeno (53). Se supone que los péptidos "a", "b" y "c" participan en la regulación de su actividad (108). Sólo una parte de la enzima es sintetizada en el citosol. Tres polipéptidos son sintetizados por la propia mitocondria y la síntesis de dos de ellos parece depender de la presencia de oxígeno (103,133). La hipoxia afecta también el ensamblaje de las subunidades que forman la citocromo c oxidasa a través de interferir con la producción de ciertos lípidos, fundamentales para su actividad (36,49,93).

Puede pues concluirse que la actividad de la citocromo c oxidasa es un fenómeno complejo. Además de los factores ya

mencionados, en el huevo no fertilizado del erizo de mar se informó de la existencia de un inhibidor extramitocondrial de la enzima, que desaparece minutos después de la fertilización, y que agregado exógenamente, es capaz de inhibir la actividad enzimática de la citocromo c oxidasa de las mitocondrias de mamífero (97).

En nuestra determinación de la actividad de la citocromo c oxidasa a lo largo de la espermatogénesis, fue muy notable el descenso abrupto observado a partir de la primera edad estudiada. Ignoramos si sea éste el factor limitante de la respiración que pudiera ser responsable de la pendiente negativa observada después de la pubertad, como ignoramos también la causa del descenso en la actividad de la enzima. Consideramos que pueden estar involucrados los factores siguientes:

1. La composición y estructura de la enzima. Dado que en el testículo existe un buen número de isoenzimas diferentes a las enzimas somáticas correspondientes, la citocromo c oxidasa podría no ser una excepción. De hecho, en lo que toca al sustrato de la enzima, en el testículo se han encontrado dos tipos diferentes de citocromo c, denominados I y II, con diferentes propiedades cinéticas y posiblemente también con diferentes propiedades catalíticas (77).

2. Interacción lípido-proteína. En un trabajo anterior de nuestro laboratorio se presentaron evidencias que sugieren que las mitocondrias de testículo en la edad adulta, tienen una menor fluidez en la membrana (152).

3. Bombeo de protones. En el mismo trabajo (152), se sugirió que la membrana mitocondrial del testículo adulto presenta un flujo

de protones al interior a través de canales de protones abiertos. Este fenómeno, en otras mitocondrias, se asocia con un desacoplamiento de la función de la citocromo c oxidasa (93).

4. La hipoxia relativa de las células germinales. Es posible que vaya en aumento conforme las células germinales de formación reciente se alejan de la irrigación sanguínea que llega al tejido intersticial y de este modo afecte el ensamblaje de la citocromo c oxidasa, según se ha descrito en otros sistemas (103,533).

5. Inhibición de la enzima. Es posible que en estas células germinales exista un inhibidor semejante al descrito en el huevo fertilizado del erizo de mar (97).

En trabajos futuros será importante definir cuál o cuales de estas posibilidades participan en el patrón observado en la actividad de la citocromo c oxidasa.

Sea cual fuere el factor limitante de la fosforilación oxidativa a lo largo de la espermatogénesis, resulta evidente del conjunto de datos mostrados en el presente trabajo, la existencia de un proceso de diferenciación funcional, el cual ocurre en forma paralela a la diferenciación morfológica de las mitocondrias de las células germinales. Sin embargo, esto no es excepcional, ya que la literatura científica comienza a acumular evidencias en otros sistemas, que apuntan a procesos de diferenciación mitocondrial, armónicos con los requerimientos energéticos del desarrollo y diferenciación de las células a las que pertenecen (124).

## 5. RESUMEN

Se llevó a cabo el estudio de la fosforilación oxidativa en mitocondrias de testículo de rata en diversas etapas de diferenciación del epitelio germinal.

Para definir las condiciones de ensayo del estudio en cuestión, en mitocondrias de testículo adulto se determinaron las concentraciones saturantes de la respiración correspondientes a los estados 3 y 4 en relación con los sustratos oxidables: succinato, malato y piruvato, y con el ADP.

Una vez determinadas las condiciones experimentales, se midió el consumo de oxígeno y se calcularon los valores de la actividad ATP sintetasa, del control respiratorio y de la relación ADP/O en las mitocondrias de testículo obtenidas en diversas etapas de diferenciación. También se evaluó el efecto de la albúmina y de los desacoplantes sobre la fosforilación oxidativa. Además, se midió la actividad de la citocromo c oxidasa.

Los resultados que se obtuvieron se resumen a continuación:

1. Las mitocondrias de testículo fueron capaces de oxidar al succinato y al malato a cualquiera de las edades utilizadas. El piruvato, solamente a partir de la pubertad. La presencia de BSA al 1% afectó principalmente las preparaciones de animales prepúberes.
2. Se obtuvo un patrón bien definido de la actividad ATP sintetasa. Los valores máximos se dieron durante la prepubertad y la pubertad; éstos fueron más notables al utilizar succinato. La presencia de albúmina en el medio de incubación incrementó dicha

actividad en mitocondrias de animales prepúberes. Los valores de la relación ADP/O estuvieron de acuerdo con las cifras teóricas esperadas, según el sustrato utilizado.

3. Los controles respiratorios fueron relativamente altos a lo largo de la espermatogénesis (2-4), y cayeron en la edad adulta (2), pero no siguieron un patrón definido. La presencia de albúmina no modificó estos valores en forma consistente.

4. El DNP y el FCCP mostraron una respuesta estimulante sobre la respiración en mitocondrias de testículo adulto al utilizar succinato o malato. La presencia de BSA en el medio de aislamiento mejoró las curvas dosis-respuesta de los desacoplates sobre el  $\text{Co}_2$  basal, particularmente al utilizar malato. Asimismo, la albúmina mejoró el índice de acoplamiento "q".

Durante la espermatogénesis, el DNP tuvo un efecto estimulatorio sobre la respiración al utilizar succinato o malato, y fue máximo en las mitocondrias de animales prepúberes. Cuando el sustrato fue piruvato o lactato, el DNP tuvo un efecto claramente inhibitorio sobre la respiración, efecto que desapareció al agregar BSA al 1% en el medio de ensayo.

5. Se registró una gran actividad de la citocromo c oxidasa durante las primeras edades utilizadas; sin embargo, esta actividad cayó abruptamente hasta alcanzar valores constantes a partir de los 21 días de edad.

## 6. CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos, podemos afirmar que la maquinaria metabólica relacionada con el mecanismo de la fosforilación oxidativa se encuentra presente en el testículo desde edades tempranas, teniendo una eficiencia máxima durante la larga profase de la primera meiosis, en donde se sabe que se requiere de una gran cantidad de energía para apoyar la síntesis de macromoléculas. Nosotros encontramos que es en esta etapa cuando se presenta una actividad respiratoria máxima ligada a una gran capacidad de fosforilación (actividad ATP sintetasa). Durante este estadio se sabe, que además de haber una gran proliferación celular, las mitocondrias se multiplican y empieza su proceso de diferenciación morfológica. Sin poder descartar el hecho de que las mitocondrias fueron aisladas de poblaciones celulares heterogéneas, este incremento de la fosforilación oxidativa coincidió con otros cambios metabólicos informados en la literatura (dependencia de sustratos, aparición de isoenzimas específicas, actividades enzimáticas aumentadas, etc.).

En el presente trabajo comprobamos que en forma concomitante a la diferenciación morfológica de las mitocondrias a lo largo de la espermatogénesis, existe un proceso de diferenciación funcional del organelo, relacionado con el proceso de la fosforilación oxidativa. Durante la pubertad, encontramos una gran capacidad oxidativa de las mitocondrias, asociada a una actividad máxima de ATP sintetasa y de citocromo c oxidasa. La simultaneidad en los cambios morfológicos y funcionales, nos sugiere que las alteraciones estructurales que sufren las

mitocondrias de las células germinales durante la espermatogénesis, pueden ser la expresión de modificaciones en el metabolismo energético, sobre todo durante la etapa de la pubertad. Además, de acuerdo con nuestros resultados, hubo un mayor acoplamiento de las mitocondrias en las edades inmaduras, coherente con una mayor eficiencia durante las etapas en que las necesidades energéticas para la proliferación y diferenciación de las células germinales son abundantes.

Lo anterior nos lleva a pensar que gran parte de la energía necesaria para las funciones biosintéticas de las células germinales, se obtiene principalmente a través de la fosforilación oxidativa. Los mecanismos que regulan este proceso a lo largo de la diferenciación del epitelio germinal se desconocen. Todos estos estudios sobre el metabolismo energético testicular nos llevarán en un futuro a comprender mejor el proceso de la espermatogénesis.

## 7. BIBLIOGRAFIA

1. Alemán, V., Trejo, R., Morales, E., Jáuregui-Hernández, P. y Delhumeau-Dngay, G. (1978). A simple and rapid technique to isolate enriched populations of spermatocytes and spermatids from the immature rat testis. *J. Reprod. Fert.* 54, 67.
2. Alvarez, J.G. y Storey, B.T. (1985). Spontaneous lipid peroxidation in rabbit and mouse epididymal spermatozoa: dependence of rate on temperature and oxygen concentration. *Biol. Reprod.* 32, 342.
3. André, J. (1962). Contribution à la connaissance du chondroïme. Etude de ses modifications ultrastructurales pendant la spermatogénèse. *J. Ultrastruct. Res. Suppl.* 3, 1.
4. Aruldas, M.M., Valivullah, H.M., y Govindarajulu, P. (1983). Effect of thyroidectomy on testicular enzymes of the pyruvate/malate cycle involved in lipogenesis. *Biochim. Biophys. Acta* 755, 90.
5. Aruldas, M.M., Valivullah, H.M., Srinivasan, N. y Govindarajulu, P. (1986). Role of thyroid on testicular lipids in prepubertal, pubertal and adult rats. I. Hyperthyroidism. *Biochim. Biophys. Acta* 881, 462.
6. Datellino, L. y Blanco, A. (1970). Catalytic properties of the lactate dehydrogenase isozyme "X" from mouse testis. *J. Exp. Zool.* 174, 173.
7. Bergmeyer, H.U. (1974). Cytochrome oxidase determination, en "Methods of Enzymatic Analysis", vol. III, p. 269, eds. G.W. Lohr y H.D. Waller, 2nd. ed. Academic Press, New York.
8. Blackshaw, A.W. y Samisoni, J.I. (1967). Histochemical localization of some dehydrogenases in bull testis in epididymis. *J. Dairy Sci.* 50, 747.
9. Blackshaw, A.W. y Elkington, J.S.H. (1970). Developmental changes in the lactate dehydrogenase isoenzymes in the testis of immature rat. *J. Reprod. Fert.* 22, 69.
10. Dohnensack, R. y Halangk, W. (1986). Control of respiration and of motility in ejaculated bull spermatozoa. *Biochim. Biophys. Acta* 850, 72.
11. Borst, P., Loos, J.A., Christ, E.J. y Slater, E.C. (1962). Uncoupling activity of long-chain fatty acids. *Biochim. Biophys. Acta* 62, 507.
12. Briquet, M. (1977). Transport of pyruvate and lactate in yeast mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* 459, 290.

13. Brown, T., McLean, P. y Greenbaum, A.L. (1966). Influence of thyroxine and luteinizing hormone on some enzymes concerned with lipogenesis in adipose tissue, testis and adrenal gland. *Biochem. J.* 101, 197.
14. Bucci, L.R., Brock, W.A., Johnson, T.S. y Meistrich, M.L. (1986). Isolation and biochemical studies of enriched populations of spermatogonia and early primary spermatocytes from rat testes. *Biol. Reprod.* 34, 195.
15. Burgos, M.H., Vitale-Calpe, R. y Aoki, A. (1970). *The Testis*, vol. I, p. 551, eds. A.D. Johnson, W.R. Gomes y N.L. VanDemark. Academic Press, London.
16. Capaldi, R.A., Malatesta, F. y Darley-Usmar, V.M. (1983). Structure of cytochrome c oxidase. *Biochim. Biophys. Acta* 726, 134.
17. Chan, S.H.P. y Higgins, E.J. (1978). Uncoupling activity of endogenous free fatty acids in rat liver mitochondria. *Can. J. Biochem.* 56, 111.
18. Chance, B. y Williams, G.R. (1955). A simple and rapid assay of oxidative phosphorylation. *Nature* 175, 1120.
19. Chance, B. y Williams, G.R. (1955). Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 217, 383.
20. Chance, B. y Williams, G.R. (1956). The respiratory chain and oxidative phosphorylation. *Advan. Enzymol.* 17, 65.
21. Chance, B. y Baltscheffsky, M. (1958). Spectroscopic effects of adenosine diphosphate upon the respiratory pigments of rat-heart-muscle sarcosome. *Biochem. J.* 68, 285.
22. Chance, B. y Hagihara, B. (1961). 5th. International Congress of Biochemistry, Moscow, URSS, p. 3.
23. Chappell, J.B. (1968). Systems used for the transport of substrates into mitochondria. *Brit. Med. Bull.* 24, 150.
24. Clausen, J. (1969). Lactate dehydrogenase isoenzymes of sperm cells and testes. *Biochem. J.* 111, 207.
25. Clermont, Y. y Perey, E. (1957). Quantitative study of the cell populations of the seminiferous tubules in immature rats. *Am. J. Anat.* 100, 241.
26. Clermont, Y. y Harvey, S.C. (1965). Duration of the cycle of the seminiferous epithelium of normal, hypophysectomized and hypophysectomized hormone-treated albino rats. *Endocrinol.* 76, 80.
27. Clermont, Y. (1972). Kinetics of spermatogenesis in mammals: Seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal.

28. Courot, M., Hochereau-de Reviers, M.T. y Ortavant, R. (1970). Spermatogenesis, en "The Testis", vol. I, p. 339, eds. A.D. Johnson, W.R. Gomes y N.L. VanDemark. Academic Press, London.

29. Cross, E.A. y Silver, I.A. (1962). Neurovascular control of oxygen tension in the testes and epididymis. J. Reprod. Fert. 3, 377.

30. Davis, J.R. y Langford, A. (1970). Testicular proteins, en "The Testis", vol. II, p. 259, eds. A.D. Johnson, W.R. Gomes y N.L. VanDemark. Academic Press, New York.

31. Davis, E.J., Lumerq, L. y Bottoms, D. (1974). On the relationships between the stoichiometry of oxidative phosphorylation and the phosphorylation potential of the rat liver mitochondria as functions of respiratory rate. FEBS lett. 39, 9.

32. Davis, E.J. y Davis-van Thienen, W.I.A. (1978). Control of mitochondrial metabolism by the ATP/ADP ratio. Biochem. Biophys. Res. Commun. 83, 1260.

33. Day-Francesconi, M. y Casillas, E.R. (1982). The intracellular localization and properties of carnitine acetyltransferase from ram spermatozoa. Arch. Biochem. Biophys. 215, 206.

34. Delhumeau-Ongay, G., Vázquez-Memije, M.E., Montalvo, I. y Setelo, A. (1981). Daño producido en la función mitocondrial de testículo por la ingestión de harina de semilla de algodón (HSA). Rev. Soc. Quím. Mex. 25, 166.

35. Delhumeau-Ongay, G., Trejo, R., Alonso, R. y Hernandez-Montes, H. (1982). Differential gene expression of mitochondrial enzymes in isolated leptotene and postleptotene rat testis germ cells. 12th. International Congress of Biochemistry, Perth, Australia, p. 95.

36. Denes, A.S. y Stanacov, N.Z. (1979). Thermally induced changes in reconstituted and membranes cytochrome c oxidase. Can. J. Biochem. 57, 238.

37. Dills, W.L., Bell, L.S. y Onuma, E.K. (1981). Inhibitory effects of substrate analogs on lactate production from fructose and glucose in bovine spermatozoa. Biol. Reprod. 25, 456.

38. Duszynski, J. y Wojtczak, L. (1985). The apparent non-linearity of relationship between the rate of respiration and the protonmotive force of mitochondria can be explained by heterogeneity of mitochondrial preparations. FEBS lett. 182, 243.

39. Estabrook, R.W. (1967). General techniques for the measurement of oxidative and phosphorylation reactions, en "Methods in Enzymology", vol. X, p. 41, eds. R.W. Estabrook y N.E. Pullman. Academic Press, New York.

40. Ekwall, H., Jansson, A., Sjöberg, P. y Ploen, L. (1984). Differentiation of the rat testis between 20 and 120 days of age. *Arch. Androl.* 13, 27.
41. Fawcett, D.W. (1970). A comparative view of sperm ultrastructure. *Biol. Reprod. Suppl.* 2, 90.
42. Featherstone, R.M., Nelson, W.O., Weiden, F., Marberger, E., Boccabella, A. y Boccabella, R. (1955). Pyruvate oxidation in testicular tissue during furadoxyl-induced spermatogenic arrest. *Endocrinol.* 56, 727.
43. Ford, E. y Huggins, C.J. (1963). Selective destruction in testis induced by 7,12-dimethylbenz(a)anthracene. *J. Exp. Med.* 118, 27.
44. Ford, W.C.L. y Harrison, A. (1981). The role of oxidative phosphorylation in the generation of ATP in human spermatozoa. *J. Reprod. Fert.* 63, 271.
45. Free, M.J. y VanDemark, N.L. (1968). Gas tensions in spermatic and peripheral blood of rats with normal and heat treated testes. *Am. J. Physiol.* 214, 863.
46. Free, M.J. y VanDemark, N.L. (1969). Radiorespirometric studies on glucose metabolism in testis tissue from rat, rabbit and chicken. *Comp. Biochem. Physiol.* 30, 323.
47. Free, M.J. (1970). Carbohydrate metabolism, en "The Testis", vol. II, p 125, eds. A.D. Johnson, W.R. Gomes y N.L. VanDemark. Academic Press, London.
48. Fritz, I.B. (1973). Selected topics on the biochemistry of spermatogenesis, en "Current Topics in Cell Regulation", vol. VII, p. 127, eds. E.L. Horecker y E.R. Stadtman. Academic Press, New York.
49. Fry, M. y Ghee, D.E. (1980). Cardiolipin requirement by cytochrome oxidase and the catalytic role of phospholipids. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 93, 1238.
50. Fukui, T. (1965). Study on metabolism of the testis in rats. *Acta Urol. Japan* 11, 877.
51. Gaździk, T., Kaminski, M., Plewka, D. y Plewka, A. (1986). Evaluation of localization and intensity of the reactions of succinic dehydrogenase in developing rat testis. I. Physiological conditions. *Acta histochem.* 78, 1.
52. Geremia, R., Bortani, C., Conti, M. y Monesi, V. (1977). RNA synthesis in spermatocytes and spermatids and preservation of meiotic RNA during spermiogenesis in the mouse. *Cell differentiation.* 5, 343.

53. Grootegoed, J.A., Jansen, R. y Van der Molen, H.J. (1984). The role of glucose, pyruvate and lactate in ATP production by rat spermatozoans and spermatids. *Biochim. Biophys. Acta* 767, 248.
54. Grootegoed, J.A., Jansen, R. y Van der Molen, H.J. (1986). Effect of glucose on ATP dephosphorylation in rat spermatids. *J. Reprod. Fert.* 77, 99.
55. Hackenbrock, C.R. (1966). Ultrastructural bases for metabolically linked mechanical activity in mitochondria. I. Reversible ultrastructural changes with changes in metabolic steady state in isolated liver mitochondria. *J. Cell Biol.* 30, 269.
56. Hagihara, B. (1961). Techniques for the application of polarography to mitochondrial respiration. *Biochim. Biophys. Acta* 46, 134.
57. Halang, W., Bohnsack, R. y Kunz, W. (1985). Interdependence of mitochondrial ATP production and extramitochondrial ATP utilization in intact spermatozoa. *Biochim. Biophys. Acta* 808, 316.
58. Halestrap, A.P. y Denton, R.M. (1974). Specific inhibition of pyruvate transport in rat liver mitochondria and human erythrocytes by alpha-cyano-4-hydroxycinnamate. *Biochem. J.* 136, 313.
59. Halestrap, A.P. (1975). The mitochondrial pyruvate carrier. Kinetics and specificity for substrates and inhibitors. *Biochem. J.* 148, 85.
60. Halestrap, A.P. y Denton, R.M. (1975). The specificity and metabolic implications of the inhibition of pyruvate transport in isolated mitochondria and intact tissue preparations by alpha-cyano-4-hydroxycinnamate and related compounds. *Biochem. J.* 148, 87.
61. Hall, F.F. (1970). *The Testis*, vol. II, p. 2, eds. A.D. Johnson, W.R. Gomes y N.L. VanDemark. Academic Press, London.
62. Hammerstedt, R.H. y Lardy, H.A. (1983). The effect of substrate cycling on the ATP yield of sperm glycolysis. *J. Biol. Chem.* 258, 9759.
63. Hartree, E.F. (1972). Determination of proteins: A modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Analytical Biochem.* 48, 422.
64. Hatefi, Y. (1985). The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system. *Ann. Rev. Biochem.* 54, 1015.
65. Hayashi, J.I. (1980). A general characteristic of tumor mitochondria: leakage of endogenous  $Mg^{2+}$  on incubation with uncoupler and resultant reduction of uncoupler stimulated ATPase

activity. Arch. Biochem. Biophys. 205, 27.

66. Hecat, N.B. y Liem, H. (1984). Mitochondrial DNA is synthesized during meiosis and spermiogenesis in the mouse. Exp. Cell Res. 154, 293.

67. Hegner, D. (1980). Age-dependence of molecular and functional changes in biological membrane properties. Mech. Aging Develop. 14, 101.

68. Hollinger, M.A. y Davis, J.R. (1968). Aerobic metabolism of uniformly labelled ( $^{14}\text{C}$ )-glucose in tissue slices of rat testis. J. Reprod. Fert. 17, 343.

69. Hooker, C.W. (1970). The Testis, vol. I, p. 483, eds. A.D. Johnson, W.R. Gomes y H.L. VanDemark. Academic Press, London.

70. Hutson, W.M., VanDop, C. y Lardy, H.A. (1977). Metabolism of pyruvate and carnitine esters in bovine epididymal sperm mitochondria. Arch. Biochem. Biophys. 181, 345.

71. Hutson, S.M., VanDop, C. y Lardy, H.A. (1977). Mitochondria metabolism of pyruvate in bovine spermatozoa. J. Biol. Chem. 252, 1309.

72. Jacobus, W.E., Moreadith, R.W. y Vandegaer, K.M. (1982). Mitochondrial respiratory control. Evidence against the regulation of respiration by extramitochondrial phosphorylation potentials or by ATP/ADP ratios. J. Biol. Chem. 257, 2397.

73. Joel, C.D., Neaves, W.B. y Rabb, J.M. (1967). Mitochondria of brown fat: Oxidative phosphorylation sensitive to 2,4-dinitrophenol. Biochem. Biophys. Res. Commun. 29, 490.

74. Jutte, H.H.P.M., Grootegoed, J.A., Kommerst, F.F.G. y Van der Molen, H.J. (1981). Exogenous lactate is essential for metabolic activities in isolated rat spermatocytes and spermatids. J. Reprod. Fert. 62, 399.

75. Kaschnitz, R.M., Hatofi, Y. y Morris, H.P. (1976). Oxidative phosphorylation properties of mitochondria isolated from transplanted hepatoma. Biochim. Biophys. Acta 449, 224.

76. Keyhani, F. y Storey, B.T. (1973). Energy conservation capacity and morphological integrity of mitochondria in hypotonically treated rabbit epididymal spermatozoa. Biochim. Biophys. Acta 305, 557.

77. Kim, I.C. (1980). Isolation and properties of somatic and testicular cytochromes c from rat tissues. Arch. Biochem. Biophys. 203, 519.

78. Kolarov, J., Kuzela, S., Krempasky, V. y Ujhazy, V. (1973). Some properties of coupled hepatoma mitochondria exhibiting uncoupler-

insensitive ATPase activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 55, 1173.

79. Kormond, M. (1967). Developmental of the rectum-testis temperature difference in the post-natal rat. *J. Reprod. Fert.* 14, 427.

80. Lacy, D. (1962). Certain aspects of testis structure and function. *Brit. Med. Bull.* 18, 205.

81. Lacy, D., Lofts, B., Kinson, G., Hopkins, D. y Dott, H. (1965). Sertoli cells and steroid synthesis. *Gen. Comp. Endocrinol.* 5, 673.

82. La Noue, K.F. y Tischler, M.E. (1976). Mitochondrial Bioenergetics, biogenesis and membrane structure, p. 61, eds. L. Parcker y A. Gómez Puyou. Academic Press, New York.

83. Lardy, H.A. y Wellman, H. (1952). Oxidative phosphorylation: Role of inorganic phosphate and acceptor systems in control of metabolic rates. *J. Biol. Chem.* 195, 215.

84. Leblond, C.P. y Clermont, Y. (1952). Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 55, 548.

85. Lee, Y.P. y Lardy, H.A. (1965). Influence of thyroid hormones on L- $\alpha$ -glycerophosphate dehydrogenases in various organs of the rat. *J. Biol. Chem.* 240, 1427.

86. LeGrand, C.C. (1970). The Testis, vol. III, p. 333, eds. A.D. Johnson, W.R. Gomes y N.L. VanDemark. Academic Press, London.

87. Lehninger, A.L. (1970). *Biochemistry*. Ed. Omega, 2nd. ed. Barcelona, España. p. 469.

88. Leiderman, B. y Mancini, R.E. (1968). Aerobic and anaerobic lactate production in the prepuberal and adult rat testis. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 128, 818.

89. Leiderman, B. (1969). Consumo de oxígeno y producción de ácido láctico de células germinales aisladas "in vitro" de testículo de rata. *Rev. Soc. Argon. Biol.* 45, 57.

90. Lomasiers, J.J. y Billica, W.H. (1981). Non-equilibrium thermodynamics of oxidative phosphorylation by inverted inner membrane vesicles of rat liver mitochondria. *J. Biol. Chem.* 256, 12949.

91. Lin, C.H. y Fritz, I.B. (1972). Studies on spermatogenesis in rats. IV. Rates of oxidation of palmitate and pyruvate by various testicular cell populations. *Can. J. Biochem.* 50, 763.

92. Lindemeyer, G.E., Sordahl, L.A. y Schwatz, A. (1968). Reevaluation of oxidative phosphorylation in cardiac mitochondria

from normal animals and animals in heart failure. *Circulation Res.* 23, 439.

93. Linnanc, A.W. y Crowfoot, P.D. (1975). Biogenesis of the yeast mitochondrial membranes, en "Membranes Biogenesis. Mitochondria, chloroplast, and bacteria", p. 99, ed. A. Tzagalloff. Plenum Press, New York.

94. Lunaas, T., Baldwin, R.L. y Cupps, P.T. (1968). Level of certain soluble dehydrogenases in the rat testis and epididymis. *J. Reprod. Fert.* 17, 177.

95. Machado De Domenech, E., Domenech, C.E. y Blanco, A. (1970). Distribution of lactate dehydrogenase isozymes in subcellular fractions of rat tissues. *Arch. Biochem. Biophys.* 141, 147.

96. Machado De Domenech, E., Domenech, C.E., Eoki, A. y Blanco, A. (1972). Association of the testicular lactate dehydrogenase isozyme with a special type of mitochondria. *Biol. Reprod.* 6, 136.

97. Maggio, R. y Monroy, A. (1959). An inhibitor of cytochrome oxidase activity in sea urchin egg. *Nature* 184, 68.

98. Martino, C. De., Stefanini, M., Floridi, A., Marcante, M.L., Arestini, A. y Morelli, M. (1974). Morphological and functional modifications of mitochondrion in the rat germ cells. *J. Submicrosc. Cytol.* 6, 115.

99. Martino, C. De., Floridi, A., Marcante, M.L., Malorni, W., Ecorza, B.P., Bellocchi, M. y Silverstrini, B. (1979). Morphological, histochemical, and biochemical studies on germ cells mitochondria of normal rats. *Cell Tissue Res.* 196, 1.

100. Mann, T. (1964). *The Biochemistry of Semen and of the Male Reproductive Tract.* Ed. John Wiley & Sons, New York. pp. 17-37, 79-100.

101. Marquis, N.R. y Fritz, I.B. (1965). The distribution of carnitine, acetylcarnitine, and carnitine acetylcarnitine transferase in rat tissue. *J. Biol. Chem.* 240, 2193.

102. Marquis, N.R. y Fritz, I.B. (1965). Effects of testosterone on the distribution of carnitine, acetylcarnitine, and carnitine acetyltransferase in tissue of the reproductive system of the male rat. *J. Biol. Chem.* 240, 2197.

103. Mason, T.L. y Schatz, G. (1973). Cytochrome c oxidase from Baker's yeast. II. Site of translation of the protein components. *J. Biol. Chem.* 248, 1355.

104. Massie, E.D. (1968). Thyroid hormone effects on testicular metabolism and function. M.S. Thesis. Ohio State University.

105. Means, A.R. y Hall, P.F. (1968). Protein biosynthesis in the

testis. II. Role of ATP in stimulation by glucose. *Endocrinol.* 83, 86.

106. Meistrich, M.L., Trostle, P.K., Frapart, M. y Erickson, R.P. (1977). Biosynthesis and localization of lactate dehydrogenase X in pachytene spermatocytes and spermatids of mouse testes. *Develop. Biol.* 60, 428.

107. Melrose, D.R. y Turner, C. (1953). The metabolism of pyruvate in bull spermatozoa. *Biochem. J.* 53, 296.

108. Merle, P. y Kadenbach, B. (1982). Kinetic and structural differences between cytochromes c oxidases from beef liver and heart. *Eur. J. Biochem.* 125, 239.

109. Mita, M. y Hall, P.F. (1982). Metabolism of round spermatids from rats: lactate as the preferred substrate. *Biol. Reprod.* 26, 445.

110. Mitchell, P. y Moyle, J. (1967). Acid-base titration across the membrane system of rat-liver mitochondria. *Biochem. J.* 104, 588.

111. Mohri, H., Mohri, T. y Ernster, L. (1965). Isolation and enzymic properties of the midpiece of bull spermatozoa. *Exp. Cell Res.* 38, 217.

112. Monesi, V. (1976). Nucleoprotein synthesis in spermatogenesis, en "Male Fertility and Sterility", eds. R.E. Mancini y L. Martini. Academic Press, New York.

113. Moreno-Sánchez, R. (1983). Inhibition of oxidative phosphorylation by a  $Ca^{2+}$ -induced diminution of the adenine nucleotide translocator. *Biochim. Biophys. Acta* 724, 278.

114. Motta, N., Collu, R. y Martini, L. (1973). Mechanisms with control puberty in males, en "The Endocrine Function of the Human Testis", vol. I, p. 371, eds. V.H.T. James, M. Sirio y L. Martini. Academic Press, New York.

115. Mounib, M.S. (1967). Metabolism of pyruvate in testes of fish and rabbits with particular reference to p-nitrophenol and 2,4-dinitrophenol. *Comp. Biochem. Physiol.* 22, 539.

116. Myers, P.K. y Slater, E.C. (1957). The enzymic hydrolysis of adenosine triphosphate by liver mitochondria. I. Activities at different pH values. *Biochem. J.* 67, 558.

117. Nagel, H.O., Dauch, R.T. y Sauer, L.A. (1980). Mitochondrial malic enzymes. An association between  $NAD(P)^{+}$ -dependent malic enzyme and cell renewal in Sprague-Dawley rat tissue. *J. Biol. Chem.* 255, 3819.

118. Nakamura, M., Okinaga, S. y Arai, K. (1986). Studies of metabolism of round spermatids: glucose as unfavorable substrate.

119. Nemat-Gorgani, N., Jalilvand, F. y Meisanni, E. (1985). Deficient lipid-protein interaction in mitochondrial cytochrome oxidase from newborn and old rat brain. *Develop. Brain. Res.* 12, 121.
120. Papa, S. y Paradies, G. (1974). On the mechanism of translocation of pyruvate and others monocarboxylic acids in rat liver mitochondria. *Eur. J. Biochem.* 49, 265.
121. Pedersen, P.L. y Morris, H.P. (1974). Uncoupler-stimulated adenosine triphosphatase activity. Deficiency in intact mitochondria from Morris hepatomas and ascites tumor cells. *J. Biol. Chem.* 249, 3327.
122. Peter, J.B. y Lee, L.D. (1967). Characteristic of skeletal muscle mitochondria isolated by a new improved technique. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 29, 430.
123. Peterson, R.N. y Freund, M. (1974). Citrate formation from exogenous substrate by washed human spermatozoa. *J. Reprod. Fert.* 35, 73.
124. Pollard, J.K. y Sulton, R. (1980). The differentiation of animal mitochondria during development. *Trends in Biochem. Sci.* 5, 23.
125. Pósalaky, Z. (1965). Activity of different dehydrogenases and diaphorases in the spermatogenesis of the rat, and its relation to motility. *Acta histochem.* 20, 86.
126. Potter, van R., Siekevitz, P. y Simonson, H.C. (1953). Latent ATPase activity in resting rat liver mitochondria. *J. Biol. Chem.* 205, 893.
127. Reddy, J.K. y Svoboda, D.J. (1967). Peroxidase transport by Sertoli cells of the rat testis. *J. Cells Biol.* 35, 184A.
128. Reyes, J. y Benos, D.J. (1984). Changes in interfacial potentials induced by carbonylcyanidodiphenylhydrazine uncouplers: Possible role in inhibition of mitochondrial oxygen consumption and other transport processes. *Memb. Biochem.* 5, 243.
129. Robinson, J.B. y Scere, P.A. (1985). Organization of Krebs tricarboxilic acid cycle enzymes in mitochondria. *J. Biol. Chem.* 260, 10800.
130. Rogers, B.J. y Yanagimachi, R. (1975). Retardation of guinea pig sperm acrosome reaction by glucose: The possible importance of pyruvate and lactate metabolism in capacitation and the acrosome reaction. *Biol. Reprod.* 13, 568.
131. Samuel, H.P. y Higgins, E. (1978). Uncoupling activity of endogenous free fatty acids in rat liver mitochondria. *Can. J.*

Biochem. 56, 111.

132. Bauer, L.A., Dauchy, R.T., Nagel, W.O. y Morris, H.P. (1980). Mitochondrial NAD(P)<sup>+</sup> dependent malic enzyme activity and malate-dependent pyruvate formation are progression-linked in Morris hepatomas. *J. Biol. Chem.* 255, 3844.

133. Schatz, G. y Mason, T.L. (1974). The biosynthesis of mitochondrial proteins. *Ann. Rev. Biochem.* 50, 51.

134. Serfaty, A. y Boyer, J. (1956). L'influence de divers métabolites glucidiques sur l'intensité respiratoire du testicule de rat blanc. *Experientia* 12, 386.

135. Setchell, B.P. y Hinks, N.T. (1967). The importance of glucose in the oxidative metabolism of the testis of the conscious ram, and the role of the pentose cycle. *Biochem. J.* 102, 623.

136. Sordahl, L.A., Blailock, Z.R., Liebelt, A.G., Kraft, G.H. y Schwatz, A. (1969). Some ultrastructural and biochemical characteristics of tumor mitochondria isolated in albumin-containing media. *Cancer Res.* 29, 2002.

137. Spencer, T.L. y Lehninger, A.L. (1976). L-lactate transport in Ehrlich ascites tumor cells. *Biochem. J.* 154, 405.

138. Steinberger, E. y Wagner, C. (1961). Observations on the endogenous respiration of rat testicular tissue. *Endocrinol.* 69, 305.

139. Steinberger, E. (1971). Hormonal control of mammalian spermatogenesis. *Physiol. Rev.* 51, 1.

140. Sutter, D., Chow, P.Y.W. y Martin, I.C.A. (1979). Maintenance of motility in human spermatozoa by energy derived through oxidative phosphorylation and addition of albumin. *Biol. Reprod.* 20, 505.

141. Tarjan, E.M. y Korff, R.W. (1967). Factors affecting the respiratory control ratio of rabbit heart mitochondria. *J. Biol. Chem.* 242, 316.

142. Taylor, S.I., Mukherjee, C. y Jungas, R.L. (1975). Regulation of pyruvate dehydrogenase in isolated rat liver mitochondria. *J. Biol. Chem.* 250, 2028.

143. Tepperman, J., Tepperman, H.M. y Dick, H.J. (1949). A study of the metabolism of rat testis "in vitro". *Endocrinol.* 45, 491.

144. Terada, H. (1981). The interaction of highly active uncouplers with mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* 639, 225.

145. Tsuruda, Y. y Chang, M.C. (1975). In vitro fertilization of rat and mouse eggs by ejaculated sperm and the effect of energy sources on "in vitro" fertilization of rat eggs. *J. Exp. Zool.*

146. Tuena De Gómez Puyou, M. y Gómez Puyou, A. (1986). Mensaje Bioquímico, vol. IX, p. 77, eds. S. Jimenez Thomas, Saldafia De Delgadillo y A. Cárabez Trejo. Dpto. de Bioquímica. Facultad de Medicina. UNAM. México.

147. Umbreit, J. y Burris, R.H. (1957). Manometric Techniques. Burgess Publishing Co., Minneapolis, USA. 3rd. ed.

148. VanDam, K. (1967). The inhibitory effect of uncouplers of oxidative phosphorylation on mitochondrial respiration. Biochim. Biophys. Acta 131, 407.

149. VanDop, C., Hutson, S.M. y Lardy, H.A. (1977). Pyruvate metabolism in bovine epididymal spermatozoa. J. Biol. Chem. 252, 1303.

150. VanDop, C., Hutson, S.M. y Lardy, H.A. (1978). Selective inhibition of pyruvate and lactate metabolism in bovine epididymal spermatozoa by dinitrophenol and alfa-cyano-3-hydroxycinnamate. Arch. Biochem. Biophys. 187, 235.

151. Vázquez-Memije, M.E., Cárabez-Trejo, A., Gallardo-Trillanes, G. y Delhumeau-Ongay, G. (1984). Loose binding of testicular mitochondrial ATPase to the inner membrane. Arch. Biochem. Biophys. 232, 441.

152. Vázquez-Memije, M.E., Izquierdo-Reyes, V. y Delhumeau-Ongay, G. (1988). On the insensitivity to uncouplers of testis mitochondrial ATPase. Arch. Biochem. Biophys. 260, (en prensa).

153. Vermouth, N.T., Carriazo, C.S., Ponce, R.H. y Blanco, A. (1986). Lactate dehydrogenase-X, malate dehydrogenase and total protein in rat spermatozoa during epididymal transit. Comp. Biochem. Physiol. 93B, 381.

154. Vernon, R.G., Go, V.L.W. y Fritz, I.B. (1971). Studies on spermatogenesis in rats. II. Evidence that carnitine acetyltransferase is a marker enzyme for the investigation of germ cell differentiation. Can. J. Biochem. 49, 761.

155. Vilar, O., Pérez del Cerro, M.I. y Mancini, R.E. (1962). The Sertoli cells as a bridge cell between the basal membrane and the germinal cells. Exp. Cell Res. 27, 158.

156. Voglmayr, J.K. (1975). Metabolic changes in spermatozoa during epididymal transit, en "Handbook of Physiology, Section F, Endocrinology", vol. V, p. 437, eds. D.W. Hamilton y R.O. Greep. American Physiological Society, Washington, D.C.

157. Wedding, R.T., Hansch, C. y Fukuto, T.R. (1967). Inhibition of malate dehydrogenase by phenols and the influence of ring substituents of their inhibitory effectiveness. Arch. Biochem. Biophys. 121, 9.

158. Wikstrom, M., Krab, K. y Saraste, M. (1981). Proton-translocating cytochrome complexes. *Ann. Rev. Biochem.* 50, 623.

159. Ziniham, W.H., Bianco, A. y Clowry, L.J. (1964). An unusual isozyme of lactate dehydrogenase in mature testes: localization, ontogeny and kinetics properties. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 121, 571.