

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

00662

2

12

ESTUDIOS SOBRE LA ATPasa MITOCONDRIAL
DE TESTICULO DE RATA

Tesis, que para obtener el grado de
Maestra en Ciencias Químicas (Bio-
química) presenta

Marta Elisa Vázquez Memije

1984

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

INDICE

	Página
Introducción General-----	1
Trabajo 1: "Loose Binding of Testicular Mitochondrial ATPase to The Inner Membrane"-----	9
Trabajo 2: "Insensibilidad de la ATPasa mitocondrial de testículo de rata hacia agentes desacoplantes de la fosforilación oxidativa".-----	38
Discusión General-----	69
Resumen y Conclusiones-----	76
Bibliografía-----	78

INTRODUCCION

El testículo es un órgano del aparato reproductor masculino que se considera como una glándula mixta, ya que posee tejido exócrino y endócrino. Está constituido por túbulos seminíferos y por tejido intertubular, cubiertos por la túnica albugínea. En las células de Leydig del tejido intertubular se realiza la parte más conocida de su función endócrina, esto es, la producción de los esteroides andrógenos: testosterona, androsterona y dehidroepiandrosterona (Hooker, 1970). El tejido intertubular está irrigado por vasos sanguíneos y linfáticos y posee dos capas de tejido conectivo separadas por dos fases coloidales que contienen glicoproteínas, ácido hialurónico, condroitín sulfato y fibras de colágena; la primera fase constituye la membrana basal de los túbulos seminíferos (Mancini y col., 1962; Clermont, 1958; Schmidt, 1964).

Los túbulos seminíferos constituyen la porción exócrina del testículo. Están limitados por el complejo laminar basal, carecen tanto de vasos sanguíneos como linfáticos y por lo tanto tienen una hipoxia relativa (Free y VanDemark, 1968) y una secreción de tipo holócrino, cuyo producto final de exportación está constituido principalmente por los espermatozoides y el fluido testicular que los acompaña (Setchell, 1970).

En el interior de los túbulos seminíferos se encuentran las células de Sertoli o células nutricias y las células del epitelio germinal. La diferenciación de

éstas constituye el proceso de la espermatogénesis

Las células de Sertoli se encuentran en contacto con la membrana basal y representan del 15 al 20% de la población celular del testículo. Tienen una gran actividad fagocítica, se les ha atribuido una función endócrina (Lacy, 1962; Lacy y Lofts, 1962; Lacy y col., 1965; Bishop, 1954) y la distribución peculiar de su citoplasma, que literalmente "abrazca" a las células germinales ha hecho pensar que juegan un papel fundamental en la diferenciación de las mismas (Vilar y col., 1962; Firlit y Davis, 1965) y también en el mecanismo de expulsión de los espermatozoides (Eurgos y Vitale, 1967).

Las células del epitelio germinal reciben diversos nombres de acuerdo con su estadio de diferenciación: espermatogonias, espermatoцитos de primero y segundo orden y espermátidas.

El metabolismo del testículo adulto posiblemente represente el de las células más numerosas que son las más diferenciadas (espermatoцитos y espermátidas), situadas en la parte más interna de los túbulos seminíferos. La hipoxia relativa de esta zona (Free y VanDemark, 1968), ha sugerido que estas células utilizan para su función energética, preferentemente la glicólisis. De hecho, el testículo adulto produce una cantidad considerable de lactato a partir de glucosa, tanto en condiciones anaeróbicas (Dickens, 1931; Härkönen, 1971) como aeróbicas (Dickens, 1931; Hollinger, 1968; Leiderman y Mancini, 1968).

El testículo maduro depende fundamentalmente de la glucosa exógena para mantener su metabolismo energético (Free, 1970). Si se incuba in vitro testículo adulto en ausencia de glucosa, decaen rápidamente tanto el consumo de oxígeno (Free, 1970) como los niveles de ATP (Means y Hall, 1968). En cambio su adición estimula a ambos (Free, 1970; Means y Hall, 1968) y además aumenta la velocidad de incorporación de aminoácidos a proteínas (Davis y Morris, 1963).

En el curso de su maduración el testículo modifica numerosos aspectos de su metabolismo energético. Hay muchas enzimas que manifiestan su actividad por primera vez en el testículo (o la modifican) a partir de la aparición de los espermatoцитos primarios postleptotenos (Bishop, 1969). Una buena parte de ellas son isoenzimas con características diferentes a las de otros tejidos. Tal es el caso de la hexocinasa (Hilford, 1968; Katzen, 1966; Sosa y col., 1972), fosfofructocinasa (Hoskins y col., 1969), deshidrogenasa láctica asociada a mitocondrias pesadas (Machado de Domenech y col., 1972), deshidrogenasa isocítrica, citrato sintetasa y deshidrogenasa láctica (DeBummeau-Ongay y col., 1982).

En lo que se refiere al ATP, sea cual fuere la maquinaria encargada de producirlo, es eficiente, ya que en condiciones normales su concentración es 2.5 mM y a los dos minutos de interrumpir el aporte sanguíneo al testículo su concentración es aún de 2.5 mM (Härkönen y Kormano, 1971). Es notable, sin embargo, que al incubarlo in vitro desaparezca rápidamente (Härkönen y Kormano, 1971; Means y Hall, 1968).

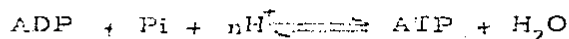
Considerando que la concentración de un metabolito en un momento dado depende del equilibrio entre su formación y su destrucción, como un enfoque inicial al problema Delhumeau-Ongay y col. (1973), estudiaron la capacidad del testículo de la rata para hidrolizar ATP in vitro. Encontraron que es elevada (0.5 μ moles de Pi/min/mg proteína) y que se debe a una o varias ATPasas dependientes de Ca^{++} o Mg^{++} , no estimulable por Na^{+} o K^{+} y que no muestra sensibilidad detectable a ouabaina. Es capaz de hidrolizar, aunque en menor grado, al GTP, CTP, y UTP.

Con el objeto de definir la localización intracelular de la actividad enzimática, se llevó a cabo un fraccionamiento de partículas subcelulares por centrifugación diferencial de testículo adulto. Todas las fracciones, excepto el citosol, mostraron actividad de ATPasa, siendo la mitocondrial y la microsomal de actividad específica comparable (Vázquez-Morales, M. E., 1974).

En este punto, es importante señalar que estudios morfológicos de las mitocondrias testiculares hechos con microscopía electrónica indican que a partir del estadio de espermatogonias, las mitocondrias de las células del epitelio germinal comienzan a mostrar una diferenciación importante. Las crestas se pliegan hacia el borde externo, dando a los organelos una apariencia vacuolada. Simultáneamente, comienzan a organizarse y en los espermatoцитos secundarios y espermátidas tempranas las mitocondrias aparecen en hileras perfectamente ordenadas formando internamente la membrana plasmática (André, 1962). Más adelante se irán condensando y al formarse el espermatozoide se encontrarán localizadas en la pieza media de éste formando

una espiral sin perder su estructura vesiculada característica (André, 1962; De Martino y col., 1979).

Por otro lado, es bien sabido que el ATP es producido en las mitocondrias por el mecanismo de conservación de energía llamado fosforilación oxidativa, que se realiza por el acoplamiento de dos bombas de protones, situadas en la membrana interna. Al oxidarse un sustrato para producir ATP, la bomba de protones redox, que alterna acarreadores de electrones y de protones, pasa a aquéllos al interior de la mitocondria y a los protones los lanza al exterior, al espacio intermembranal. De esta manera se crea un potencial de membrana y una diferencia de pH. Esta fuerza protomotriz es usada por la segunda bomba de protones, que forma parte de la ATPasa mitocondrial, para sintetizar ATP, según la reacción:

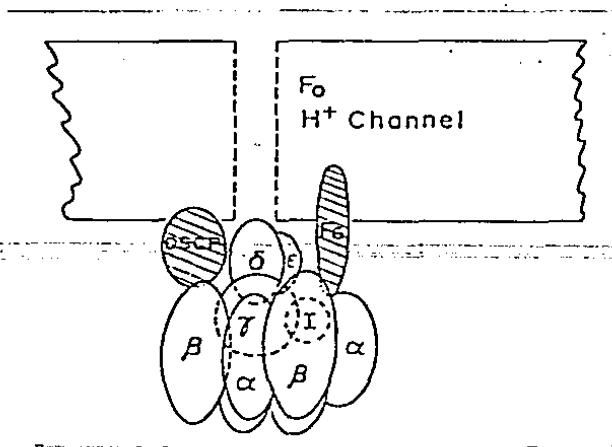


Esta reacción que cataliza la ATPasa es reversible, y permite al sistema, ya sea sintetizar ATP utilizando el gradiente de protones (función de ATP sintetasa), o utilizar al ATP para generar un gradiente de protones y disipar la energía (función de hidrolasa).

En la fosforilación oxidativa, las dos bombas de protones, cuyo funcionamiento acoplado conduce a la síntesis de ATP, pueden desarticularse en diversas condiciones. Este fenómeno puede inducirse artificialmente por los llamados agentes desacoplantes de la fosforilación oxidativa. Entre ellos los más conocidos son: el 2,4-dinitrofenol (DNP); carbonilcianida p-trifluorometoxifenilhidrazona

(FCCP); carbonilcianida m-clorofenilhidrazona (CCCP). Estos compuestos son todos ácidos débiles con pKas entre 5 y 7. Se sabe incrementan la transferencia de H^+ a través de la membrana mitocondrial por ser protonóforos, disipando, por lo tanto, el potencial de membrana, que ya no puede ser utilizado para la síntesis de ATP (Terada, 1981). En presencia de agentes desacoplantes la mitocondria pierde la capacidad de controlar la respiración basal (estado 4) observándose una estimulación del consumo de oxígeno y de la actividad hidrolítica de la ATPasa. Por esto resulta evidente la importancia fundamental de la ATPasa mitocondrial que constituye uno de los sistemas enzimáticos más complejos que se conocen.

Este sistema proteico está formado cuando menos por 13 subunidades y se conoce la función de la mayor parte de ellas.



Representación esquemática
de la ATPasa mitocondrial
(Gómez Puyou, 1981).

COMPONENTES DE LA ATPasa MITOCONDRIAL

Y SU FUNCION

	Subunidad	P M	FUNCION
Componentes membranales	Hidrofóbica (DCCD)	8,000	Transporte de H ⁺
	22 K	22,000	Transporte de H ⁺
Componentes de enlace	F ₆	10,000	Enlace entre F ₁ y componentes membranales.
	OSCP	20,000	
F ₁	α (3 subunidades)	53,000	Regulación
	β (3 subunidades)	50,000	Catálisis
	γ	33,000	Cerrojo
	δ	15,000	Tapón a los H ⁺
	ϵ	9,000	Tapón, ¿enlace?
	Péptido inhibidor (I)	10,000	Sensor-modulador

(Gómez-Puyou, 1981).

Por todo lo arriba mencionado, cabe preguntarse hasta qué grado realmente participan las mitocondrias en el peculiar metabolismo energético del testículo, hasta qué punto son funcionales, a pesar de que han sido calificadas de normales (Fritz, 1973; Morton y Lardy, 1967) y en qué consisten las alteraciones bioquímicas y morfológicas que se observan durante el proceso de la diferenciación celular.

La etapa inicial del estudio de la participación de las mitocondrias de testículo en la producción de ATP se enfocó primero a las características de la ATPasa mitocondrial y el consumo de oxígeno de estas mitocondrias, tomando como modelo comparativo a las mitocondrias y la ATPasa de hígado.

En el primer trabajo que se presenta en esta tesis, se analizó el efecto de inhibidores de la ATPasa mitocondrial tanto del tipo de los que actúan sobre la porción F_1 de la enzima, como de aquéllos que lo hacen sobre el factor F_0 . Además se midió su capacidad para sintetizar ATP. El estudio se hizo comparando las mitocondrias enteras y las partículas submitocondriales de testículo e hígado de rata.

En un segundo trabajo, se estudió el efecto de los agentes desacoplantes de la fosforilación oxidativa, como el FCCP y el 2,4-dinitrofenol sobre la actividad de la ATPasa mitocondrial y sobre la respiración de mitocondrias testiculares.

Los resultados mostraron que en el testículo existe una ATPasa mitocondrial poco sensible a los inhibidores que actúan fijándose a la porción membranaral de la enzima (F_0), y a los agentes desacoplantes de la fosforilación oxidativa. Pensamos que la ATPasa mitocondrial de testículo se encuentra unida laxamente a la membrana interna de la mitocondria, de modo que se disloca durante el aislamiento de los organelos y es posiblemente debido a esto que muestra ciertas características diferentes a las de la mayoría de los tejidos normales.

LOOSE BINDING OF TESTICULAR MITOCHONDRIAL ATPase¹
TO THE INNER MEMBRANE

Marta Elisa Vázquez-Memije, *Alfonso Cárazbez-Trejo,
Graciela Gallardo-Trillanes and Graciela Delhumeau-
Ongay. Sección de Regulación Metabólica, División
de Nutrición, Unidad de Investigación Biomédica del
Centro Médico Nacional. Apdo. Postal 73032. 03020
México, D.F. MEXICO, and *Centro de Investigaciones
en Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma
de México.

Short running title: LOOSELY BOUND TESTIS MITO-
CHONDRIAL ATPase.

Subject Category: BIOLOGICAL OXIDATION AND BIO-
ENERGETICS.

¹ Abbreviations used: ATPase, adenosine triphosphatase;
EDTA, tetrasodium (ethylenedinitrilo) tetra acetate; Tris,
tris (hydroxymethyl) aminomethane; TEA, triethanolamine;
DMCD, N, N'-dicyclohexylcarbodiimide; SMP, submitochondrial
particles, OSCP, oligomycin sensitivity conferring protein;
BSA, bovine serum albumin.

Reprints requests to: QFB Marta Elisa Vázquez-Memije
Sección de Regulación Metabólica
División de Nutrición
Unidad de Investigación Biomédica
del Centro Médico Nacional, IMSS
Apartado Postal 73032
03020 México, D.F. MEXICO.

ABSTRACT

Rat testis mitochondrial ATPase was not inhibited by oligomycin at pH 7.5. It was inhibited only at higher alkaline pHs, and showed a lower sensitivity both to oligomycin and DCCD and a higher one to efrapeptin. In submitochondrial particles, testis ATPase was only slightly inhibited by oligomycin, ossamycin and efrapeptin. The possibility of a loose binding of F_1 to the membrane was supported by its recovery from the supernatant of the SMP. Furthermore, by electron microscopy, after hypoosmotic shock and negative staining of the mitochondrial preparations, most of the inner mitochondrial membranes showed only a few "knobs" or none at all.

The capacity of the testis mitochondrial preparation to produce ATP was tested and compared to that from liver. ATP synthetase/ATPase activity ratio was 50:1 in liver mitochondria, whereas in the testis it was 3:1. In spite of this large difference, at least part of the testis ATPase must be firmly bound to the membrane, since it is able to form ATP. The rest seems to be loosely bound and its functional significance is still unknown.

INTRODUCTION

The pattern of energy metabolism in mammalian testis has certain peculiar characteristics; it involves a very active aerobic glycolysis (1) and a high ATPase activity (2). Most germinal cells are isolated from the rest of the organism by a blood-testis barrier (3) and possess a hypoxic (4) microenvironment controlled by Sertoli cells (5). Throughout maturation of the germinal cells, a morphological differentiation of mitochondria has been shown to occur. In spermatogonia, these organelles are similar to those of liver. However, mitochondria of spermatocytes and spermatids, which represent about 80% of the testis cell population, have a large intermembranous space and a highly condensed matrix (6,7). Their function in energy metabolism has not been yet clearly established (8).

The central role of ATPase in mitochondrial energy transduction has been generally accepted (9,10,11). Thus, as an initial approach to the study of the function of testis mitochondria, some features of their ATPase were compared to those of the well known liver enzyme. The results reported here suggest that besides a morphological heterogeneity, testis mitochondria may have ATPase complexes existing in two different "states": a "loosely" and a "tightly" bound form; only the latter seems to possess the ability to catalize the synthesis of ATP.

MATERIAL AND METHODS.

Adult male albino rats of the Sprague-Dawley strain were used. Mitochondria from albuginea free testis and liver were isolated by differential centrifugation of 10% (w/v) homogenates in 0.25 M sucrose, 0.05 mM EDTA and 5 mM TEA adjusted to pH 7.4 (extraction medium). Nuclei and cell debris were discarded after a 10 min centrifugation at 700 g; the supernatant was centrifuged at 8,000 g for 10 min and the mitochondrial pellet was washed once and re-suspended in 1 ml extraction medium per g wet weight of tissue. This fraction was used for biochemical determinations and to prepare SMP. To obtain a pure testis mitochondrial fraction, the total homogenate was centrifuged twice at 700 g for 10 min and the pellet discarded. The second supernatant was centrifuged at 8,000 g for 10 min, and the resuspended pellet centrifuged at 700 g for 10 min. The pellet was discarded and the mitochondrial fraction spun down from the supernatant at 8000 g for 10 min. The resuspended pellet was further purified on a 30-65% sucrose gradient as suggested by Hecht and Bradley (2) and used in some of the electron microscopy studies when specified. SMP were prepared by suspending the mitochondrial fraction in 0.25 M sucrose, 2 mM EDTA, adjusted to pH 8.5 with tris-base and sonicating for periods of 60 seconds at the maximum setting of an MSE sonicator. Unbroken mitochondria were removed by centrifugation for 10 min at 8000 g and SMP were spun down from the supernatant at 105,000 g

for 1 hr. ATPase activity was assayed by measuring the amount of inorganic phosphate hydrolysed from ATP as previously described (2). Oxygen consumption was measured polarographically in a Gilson (model K 100) oxygraph (13). ATP synthetase activity was calculated from the speed of oxygen consumption during state 3 (13) of respiration and the amount of ADP present in the phosphorylating medium, assuming a 1:1 ADP/ATP molar ratio. Protein was measured according to Hartree (14).

Electron microscopy. Samples of about 0.5 mg of protein from the mitochondrial suspension were layered over a 3% glutaraldehyde solution in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.2, in a microcentrifuge tube, let to be fixed in suspension for about 15 minutes and then spun down in a Beckman microcentrifuge model 152 for 30 seconds. Fixation of the pellet was continued for another 90 minutes, the glutaraldehyde solution was removed and the pellet was washed overnight with a washing-storage medium containing 0.25 M sucrose in the same buffer. Osmication with 2% osmium tetroxide in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.2, was done for two hours, and the osmium was removed. The osmicated pellet was washed with the washing storage medium with 4 changes in an hour. Dehydration was made with graded series of ethanol (30-100%) and propylene oxide, then infiltrated in 1:1 diluted propylene oxide: Epon resin for at least 24 hours followed by polymerization at 60°C for 36 hours in undiluted resin (15). Blocks were cut in a Reichert UmO₃ ultramicrotome with a

Dupont diamond knife obtaining gray to silver sections, picked up in 300 mesh copper grids and stained with uranyl acetate and lead citrate according to Reynolds (16).

Stained sections were observed in a JEOL 100 B electron microscope operated at 60 KV. For negative staining observations, a 2% aqueous phosphotungstic acid, pH 6.8, was used with the drop technique in a carbon covered grid.

RESULTS

In order to preserve their functions, mild traditional procedures were used to prepare both rat testis and liver mitochondrial fractions. Thus, the former was somewhat contaminated by small pieces of flagella and other cell debris.

The effect of oligomycin on the ATPase activity of these preparations was tested at various pHs (Fig. 1). The enzyme from testis mitochondria was inhibited only at higher alkaline pHs, whereas that of liver mitochondria showed maximal inhibition at pH 7.5. Accordingly, in further experiments, testicular ATPase was measured both at pH 7.5 and pH 9.0.

When other inhibitors were used, ATPase from testis mitochondria again was practically insensitive at pH 7.5. At pH 9.0 (Fig. 2), it had a lower sensitivity to those that act on the membrane components of mitochondrial ATPase,

such as DCCD and oligomycin. On the other hand, the sensitivity to efrapeptin, which acts on the F1 moiety of the complex (17), was higher in the testis than in the liver mitochondria.

To discard a possible difference in permeability to the various inhibitors in whole mitochondria, their effect on the ATPase activity of SMP from both tissues was tested. At first, the liver and testis mitochondrial preparations were both sonicated for 6 minutes. It became evident that the latter were completely insensitive to all the inhibitors tested under such conditions (data not shown). Thus, a single one minute sonication period was chosen to prepare testis SMP. If Mg²⁺ were omitted from the incubation medium, some ATPase was detected (0.3 umoles Pi/10 min/mg protein). It was not inhibited by oligomycin, only by efrapeptin (60-70%), suggesting the presence of some inside-in vesicles containing loose F₁. When Mg²⁺ were included to detect also ATPase from inside-out SMP (Table 1), the specific activity of the testis preparation was higher than the hepatic one. Mg²⁺ is known to activate flagella ATPase (18), whose remnants might still contaminate this pellet. The testis SMP ATPase was poorly inhibited not only by oligomycin and ossamycin but also by extremely high concentrations of efrapeptin. Exactly the same results were obtained at pH 7.5 (data not shown). Liver submitochondrial particles showed a several fold higher sensitivity to all three inhibitors.

A possible interpretation of the aforementioned observations may be that the F_1 component of testis mitochondria exists in a "loosely" bound form. To explore this alternative, both testis and liver mitochondria were sonicated for a single 60 sec. period, and the presence of F_1 in the supernatant of the SMP was assayed by measurements of ATP hydrolysis. As shown in Table II, an afrageptin sensitive hydrolytic activity was detected only in the supernatant of testis SMP. This suggests that indeed testicular F_1 may be easily detached from the membrane. In the liver, as expected, most remained in the SMP.

The F_1 portion of the ATPase can be observed in the electron microscope as "knobs" along the inner membrane of mitochondria, if mitochondria are exposed to a hypotonic shock and negative staining. By following this procedure the presence of F_1 -ATPase in mitochondria from liver and testis was examined. The "knobs" were abundant in the liver (Fig.3B), but very scarce in the testis (Fig.3D), indeed most of the membranes showed a total lack of the 9 nm "knobs". To be sure that these nude membranes were mitochondrial and not from contaminants, a pure testis mitochondrial fraction was studied by the same procedure (Fig.3C). Similar results were observed in SMP after a single 60 second sonication period (results not shown).

ATPase is able to function as ATP synthetase only when it is firmly bound to the inner mitochondrial membrane (11,19, 20). The ability of both mitochondrial preparations to synthesize ATP was calculated as described above from polarographic measurements of state 3 of respiration in the presence of succinate as a substrate (Table III). Mg^{2+} were not included in the media since respiratory controls were completely lost in the testis preparations by the addition of 0.1 mM Mg^{2+} , maybe through the activation of other ATPases. As expected, respiratory controls in liver mitochondria were lower than the ones usually obtained in the presence of Mg^{2+} . Yet, respiratory controls in the testis preparations were significantly lower than in those from liver ($p < 0.0001$ according to a Mann Whitney's U test) (21). Albumin is known to improve oxidative phosphorylation in partially uncoupled mitochondrial preparations. When 1% BSA was added directly to the polarographic chamber, higher respiratory controls and ATP synthetase activity were indeed obtained (Table III), although the latter was again lower than in liver.

ATPase hydrolytic activity was determined in these preparations also in the presence of succinate (Table III). Whereas in liver the ATP synthetase/ATPase ratio was 30:1, in the testis it was 3:1, in the absence of BSA and 5:1 in its presence. In both tissues ATP synthetase activity was fully inhibited by small amounts of oligomycin. ATPase activity was higher in testis,

but as previously shown in Figure 2, it had a lower sensitivity to oligomycin. It should be noted, however, that in the controls the hydrolytic values were lower than in previous experiments. It is possible that the phosphorylation of ADP by Pi formed from ATP hydrolysis as induced by succinate oxidation results in apparent lower values of ATP hydrolysis. Indeed when ATP hydrolysis by testis and liver mitochondria was measured in the presence of various concentrations of succinate (Fig.4), it was observed that succinate inhibited Pi formation by about 70% in liver and about 30% in testis. According to these results, succinate seemed to favor synthesis in the liver more than it did in the testis.

DISCUSSION

Whenever a metabolic feature of the adult testis is described, one must consider it likely that the observed phenomena correspond to late spermatocytes and spermatids, which represent about 80% of the testis cell population (22). In the case of the mitochondrial fraction, heterogeneity should also be kept in mind, since a definite morphological differentiation of this organelle has been described throughout the various stages of maturation of the germinal epithelium (6,7). Furthermore, the testis mitochondrial preparations, obtained by mild traditional procedures, are not as clean as those from liver. The method described to purify testis mitochondria was useful only for

electron microscopy, because of its low yield.

In the study of the effect of various inhibitors on ATPase of intact mitochondria from testis and liver (Fig. 2), it was clear that the testis enzyme had a lower sensitivity to those compounds that act on the membranous portion of ATPase (23) and a higher one to that acting on F_1 . In the interpretation of the data, however, a trapping action effect by non-mitochondrial membranes or a permeability problem could not be strictly discarded. These considerations prompted the preparation of SMP. After one minute of sonication the sensitivity of the testis preparation to the inhibitors was already small (Table I). This observation was consistent with the idea that the F_1 portion of testis ATPase was not as firmly attached to the membrane as the one of liver mitochondria. In fact, using efrapeptin, that has been reported to act specifically on F_1 (17, 23), the activity could be detected in the supernatant of testis SMP (Table II). The looseness of binding of at least part of the testis F_1 to the inner mitochondrial membrane was also suggested by the pictures obtained in the electron micrographs of mitochondria after hypoosmotic shock and negative staining (Fig. 3D).

If testis mitochondrial ATPase is loosely bound to the membrane, would it participate in the synthesis of ATP? Some reports in the literature indicate normal P:O ratios (8, 24,

25) and others (7), in the presence of albumin, high respiratory control values. Albumin is known to counteract the uncoupling effect of fatty acids (26), which alter permeability of the inner mitochondrial membrane (27). Furthermore, albumin is able to prevent the loss of endogenous Mg^{2+} in hepatoma mitochondria and this effect is mediated by its influence in the endogenous free fatty acid levels (28).

On the other hand, in mitochondria from this and some other tissues such as fetal liver and brain, albumin conferred uncoupler sensitivity to an otherwise insensitive ATPase (29). This phenomenon seemed to be related to Mg^{2+} leakage and a probable difference in the inner membranes was pointed out (30). In the presence of succinate without any albumin, we obtained lower respiratory controls in testis mitochondria as compared with liver (Table III). If, however, 1% BSA was added directly to the oxygraph chamber, respiratory controls in the testis preparations could be increased 2 fold, mainly by depressing the rate of state 4 oxygen uptake (data not shown), and ATP synthetase activity raised its velocity 50% (Table III). However, the effect of BSA both on the hydrolytic activity and its oligomycin sensitivity was practically negligible. These results indeed suggest that the attachment of F_1 to the membrane is not identical in the organelles of both tissues and that the looseness of attachment of the testis F_1 may be

partially overcome by albumin through a mechanism currently under investigation.

Testis ATP synthetase activity could be completely inhibited by small amounts of oligomycin. However, comparing the hepatic and testicular ATP synthetase/ATPase ratios, in the presence or in the absence of BSA, they were strikingly different (Table III) and could not be accounted for in terms of contaminants of the testis fractions. Succinate, on the other hand, inhibited 70% of the net Pi formation in liver mitochondria and only 30% in the testis. According to these data, this substrate would favor ATP synthesis in the liver, but not so in the testis.

Our results suggest the coexistence, in the adult rat testis mitochondrial fraction, of two states of ATPase, a firmly bound to the membrane form that participates in the synthesis of ATP, and another which seems to be loosely bound to the membrane. Further work must be done to define if each one of these two forms correspond to discrete cell types in distinct stages of maturation, as in the case of lactic dehydrogenase-X (P1), or they may truly coexist within the same mitochondrion. Also, the possibility of a contaminating "F₁-type", efrapeptin sensitive ATPase in the testis preparation, cannot be ruled out.

Whether a loosely bound ATPase has a physiological function or it is only a consequence of a different composition of

172

the inner membrane, cannot be determined with our present knowledge. Racker and his group (32) proposed that in certain tumor cells, one of the roles of $(Na^+ - K^+) - ATPase$ could be to maintain an active glycolysis. It is conceivable that in the testis, which also shows an active aerobic glycolysis, a mitochondrial ATPase may support it under certain circumstances.

On the other hand, the fluidity of membranes is known to be altered during the cell cycle (33). Loosely bound ATPases have been reported to occur in certain yeast and hepatoma mitochondria and the possibility of an impaired binding between OSCP and F_1 has been suggested (34, 35). The behavior of the testis enzyme regarding oligomycin sensitivity as a function of pH (Fig. 1) reminds the behavior of certain microorganisms (36,37), which change their mitochondrial activity, pH dependence and oligomycin sensitivity during the cell cycle (38,39). Likewise, a series of complicated biochemical events is known to take place during yeast mitochondrial biogenesis (40,41). Some of them involve ATPase (42).

Testis germinal epithelium consists mostly of meiotic (spermatocytes) and differentiating (spermatids) cells. It thus provides a unique model to study organelle differentiation in a mammalian system. During spermatogenesis, mitochondria both proliferate and undergo dramatic morphological changes

(6,7). As a working hypothesis, the peculiar biochemical characteristics of testis mitochondrial ATPase here described might be a reflection of phenomena related to the process of differentiation of the organelle.

ACKNOWLEDGMENTS.

We wish to express our gratitude to Profs. M. Tuena-Gómez and A. Gómez-Puyou for many helpful discussions throughout this work as well as for the revision of the manuscript.

We are indebted to Prof. H.A. Lardy for kindly providing us with efrapeptin and ossamycin, and to Dr. R.L. Hamill, from Lilly Research Laboratories, for a complementary sample of efrapeptin.

The skillful technical assistance of Mr. Jorge Sepúlveda is gratefully acknowledged.

REFERENCES

- 1.- LEIDERMAN, B. AND MANCINI, R.E. (1968) Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 128, 818-821.
- 2.- DELHUMEAU-ONGAY, G., TREJO-BAYONA, R., AND LARA-VIVAS, L. (1973) J. Reprod. Fert. 33, 513-517.
- 3.- DYM, M., AND FAWCET, D.W. (1970) Biol. Reprod. 3, 308-326.
- 4.- FREE, M.J., AND VANDEMARK, N.L. (1968) Am. J. Physiol. 214, 863-865.
- 5.- FAWCET, D.W. (1974) In Male Fertility and Sterility, (Mancini, R.E., and Martini, L., eds.) pp. 13-36, Academic Press, London.
- 6.- ANDRE, J. (1962) J. Ultrastruct. Res., Suppl. 3, 1-85.
- 7.- DE MARTINO, C., FLORIDI, A., MARCANTE, M.L., MAJORNI, W., SCORZA, B.P., BELLOCI, M., AND SILVESTRINI, B. (1979) Cell Tissue Res. 196, 1-22.
- 8.- FRITZ, I.B. (1973) in Current Topics in Cellular Regulation (Horecker, B.L., and Stadtman, E.R., eds.), vol. 7, pp. 129-174, Academic Press, London.
- 9.- MITCHELL, P. (1977) Annu. Rev. Biochem. 46, 995-1005.
- 10.- RACKER, E. (1977) Annu. Rev. Biochem. 46, 1005-1014.
- 11.- PENEFSKY, H.S. (1979) in Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology (Meister, A., ed.), vol. 49, pp. 225-280, John Wiley & Sons, Inc., New York.

- 12.- HECHT, N.B. AND BRADLEY, F.M. (1981) Gamete Res., 4, 443-449.
- 13.- ESTABROOK, R.W. (1967) in Methods in Enzymology (Estabrook, R.W., and Pullman, M.E., eds), vol. 10, pp.41-47, Academic Press, New York.
- 14.- HARTREE, E.F. (1972) Anal. Biochem. 48, 422-427.
- 15.- LUFT, S.H. (1961) J. Biophys. Biochem. Cytol. 9, 409-414.
- 16.- REYNOLDS, E.S. (1963) J. Cell. Biol. 17, 208-211.
- 17.- CROSS, R.L., AND KOHLBRENNER, W.E. (1978) J. Biol. Chem. 253, 4865-4875.
- 18.- YOUNG, L.G., AND SMITHWICK, E.B. (1975) J. Cell Physiol. 85, 143-150.
- 19.- BOYER, P.D. (1977) Annu. Rev. Biochem. 46, 955-1026.
- 20.- CHANCE, B. (1977) Annu. Rev. Biochem. 46, 967-980.
- 21.- SIEGEL, S. (1956) in Non Parametric Statistics for the Behavioral Sciences, pp 116, Mc Graw Hill, New York.
- 22.- CLERMONT, Y. (1972) Physiol. Rev. 52, 198-236.
- 23.- LARDY, H.A. (1980) Pharmacol. Ther. 11, 649-660.
- 24.- MORTON, B.E., AND LARDY, H.A. (1967) Biochem. 6, 43-49.
- 25.- MOHRI, H., MOHRI, T., AND ERNSTER, L. (1965) Exp. Cell Res. 38, 217-246.
- 26.- FORST, P., LOOS, J.A., CHRIST, E.J., AND SLATER, E.C. (1962) Biochem. Biophys. Acta. 62, 509-518.

- 27.- WOJTCZAK, L. (1974) FEBS Lett. 44, 25-30.
- 28.- BARBOUR, R.L., AND CHAN, S.P. (1978) J. Biol. Chem. 253, 367-376.
- 29.- HAYASHI, J.I., YONEKAWA, H., GOTOH, O., AND TAGASHIRA, Y. (1980) Biochem. Biophys. Res. Comm. 92, 261-267.
- 30.- HAYASHI, J.I. (1980) Arch. Biochem. Biophys. 205, 27-35.
- 31.- DE DOMENECH, E.M., DOMENECH, C.E., AOKI, A., AND BLANCO, A. (1972) Biol. Reprod. 6, 136-147.
- 32.- RACKER, E. (1976) A New Look At Mechanisms in Bioenergetics, pp. 153-176, Academic Press, New York.
- 33.- CHENG, S., AND LEVY, D. (1979) Arch. Biochem. Biophys. 196, 424-429.
- 34.- SCHATZ, G. (1968) J. Biol. Chem. 243, 2192-2199.
- 35.- KUŠELA, S., KOLAROV, J., KREMPASKÝ, V., LAKOTA, J., AND UJHÁZEY, V. (1978) FEBS Lett. 91, 222-226.
- 36.- SERRANO, R. (1978) Molec. Cell. Biochem. 22, 51-63.
- 37.- JOHNSTON, R., SCHARF, S., AND CRIDDLE, R.S. (1977) Biochem. Biophys. Res. Comm. 77, 1561-1568.
- 38.- EDWARDS, S.D., AND LLOYD, D. (1977) Biochem. J. 162, 39-46.
- 39.- EDWARDS, S.W., EVANS, J.B., WILLIAMS, J.L., AND LLOYD, D. (1982) Biochem. J. 202, 453-458.

- 40.- SCHATZ, G., AND MASON, T.L. (1974) Annu. Rev. Biochem. 43, 51-87.
- 41.- NEUPERT, W., AND SCHATZ, G. (1981) Trends Biochem. Sci. 6, 1-4.
- 42.- MACCECCHINI, M.L., RUDIN, Y., BLOBEL, G., AND SCHATZ, G. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 76, 343-347.

TABLE 1

EFFECT OF VARIOUS INHIBITORS ON TESTIS AND
LIVER SMP ATPase

Inhibitor	Testis				Liver		
	Binding site	$\mu\text{g inh.}$ mg prot.	Enzymatic activity*	Inhibition %	$\mu\text{g inh.}$ mg prot.	Enzymatic activity*	Inhibition %
None	---	----	7.7 \pm 0.3	---	---	2.2 \pm 0.06	---
Oligomycin	F ₀	23	6.7 \pm 0.2	13	3	0.27 \pm 0.02	88
Ossamycin	F ₀	23	5.8 \pm 0.1	24	3	0.45 \pm 0.04	80
Efrapeptin	F ₁	11.5	5.7 \pm 0.1	26	0.06	2.05 \pm 0.05	11
					0.25	0.66 \pm 0.03	71
					2.50	0.06 \pm 0.0	97

Conditions to prepare the SMP:

Liver mitochondria containing 19.3 mg protein/ml of 0.25 M sucrose and 2 mM EDTA, adjusted to pH 8.6 with trizma base, were sonicated 6 times for one minute periods. After centrifugation at 8000 g for 10 min, SMP were spun down from the supernatant at 105000 g for 1 hr at 5°C and the pellet, containing 11.4 mg protein was resuspended in 1 ml of 0.25 M sucrose, 3mM TEA, 0.05 mM EDTA, adjusted to pH 7.4 with trizma base.

Testis mitochondria containing 3 mg protein/ml of the same medium were sonicated for only one minute. The rest of the procedure was identical. The SMP contained 5.13 mg protein.

*nmoles Pi/10 min/mg protein \pm standard deviation (n=3). The assay conditions were the same as in Fig. 2, except that 5 mM MgCl₂ was included in the incubation mixtures. pH: 9.0 for testis and 7.5 for liver.

TABLE II
EFFECT OF EFRAPEPTIN ON ATPase OF
TESTIS AND LIVER SMP AND SMP SUPERNATANT

FRACTION	TESTIS			LIVER		
	<u>µg inh.</u> mg prot.	Enzymatic activity *	Efrapeptin sen- sitive ATPase	<u>µg inh.</u> mg prot.	Enzymatic activity*	Efrapeptin sen- sitive ATPase.
	µmoles Pi / 10 min			µmoles Pi / 10 min		
SMP	None	79.55 ± 1.7	8.44	None	119.33 ± 6.5	87.38
	0.30	71.11 ± 1.5		0.25	31.95 ± 1.84	
SMP SUPERNATANT	None	88.08 ± 2.9	42.48	None	28.80 ± 10.8	4.0
	0.14	45.60 ± 5.8		0.27	24.80 ± 6.15	

* Total enzymatic activity in the fraction ± standard deviation (n=3)

SMP were prepared as described in Table I, except that liver mitochondria were also sonicated for only one minute. The activity was measured both in the SMP and the supernatant of the 105,000 g/1 hr centrifugation.

For experimental conditions see Table I.

TABLE III

ATP SYNTHESIS AND HYDROLYSIS IN TESTIS AND LIVER INTACT MITOCHONDRIA

	Additions	Respiratory Control Ratio (13)	ATP Synthetase* (A)	ATPase* (B)	A/B
TESTIS	None	2.04 ± 0.3 (n=46)	1.45 ± 0.1 (n=15)	0.48 ± 0.02 (n=4)	3.0
	BSA	3.9 ± 0.3 (n=5)	2.12 ± 0.3 (n=5)	0.41 ± 0.01 (n=4)	5.1
	Oligomycin		0.0 (n=5)	0.35 ± 0.02 (n=4)	
	BSA + oligomycin		0.0 (n=5)	0.30 ± 0.01 (n=4)	
LIVER	None	3.0 ± 0.5 (n=24)	4.48 ± 0.3 (n=18)	0.16 ± 0.005 (n=4)	28.0
	Oligomycin		0.0 (n=18)	0.05 ± 0.003 (n=4)	

*Measured in the presence of 12 mM succinate

BSA: 1% ; Oligomycin: 0.6 $\mu\text{g}/\text{mg}$ protein

S.D. = Standard deviation; n = number of experiments,

Phosphorylating medium: 0.3 mM ADP, 0.225 M mannitol, 0.075 M sucrose,

0.05 M EDEA, 0.01 M KCl, 0.005 M Na_2HPO_4 , 0.002 M Tris buffer, pH 7.4 and a final concentration of 0.5-0.8 mg/ml of mitochondrial protein.

ATPase activity was measured as described in Fig. 2.

Fig. 1. Effect of oligomycin on ATPase activity from rat liver and testis mitochondria at various pH's. The reaction mixtures contained: 2mM ATP, 200 mM sucrose, 0.3 mg mitochondrial protein, 25 mM Tris buffer, in 0.5 ml total volume, at 37°C of temperature. Testis (o-----o), plus 1 µg/ml oligomycin (o-----o). Liver (A-----A), plus 1 µg/ml oligomycin (A-----A). Incubation time: 4 min. Data shown are means ± standard deviations (n=3).

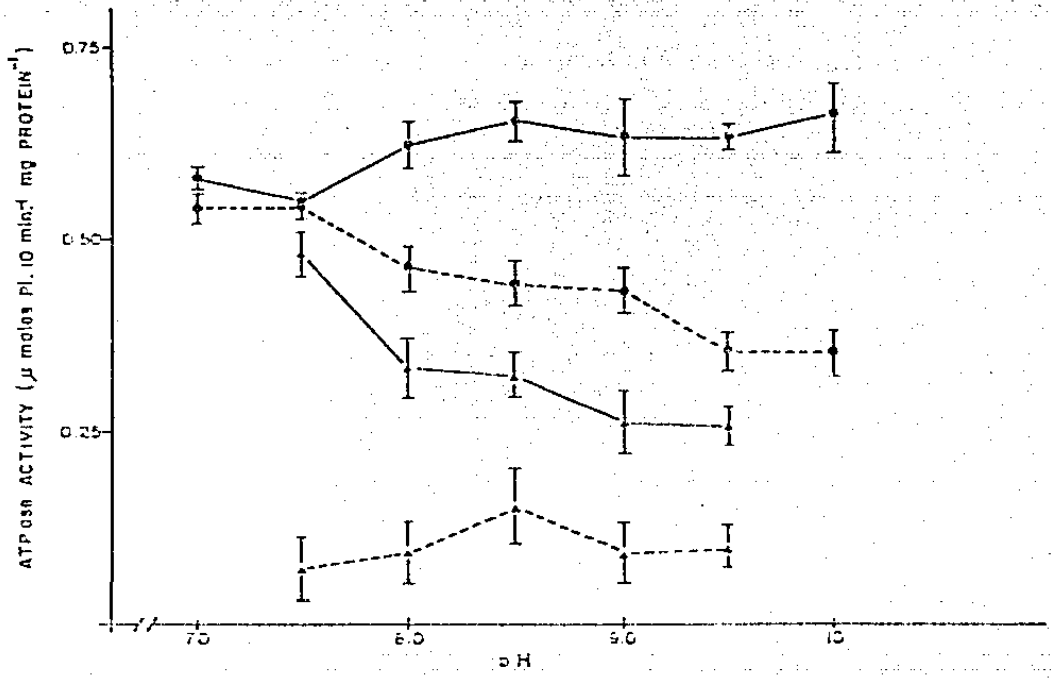


Fig. 2 Effect of various inhibitors on ATPase activity in intact mitochondria from liver (A-----A) (pH 7.5) and testis (o-----o) (pH 9.0).

The other experimental conditions were identical to those of Fig. 1.

Data shown represent typical results out of 5 to 10 experiments performed under each condition.

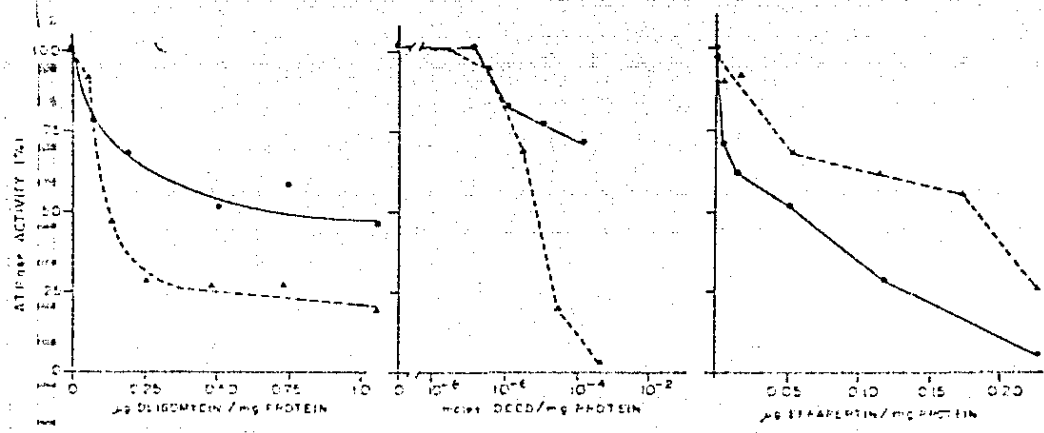
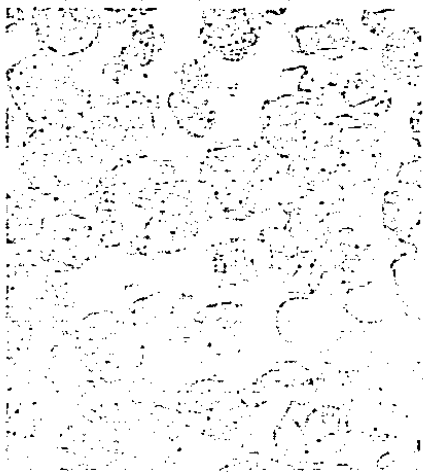
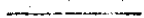


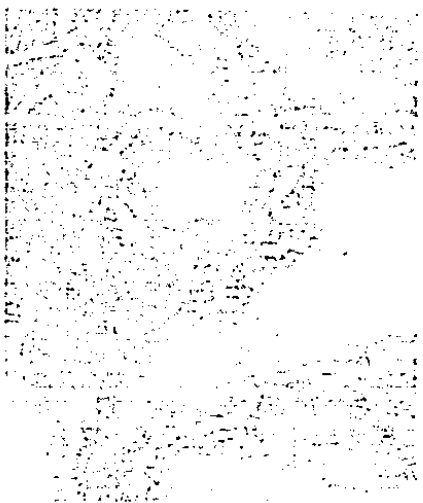
Fig. 3. Electron microscope micrographs of rat liver -
isolated mitochondria (A) 20,000 x. Negative --
staining of the same preparation (B) 30,000 x.
Rat testis isolated mitochondria (C) 110,000 x,
and negative staining of the same preparation -
(D) 85,000 x arrows indicated ATPase knobs.



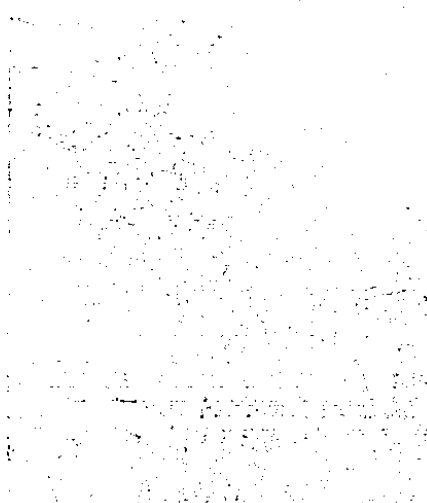
1A



1B



1C

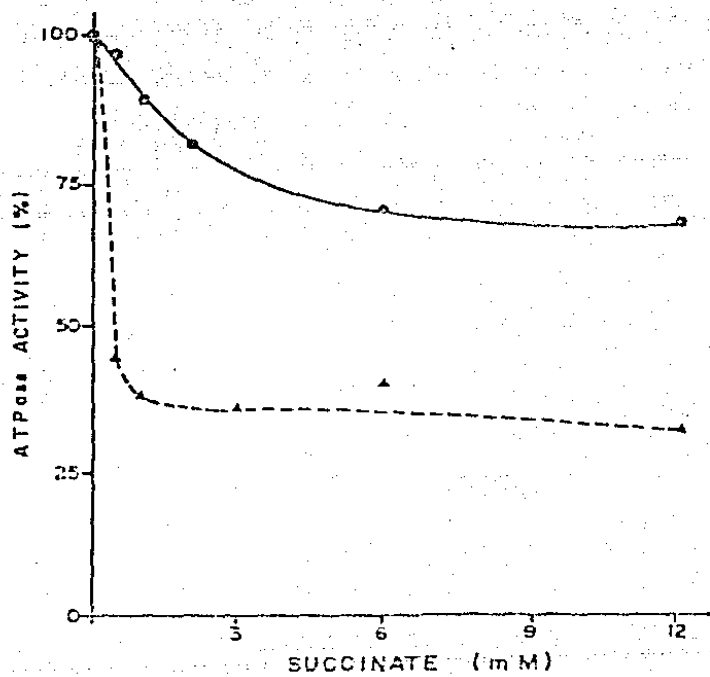


1D



Fig. 4. Effect of succinate on ATPase activity from
rat liver (Δ-----Δ) and testis (○-----○) mitochondria.

Experimental conditions were as in Fig. 2.



INSENSIBILIDAD DE LA ATP_{asa}¹ MITOCONDRIAL DE TESTICULO
HACIA AGENTES DESACOPLANTES DE LA FOSFORILACION OXIDATIVA

Marta Elisa Vázquez-Memije, Graciela Gallardo-Trillanes y Graciela Delhumeau-Ongay. Sección de Regulación Metabólica, División de Nutrición. Unidad de Investigación Biomédica del Centro Médico Nacional. Apdo. Postal 73032. 03020 México, D.F.

¹ Abreviaturas: ATP_{asa}, adenosín trifosfatasa; EDTA, sal tetrasódica del ácido etilendiamino tetra-acético; TEA, trietanolamina; OSCP, proteína que confiere sensibilidad a oligomicina; Tris, tris (hidroximetil) aminometano; DNP, 2,4-dinitrofenol; FCCP, carbonilcianida p-trifluorometoxifenilhidrazona; BSA, albúmina de suero bovino.

RESUMEN

Se estudió el efecto de agentes desacoplantes de la fosforilación oxidativa, como el 2,4-dinitrofenol y FCCP, sobre la actividad de la ATPasa mitocondrial y sobre la respiración, en preparaciones mitocondriales de testículo y de hígado, que se tomó como modelo comparativo.

Contrariamente a lo observado en las mitocondrias de hígado, la ATPasa mitocondrial de testículo mostró poca sensibilidad a los agentes desacoplantes cuando se obtuvo la preparación en condiciones normales. Cuando se aislaron las mitocondrias en presencia de 1% de albúmina, pudo observarse tan sólo un aumento del 50% en la actividad, por efecto del 2,4-dinitrofenol.

En lo que respecta a la respiración de las preparaciones mitocondriales de testículo y de hígado, fue estimulada en forma similar por el 2,4-dinitrofenol cuando los sustratos utilizados fueron malato y succinato. Con estos sustratos la adición directa de albúmina a la cámara del oxígrafo estimuló la ATP sintetasa, y marcó más la transición estado 3-estado 4. Se afectó fundamentalmente la respiración en estado 4, dando por resultado mejores controles respiratorios. En estas condiciones el estímulo obtenido por 2,4-dinitrofenol fue más discreto.

Con piruvato (+ malato) como sustrato, el DNP disminuyó la velocidad de respiración de las mitocondrias del testículo. Al adicionar albúmina, en cambio, estimuló la respiración. Con este sustrato la adición de ESA a la cámara incrementó en forma más acentuada la ATP sintetasa y mejoró notablemente los controles respiratorios, ya que afectó tanto al estado 3 como al 4, inhibiendo éste e incrementando aquél.

INTRODUCCION

En un trabajo anterior de nuestro laboratorio (Vázquez-Memije, M. E. y col., 1983), se observó que la ATPasa mitocondrial de testículo de rata adulta mostraba ciertas características peculiares: la porción F_1 de la enzima mostraba estar laxamente unida a la membrana por su baja sensibilidad a oligomicina que sólo se detectó a pHs mayores de 7.5 y su fácil solubilización por sonicación. Algunas de estas características sólo han sido descritas en ATPasas de mitocondrias de levaduras (Serrano, R., 1978; Schatz, G., 1968), y de ciertos tumores (Kučela, Š., y col., 1978).

Es bien sabido que la actividad de ATPasa mitocondrial es estimulada en la generalidad de los tejidos por agentes desacoplantes de la fosforilación oxidativa (Lardy, H.A. y Wellman, H., 1953; Mitchell, P., 1966; Torada, H., 1981). Resultó pues, sorprendente, que en 1973 Kolarov y Kučela informaron que las mitocondrias de hepatoma de Zajdela, tenían una actividad de ATPasa insensible a los agentes desacoplantes. Más tarde (1974), Pedersen y Morris observaron y confirmaron que la ATPasa mitocondrial de las células de hepatoma de Morris no era estimulada por los agentes desacoplantes, como sucede con las mitocondrias de hígado normal. Sin embargo, según hallazgos de Kaschnitz, R. M. y col. (1976), cuando las mitocondrias del mismo hepatoma eran aisladas en presencia de concentraciones elevadas de albúmina de suero bovino, la ATPasa podía ser estimulada por el 2,4-dinitrofenol.

Por otro lado, Hayashi, J.I., y col. (1980) encontraron que existía una correla-

ción entre la poca o nula estimulación de la actividad de la ATPasa por 2,4-dinitrofenol y la pérdida de iones magnesio de la mitocondria de células tumorales, hígado fetal y cerebro. Además, si el magnesio era adicionado al medio de incubación, se recuperaba la estimulación de la ATPasa por el 2,4-DNP.

En nuestro estudio de la ATPasa mitocondrial testicular nos pareció de gran interés investigar si la actividad enzimática era sensible a los agentes desacoplantes. Para esto se estudió el efecto de 2,4-dinitrofenol y de FCCP sobre la actividad de la ATPasa en mitocondrias de testículo de rata adulta y se tomó a la ATPasa de hígado como modelo comparativo. También se midió el efecto del 2,4-DNP sobre la respiración de preparaciones mitocondriales, tanto de hígado como de testículo.

Los resultados mostraron que la ATPasa mitocondrial de testículo, en general, fue poco sensible a los agentes desacoplantes, ya que sólo en determinadas condiciones pudo ser observado un aumento en su actividad por la adición de 2,4-dinitrofenol. En cambio, la respiración de las preparaciones mitocondriales, tanto de hígado como de testículo, se vió estimulada en forma similar por el agente desacoplante.

MATERIALES Y METODOS

Los animales utilizados fueron ratas machos de la cepa Sprague Dawley, de aproximadamente 250 g de peso corporal. Los testículos, libres de la túnica albugínea, fueron homogeneizados en el medio de extracción que contenía: sacarosa 0.25 M, TEA 3 mM, EDTA 1 mM pH 7.4, a una concentración de tejido de un 10 % (P/V). El homogeneizado total fue centrifugado a 700 g durante 10 min, obteniéndose la primera pastilla, que fue desechada. El sobrenadante fue centrifugado a 6 000 g 10 min para obtener la fracción mitocondrial, que fue resuspendida en el medio de extracción y vuelta a centrifugar a 700 g durante 10 min, con el objeto de purificar un poco más la preparación de mitocondrias. El sobrenadante fue centrifugado nuevamente a 6 000 g durante 10 min para obtener la fracción mitocondrial. La pastilla fue resuspendida en el medio de extracción, a una concentración de 1 ml/g de tejido húmedo original. El consumo de oxígeno fue medido polarográficamente, según método de Estabrook (1967). La determinación de proteínas fue hecha con la técnica de Hartree (1972).

Determinación de Magnesio. - La suspensión mitocondrial fue incubada durante 5 ó 30 min a 30°C con y sin 2,4-dinitrofenol en las condiciones descritas por Hayashi, J.I. (1980). El contenido de Mg^{++} fue determinado en la pastilla y en el sobrenadante por espectroscopía de absorción atómica.

RESULTADOS

Inicialmente se estudió el efecto del 2,4-dinitrofenol sobre la actividad de la ATPasa mitocondrial, tanto de hígado como de testículo, a pH 7.5 y 9.0, ya que en un trabajo previo (Vázquez-Memije, M.E. y col. 1983), observamos que la ATPasa de testículo sólo mostraba sensibilidad a oligomicina a pH 9.0 mientras que la ATPasa de hígado mostraba inhibición máxima a oligomicina a pH 7.5. Como era de esperarse, la ATPasa mitocondrial de hígado fue muy estimulada por el desacoplante (hasta siete veces el valor basal) a los dos pHs probados (Fig. 1). En la misma figura puede observarse que la actividad de la ATPasa de testículo no pudo ser estimulada por el 2,4-DNP a ninguno de los dos pHs. Aquí, es importante señalar que el efecto del 2,4-dinitrofenol fue ensayado posteriormente a diferentes pHs, desde 5.5 hasta 10.0, a intervalos de 0.5 unidades de pH, y en ninguno de los casos pudo observarse una estimulación de la actividad de ATPasa.

El desacoplante FCCP fue estimulante efectivo de la ATPasa mitocondrial de hígado desde concentraciones 5×10^{-8} M (Fig. 2). En el testículo, a pH 7.5 los resultados fueron prácticamente los mismos que con 2,4-dinitrofenol. A pH 9.0, hubo una muy ligera estimulación de la actividad con FCCP, pero en ningún caso fue superior al 20 %.

Para averiguar si el aislar las mitocondrias en un medio con PEA influye en la sensibilidad de la ATPasa al 2,4-dinitrofenol, procedimos a repetir el experimento, esta vez preparando las mitocondrias del testículo en presencia y

ausencia de 1 % de albúmina. Los resultados obtenidos efectivamente señalaron que sólo en estas condiciones de aislamiento con BSA, podía observarse una estimulación de la actividad enzimática, no mayor a un 50 %. Cuando la adición de BSA se hizo directamente al medio de incubación, no se observó sensibilidad alguna.

Se llevaron a cabo algunos experimentos para investigar si el 2,4-dinitrofenol provocaba en las mitocondrias de testículo una pérdida de magnesio.

En primer término, fue estudiado el efecto del 2,4-dinitrofenol, tanto en hígado como en testículo, en presencia y ausencia de 5 mM de MgCl₂. En el hígado, la ATPasa fué muy estimulada por el 2,4-DNP con y sin magnesio.

En el testículo, en presencia de magnesio, la actividad basal fue muy elevada debido a que la preparación mitocondrial está contaminada por dineína de los flagelos de espermatozoides fragmentados durante la homogeneización (Vázquez-Memije, M.E. y col. 1983) y se sabe que esta ATPasa es dependiente de magnesio (Young, L.G. y Smithwick, E.B. 1975). En ambas condiciones, con o sin magnesio, no se observó estimulación de la actividad de la ATPasa por el desacoplante (Fig. 3).

En un segundo tipo de experimento diseñado con el mismo fin, las mitocondrias fueron incubadas con y sin 2,4-dinitrofenol durante 5 ó 30 min a 30° C, en las condiciones descritas por Hayashi (1980), y se determinó la cantidad de Mg²⁺ que se perdió y la que se retuvo en las mitocondrias por efecto del desacoplante (Tabla 1). Como puede observarse en esta tabla, no hubo pérdida importante de Mg²⁺ ni en las mitocondrias de hígado ni en las de testículo, bajo ninguna de

las condiciones ensayadas. Es más, durante la preincubación sin dinitrofenol, pareció haber una fuga pequeña del ión, pero fue la misma en ambos tejidos.

Se estudió a continuación el efecto del 2,4-dinitrofenol sobre la respiración de preparaciones mitocondriales de testículo y de hígado en presencia de diversos sustratos oxidables.

En la tabla 2 puede observarse que, en presencia de succinato a concentraciones de saturación del sistema, 1×10^{-5} M de 2,4-DNP estimuló en forma similar la velocidad de respiración en estado 4, tanto de mitocondrias de hígado como de testículo.

En la figura 4 se muestra un trazo típico de consumo de oxígeno por una preparación de mitocondrias de testículo, con succinato como sustrato oxidable.

La respuesta a adiciones subsiguientes de 2,4-DNP fue máxima a una concentración de 5×10^{-5} M del desacoplante (concentraciones finales). En otros experimentos se observó un efecto inhibitorio de la respiración a concentraciones del orden 10^{-3} M.

En presencia de malato como sustrato oxidable, el efecto del DNP fue similar (Fig. 5). La situación fue diferente cuando el sustrato fue piruvato (Fig. 6). A bajas concentraciones el DNP estimuló ligeramente la respiración. A concentraciones más altas, fue francamente inhibitorio.

Es importante mencionar que las determinaciones del consumo de oxígeno fueron hechas en ausencia de magnesio, pues cuando éste fue incluido en el

medio, observamos desacoplamiento de las mitocondrias de testículo desde una concentración de 0.1 mM de iones magnesio, debido probablemente a la presencia de dineína flagelar que se sabe es activada por este ión.

Para investigar el efecto de la albúmina sobre el consumo de oxígeno en las mitocondrias de testículo, se adicionó en una concentración de 1% directamente en la cámara del oxígrafo (Tabla 3, Figs. 4, 5 y 6).

En presencia de succinato la albúmina no afectó la velocidad de respiración en el estado 3. En cambio, inhibió el estado 4, y por consiguiente aumentó el valor del control respiratorio. Aumentó también la actividad de la ATP sintetasa e hizo más marcada la transición estado 3 - estado 4.

Con malato como sustrato oxidable, inhibió el estado 4, aceleró el estado 3, estimuló a la ATP sintetasa, y la transición estado 3 - estado 4 fue más marcada.

Con piruvato (+ malato) como sustrato, los efectos fueron iguales al sustrato anterior, sólo que más acentuados, ya que en este caso el control respiratorio pasó de 1.7 a 11.3 en presencia de albúmina (Tabla 3, Fig. 6).

En lo que toca al efecto del 2,4-dinitrofenol sobre la respiración en presencia de albúmina, ésta tornó la estimulación del desacoplante en más discreta en el caso del succinato y del malato. La situación cuando el sustrato era piruvato fue inversa a la obtenida en ausencia de albúmina.

DISCUSION

Se ha demostrado repetidamente que la adición de agentes desacoplantes a las mitocondrias de hígado tienen un efecto de estimulación sobre la actividad de la ATPasa y sobre la respiración, así como un efecto inhibitorio sobre la síntesis de ATP (Lardy, H.A., Wellman, H., 1953; Mitchell, P., 1966; McLaughlin, S.G.A. y Dilger, J.P., 1980; Terada, H., 1981). Sin embargo, no está bien definido el mecanismo de acción de los desacoplantes. Se sabe que actúan como protonóforos unidireccionales, disipando el potencial de membrana (Hopfer, U., Lehninger, A.L., 1968; Terada, H., 1981). Según el mecanismo de acción propuesto por Terada, H. (1981) para los desacoplantes, éstos deben encontrarse en forma disociada. La forma aniónica puede entonces combinarse con el H^+ para transportarlo al interior de la mitocondria y disipar de esta manera el gradiente de protones. Para que esto funcione, es necesario que el transporte sea a favor del gradiente, esto es, el pH extramitocondrial debe ser menor al intramitocondrial. Además de ser protonóforos, los desacoplantes tienen otros efectos: Se ha observado que pueden unirse a proteínas solubles (Weinbach, E.C. y Garbus, J., 1969) y a proteínas de la ATPasa mitocondrial (Hansteln, W.G. y Hatefi, Y., 1974; Katre, N.V. y Wilson, D.F., 1978). En algunos microorganismos pueden asociarse también a otras proteínas (Katre, N.V. y Wilson, D.F., 1980). En levaduras, el dinitrofenol puede asociarse a elementos celulares, probablemente también proteínas (Borst-Pauldes, G.W.F.H. 1968). En *B. subtilis*, el 2,4.-DNP interacciona directamente con el transportador de amino ácidos y lo inhibe (Nichols, R.A. y Ordal, G.W., 1978). En

S. cerevisiae, inhibe la velocidad de transporte de sorbosa (Van De Broek, y col., 1982).

El hecho de que hayamos encontrado un efecto diferente del 2,4-dinitrofenol sobre las mitocondrias de testículo, comparadas con las de hígado, dependiendo de que el efecto se estudiara sobre la respiración o sobre la actividad de ATPasa, es congruente con la acción múltiple del desacoplante y con la dualidad de la ATPasa mitocondrial de testículo (Vázquez-Memije y col., 1983).

Su efecto estimulante sobre la respiración en ambos tejidos (Tabla 2), es explicable por su acción como protonóforo. El efecto inhibitorio cuando el sustrato utilizado fue piruvato, podría deberse a que el 2,4-dinitrofenol, a esas concentraciones, inhiba al transportador de piruvato de las células germinales en forma similar a la descrita por VanDop y Lardy (1978) en espermatozoides de epidídimo de bovino.

El hallazgo de que en presencia de albúmina las mitocondrias de testículo hayan mostrado aumento de la actividad de ATP sintetasa, de velocidad de respiración en el estado 3, del control respiratorio y en general un mejor acoplamiento, podría deberse a uno de los múltiples efectos de la albúmina, que consiste en quelar a los ácidos grasos, de los que se sabe actúan como agentes desacoplantes (Hülamann, W.C. y col., 1960; Chan, S.H.P. y Higgins, E., 1978). Además, Barbour y Chan (1978), encontraron que la BSA pudo estimular a la adenín translocasa y a la ATPasa activada por 2,4-dinitrofenol, en mitocondrias de algunos tumores.

Por otro lado, la disminución del efecto desacoplante del DNP en presencia de

albúmina, puede deberse a que ésta interaccione directamente con el DNP y abata la concentración real de dinitrofenol libre. Con piruvato, parecería que la albúmina pudiera impedir la interacción entre el desacoplante y la translocasa de piruvato. (VanDop, C. y col., 1978).

Estos resultados nos hablan nuevamente de la idea sugerida en un trabajo previo (Vázquez-Memije y col., 1983) de que parte de la ATPasa de testículo está laxamente unida a la membrana y que la albúmina de alguna manera protege a la ATPasa en la membrana, permitiéndole a la enzima comportarse como en la mayoría de los tejidos normales.

La falta de estimulación de los agentes desacoplantes sobre la actividad de la ATPasa testicular puede deberse a diferencias inherentes a las enzimas mismas o bien a diferencias en la membrana mitocondrial. Esta última posibilidad parece ser más probable, ya que sólo cuando las mitocondrias fueron aisladas en presencia de albúmina, pudimos observar una estimulación de la actividad de ATPasa con DNP en un 50%, y se ha dicho que la albúmina puede proteger a la mitocondria de agentes presentes en el tejido que dañen a la membrana (Barbour, R.L. y Chan, H.S.P., 1983). Este efecto se limitó a esas condiciones, ya que cuando la albúmina fue agregada directamente al medio de incubación, no hubo respuesta al desacoplante.

En los últimos años, mucho se ha estudiado sobre el efecto de agentes desacoplantes de la fosforilación oxidativa en las mitocondrias de tejidos tumorales (Pedersen, P.L. y Morris, H.P. 1974; Kolarov y col., 1973; Kaschnitz, R. M. y colaboradores, 1976; Barbour, R. L. y

Chan, S.H.P., 1978; Knowles, A.F. y Kaplan, N.O., 1980; Knowles, A.F., 1982) y se ha observado que la ATPasa mitocondrial tiene una respuesta baja y en ocasiones negativa a los desacoplantes. Algunos estudios han sugerido que el comportamiento extraño de estas ATPasas se debe a una pérdida de Mg^{++} de la mitocondria durante la preincubación con DNP (Hayashi, J.I., 1980).

Nuestros resultados mostraron poca variación en lo que se refiere a salida de magnesio, tanto en las mitocondrias de hígado como de testículo, por lo que aparentemente ésta no parece ser la causa determinante de la baja respuesta a los desacoplantes en las mitocondrias de testículo. En un trabajo reciente, Knowles, A.F. (1982), propuso que el acarreador ADP/ATP está involucrado en la respuesta a los desacoplantes. Encontró que las mitocondrias de algunos tumores humanos, cuyas ATPasas son poco sensibles al 2,4-dinitrofenol, el contenido de adenín nucleótidos fue menor comparado al de hígado normal. Por otro lado, Harbour y Chan (1983), informaron que la velocidad de transporte de los adenín nucleótidos fue significativamente menor en algunos tumores que en hígado normal. En experimentos no mostrados en este trabajo encontramos que las mitocondrias de testículo tienen una velocidad de transporte de los adenín nucleótidos igual a la de las mitocondrias de hígado. Sin embargo, esto no necesariamente implica que la concentración de los adenín nucleótidos in vivo sea la misma.

Los resultados de este trabajo no nos permiten, por el momento, definir a cuál de las posibilidades planteadas se debe la falta de sensibilidad de la ATPasa

mitocondrial de testículo a los agentes desacoplantes. Nos queda por estudiar si se debe 1) a una estructura ó composición especial de la membrana, 2) a alguna falla en los factores OSCP o F_6 de la enzima en su unión con la membrana, 3) a una diferencia en el contenido de adenín nucleótidos.

BIBLIOGRAFIA

- Barbour, R.L. y Chan, S.H.P., (1978). *J. Biol. Chem.* 253, 367-376.
- Barbour, R.L. y Chan, S.H.P., (1983). *Cancer Res.* 43, 1511-1517.
- Borst-Pauwels, G.W.F.H., (1968). *FEBS Lett.* 1, 252-254.
- Brummett, T.B. y Ordal, G.W., (1977). *Arch. Biochem. Biophys.* 178, 368-372.
- Chan, S.H.P. y Higgins, E., (1978). *Can. J. Biochem.* 56, 111-116.
- Estabrook, R.W., (1967). in *Methods in Enzymology*, vol. 10, pp. 41-47, Academic Press, New York.
- Hanstein, W.G. y Hafeti, Y., (1974). *J. Biol. Chem.* 249, 1356-1362.
- Hartree, E.F., (1972). *Anal. Biochem.* 48, 422-427.
- Hayashi, J.I., (1980). *Arch. Biochem. Biophys.* 205, 27-35.
- Hopfer, U., Lehninger, A.L. y Thompson, T.E., (1968). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 59, 484-490.
- Hülsmann, W.C., Elliot, W.B. y Slater, E.C., (1960). *Biochim. Biophys. Acta* 39, 267-276.
- Kaschnitz, R.M., Hatfeji, Y. y Morris, H.P., (1976). *Biochim. Biophys. Acta* 449, 224-235.
- Katre, N.V. y Wilson, D.F., (1978). *Arch. Biochem. Biophys.* 191, 647-658.
- Katre, N.V. y Wilson, D.F., (1980). *Biochim. Biophys. Acta* 593, 224-229.
- Knowles, A.F. y Kaplan, N.O., (1980). *Biochim. Biophys. Acta* 590, 170-181.
- Knowles, A.F., (1982). *Biochim. Biophys. Acta* 681, 62-71.
- Kolarov, J., Kuželá, Š., Krempaský, V. y Ujhazy, V., (1973). *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 55, 1173-1973.
- Kuželá, Š., Kolarov, J., Krempaský, V., Lakota, J. y Ujhazy, V., (1978). *FEBS Lett.* 91, 222-226.

- Lardy, H.A. y Wellman, H.J., (1953). J. Biol. Chem. 201, 357-
- Mc Laughlin, S.G.A. y Dilger, J.P., (1980). Physiol. Rev. 60, 825-863.
- Mitchell, P., (1966). "Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation". Glynn Research, Ltd., Badmin.
- Nichols, R.A. y Ordal, G.W., (1978). Biochem. J. 176, 639-647.
- Pedersen, P.L. y Morris, H.P., (1974). J. Biol. Chem. 249, 3327-3334.
- Schatz, G., (1968). J. Biol. Chem. 243, 2192-2199.
- Serrano, R., (1978). Molec. Cell Biochem. 22, 51-63.
- Terada, H., (1981). Biochem. Biophys. Acta 639, 225-242.
- VanDe Broek, P.J.A., Corrie, Haasnoot, Van Leeuwen, C.C.M. y VanStev-
ninck, J., (1982). Biochem. Biophys. Acta 689, 429-436.
- VanDop, C., Hutson, S.M. y Lardy, H.A., (1978). Arch. Biochem. Biophys.
187, 235-242.
- Vázquez-Memije, M.E., Cárabez-Trejo, A., Gallardo-Trillanes, G. y
Delhumeau-Ongay, G., (1983). Trabajo enviado a publicación
- Weinbach, E.C. y Garbus, J., (1969). Nature 221, 1016-1018.
- Young, L.G. y Smithwick, E.B., (1975). J. Cell Physiol. 85, 143-150.

TABLA 1

EFEECTO DE 2,4-DINITROFENOL SOBRE EL
CONTENIDO DE Mg^{++} DE MITOCONDRIAS .

Tiempo de incubación (min)	TESTICULO		HIGADO	
	-DNP	+DNP	-DNP	+DNP
% del contenido inicial				
5	84	94	83	100
30	74	88	73	100

Mitocondrias de testículo: 40.5 ± 8.2 nánomoles de Mg^{++} / mg proteína (n=5)

Mitocondrias de hígado : 37.95 ± 5.4 nánomoles de Mg^{++} / mg proteína (n=5)

Medio de incubación: Imidazol, 11 mM; BSA, 0.15%; sacarosa, 10.5 mM; Hepes, 0.3 mM; manitol, 33 mM; ATP, 2 mM; DNP, 0.2 mM; proteína mitocondrial, 700 ug; volumen, 0.5 ml; temperatura, 30 C; pH, 7.2; tiempo de incubación, 5 y 30 minutos.

n - a número de experimentos

TABLA 2

EFFECTO DE 2,4- DINITROFENOL SOBRE LA RESPIRACION
EN PRESENCIA DE SUCCINATO COMO SUSTRATO OXIDABLE

TEJIDO	RELACION DE CONTROL RESPIRA - TORIO. (Estabrook, R.W., 1967)	EFFECTO DE 2,4-DNP** (%)**
HIGADO	3.0 ± 0.5 n = 24	201.3 ± 2.62 n = 20
TESTICULO	2.04 ± 0.33 n = 16	172.2 ± 1.94 n = 20

* DNP 1×10^{-5} M

Sustrato oxidable: succinato a concentraciones de saturación. 12 mM testículo; 6 mM hígado.
Medio de fosforilación (mM): Manitol, 225; sacarosa, 75; tris, 2; EDTA, 0.05; KCl, 1;
Na₂HPO₄, 5; pH 7.4; temperatura, 30 C. ADP, 0.3 mM.

** % de la velocidad de respiración en el estado 4

n = numero de experimentos.

EFEECTO DE LA ALBUMINA SOBRE EL CONSUMO
DE OXIGENO EN MITOCONDRIAS DE TESTICULO

SUSTRATO	VELOCIDAD DE CONSUMO DE OXIGENO nmoles O ₂ / min / mg de proteína				CONTROL RESPIRATORIO		ATP sintetasa nmoles ATP/min/mg de proteína	
	ESTADO 3		ESTADO 4		Sin albúmina	albúmina 1%	Sin albumina	albúmina 1%
	Sin albúmina	albúmina 1%	Sin albúmina	albúmina 1%				
SUCCINATO 12 mM	73.6 (100%)	88.3 (120%)	36.8 (100%)	24.5 (67%)	2.0 (100%)	3.6 (180%)	298.2 (100%)	368.4 (124%)
MALATO 12 mM	27.6 (100%)	33.6 (121%)	15.2 (100%)	9.0 (59%)	1.8 (100%)	3.7 (205%)	59.1 (100%)	101.0 (171%)
PIRUVATO 12 mM (+ Malato 0.6mM)	22.9 (100%)	43.1 (188%)	13.7 (100%)	3.8 (28%)	1.7 (100%)	11.3 (665%)	91.6 (100%)	222.4 (243%)

Medio de Fosforilación (mM): Manitol, 225; sacarosa, 75; tris, 2; EDTA, 0.05; KCl, 1;
Na₂HPO₄, 5; pH 7.4, 30°C. ADP, 0.3 mM.

La velocidad de ATP sintetasa se calculó a partir del consumo de oxígeno durante el estado 3.

Figura 1.- Efecto de 2,4-dinitrofenol sobre la actividad de la ATPasa mitocondrial. Medio de incubación: tris, 25 mM; sacarosa, 200 mM; ATP, 2 mM; proteína mitocondrial, 500 ug; DNP en etanol; volumen, 0.5 ml; temperatura, 37 C; tiempo de incubación, 4 min. ● Hígado; ▲ Testículo; — pH 7.5; ----- pH 9.0.

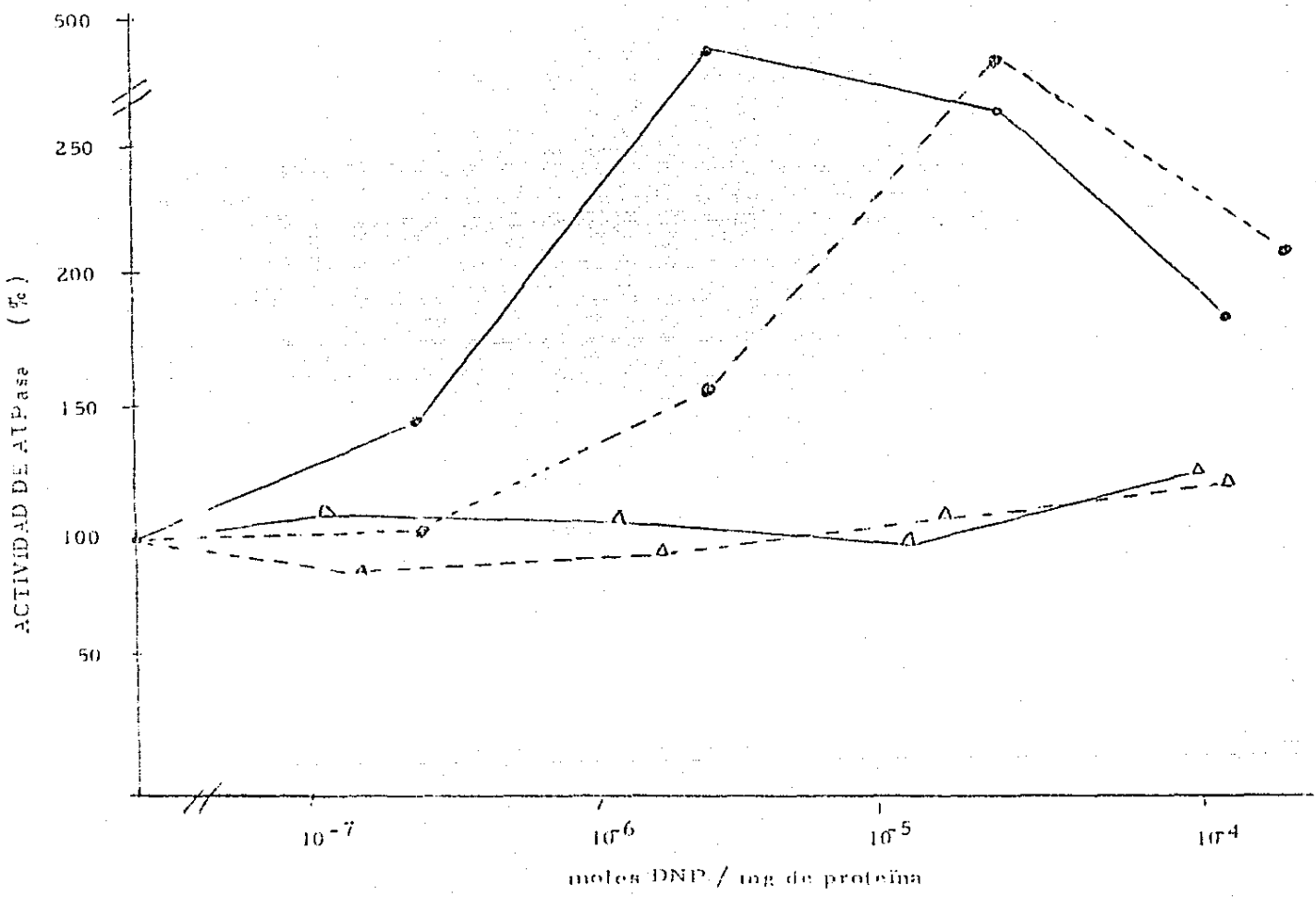


Figura 2.- Efecto de FCCP sobre la actividad de la ATPasa
mitocondrial. Condiciones de ensayo iguales a las de la fig. 1.

● Hígado; △ Testículo; ——— pH 7.5; - - - - - pH 9.0.

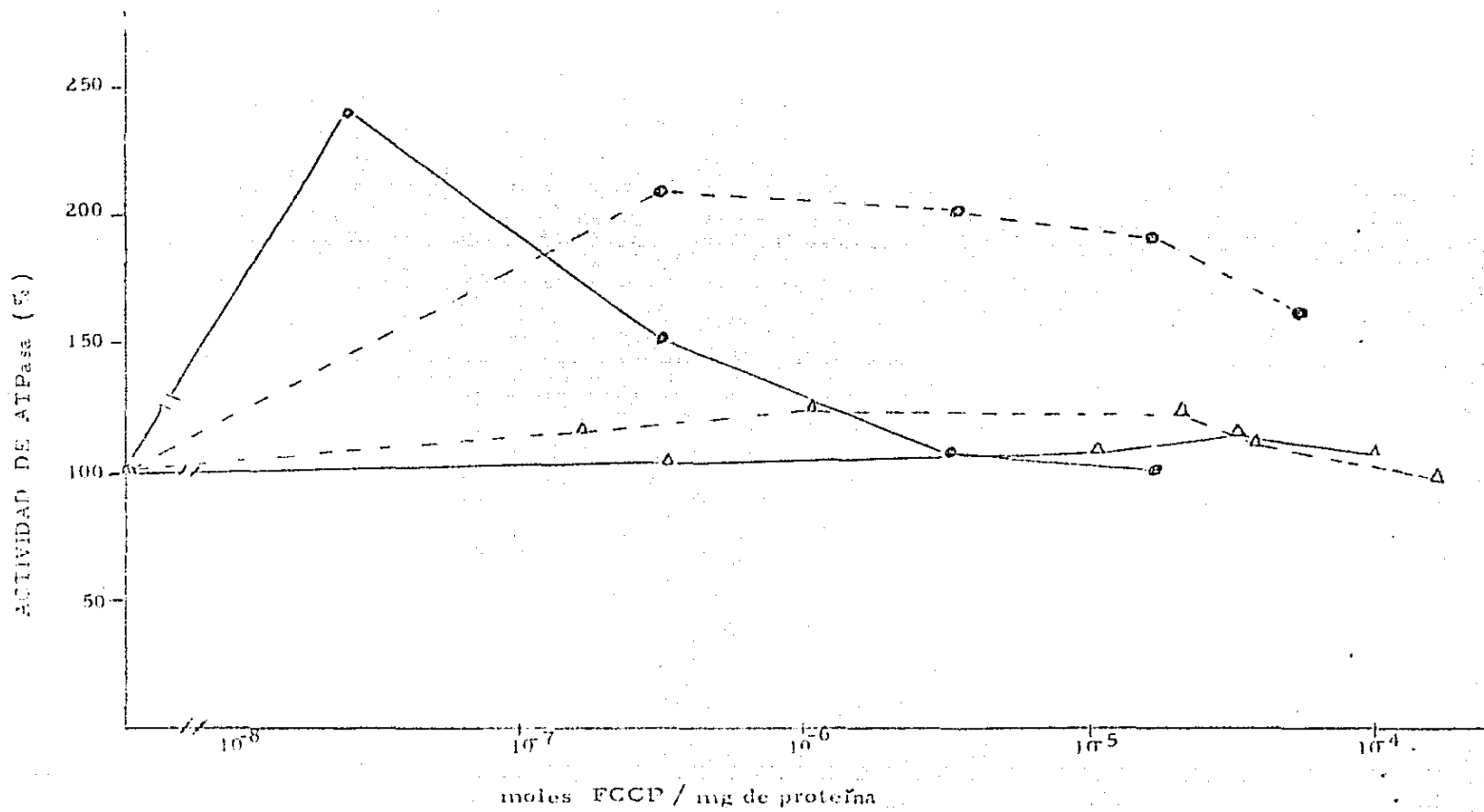


Figura 3.- Efecto del 2,4-dinitrofenol sobre la actividad de la ATPasa mitocondrial en ausencia y presencia de 5 mM de $MgCl_2$. Medio de incubación: Tris 25 mM; sacarosa, 200 mM; ATP, 2 mM; proteína mitocondrial, 500 μ g; temperatura, 37 C; tiempo de incubación, 4 min; pH 9.0; volumen 0.5 ml.

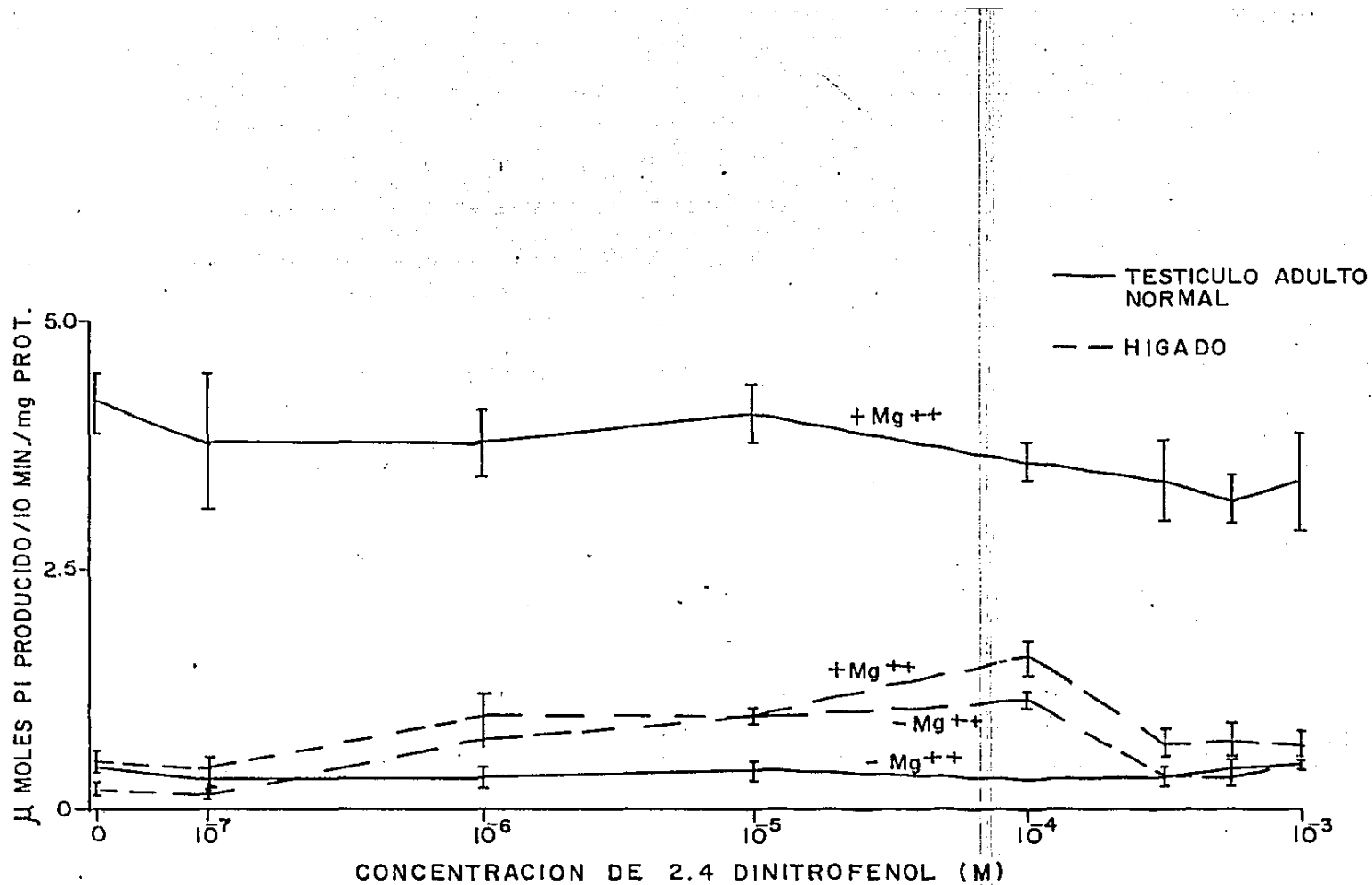


Figura 4.- Consumo de oxígeno con succinato como sustrato. Condiciones iguales a las de la tabla 2. Cuando el experimento se hizo en presencia de albúmina, esta fue disuelta en el medio de respiración.

Succinato 12 mM

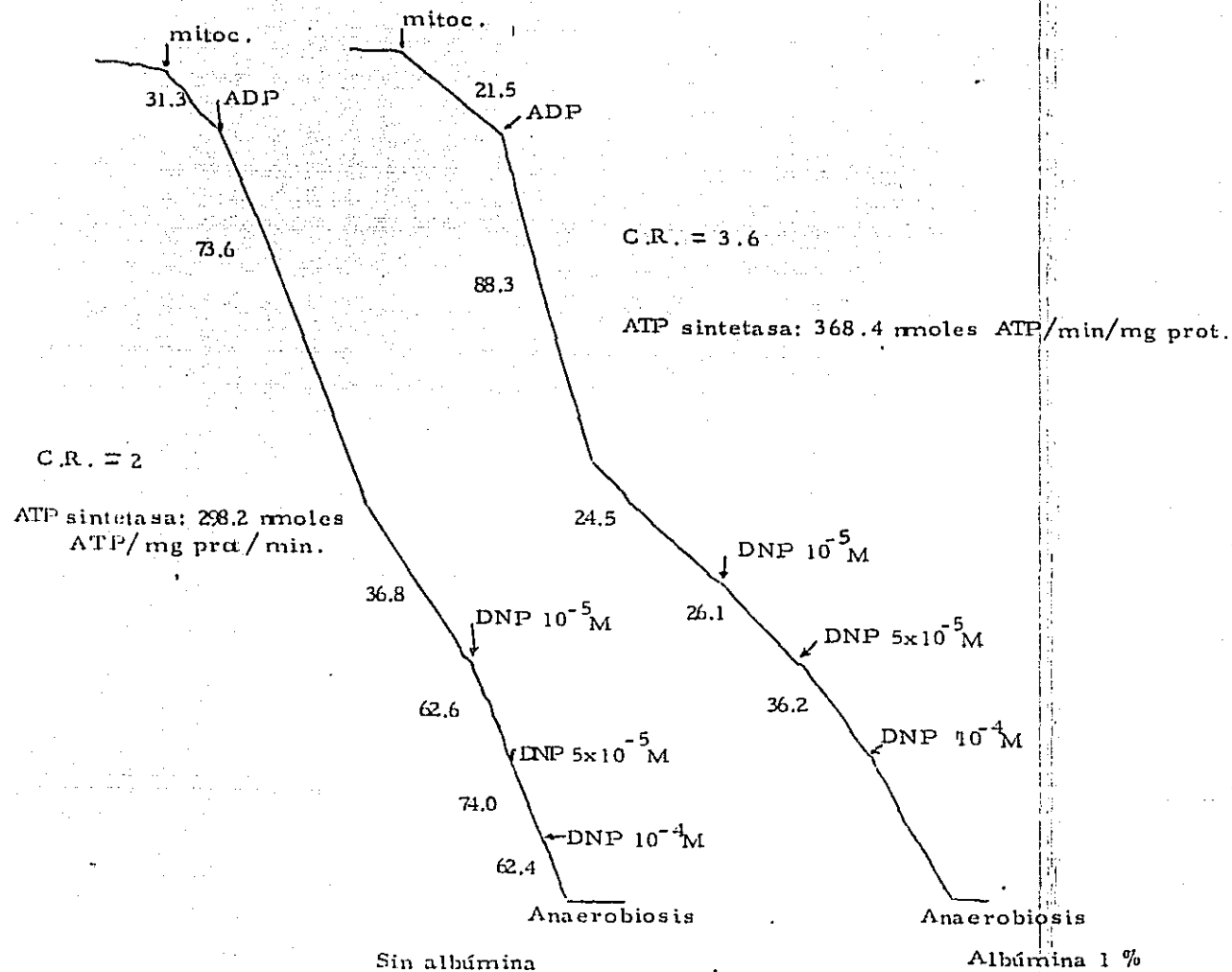


Figura 5.- Consumo de oxígeno con malato como sustrato.

Condiciones iguales a las de la figura 4.

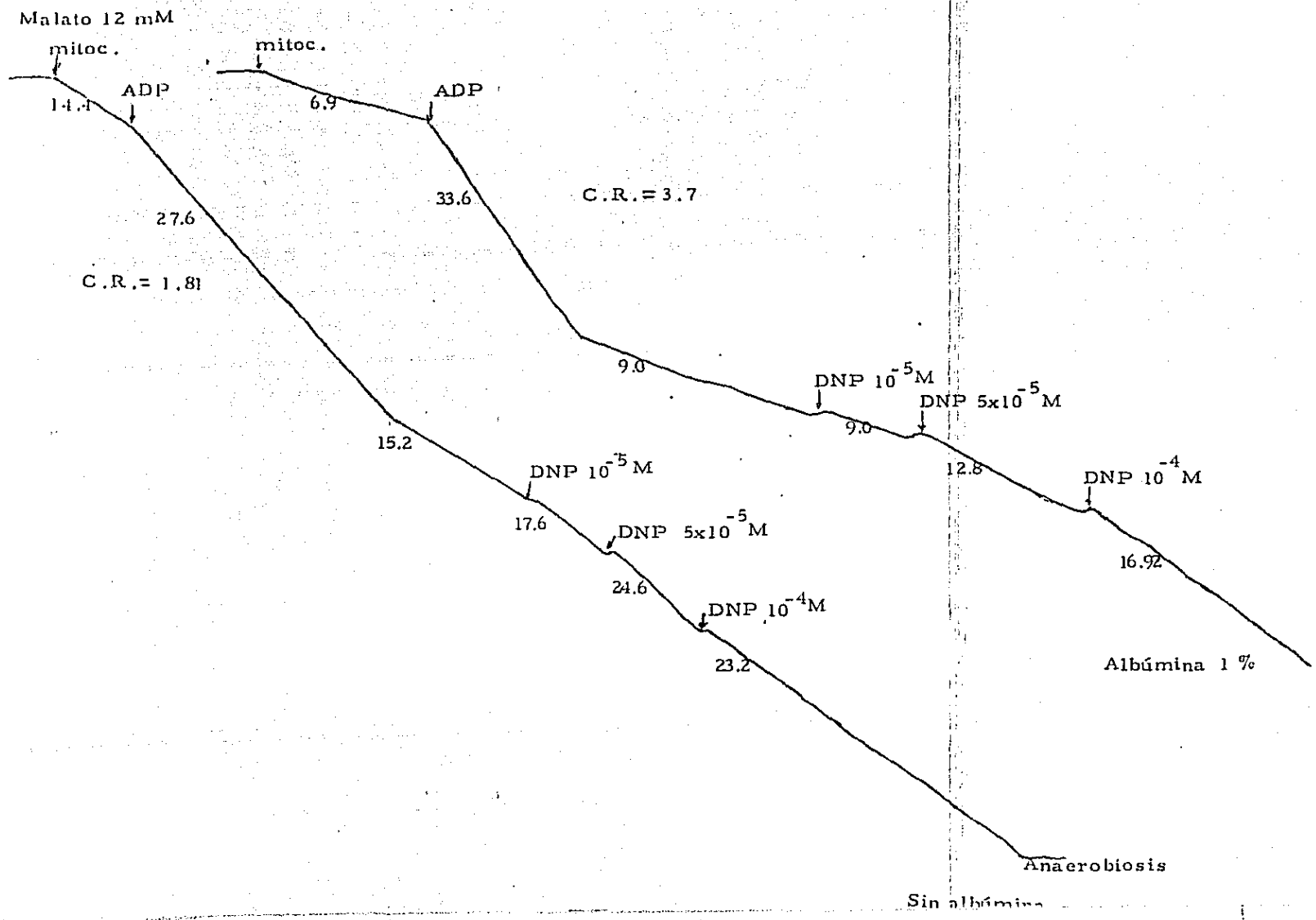
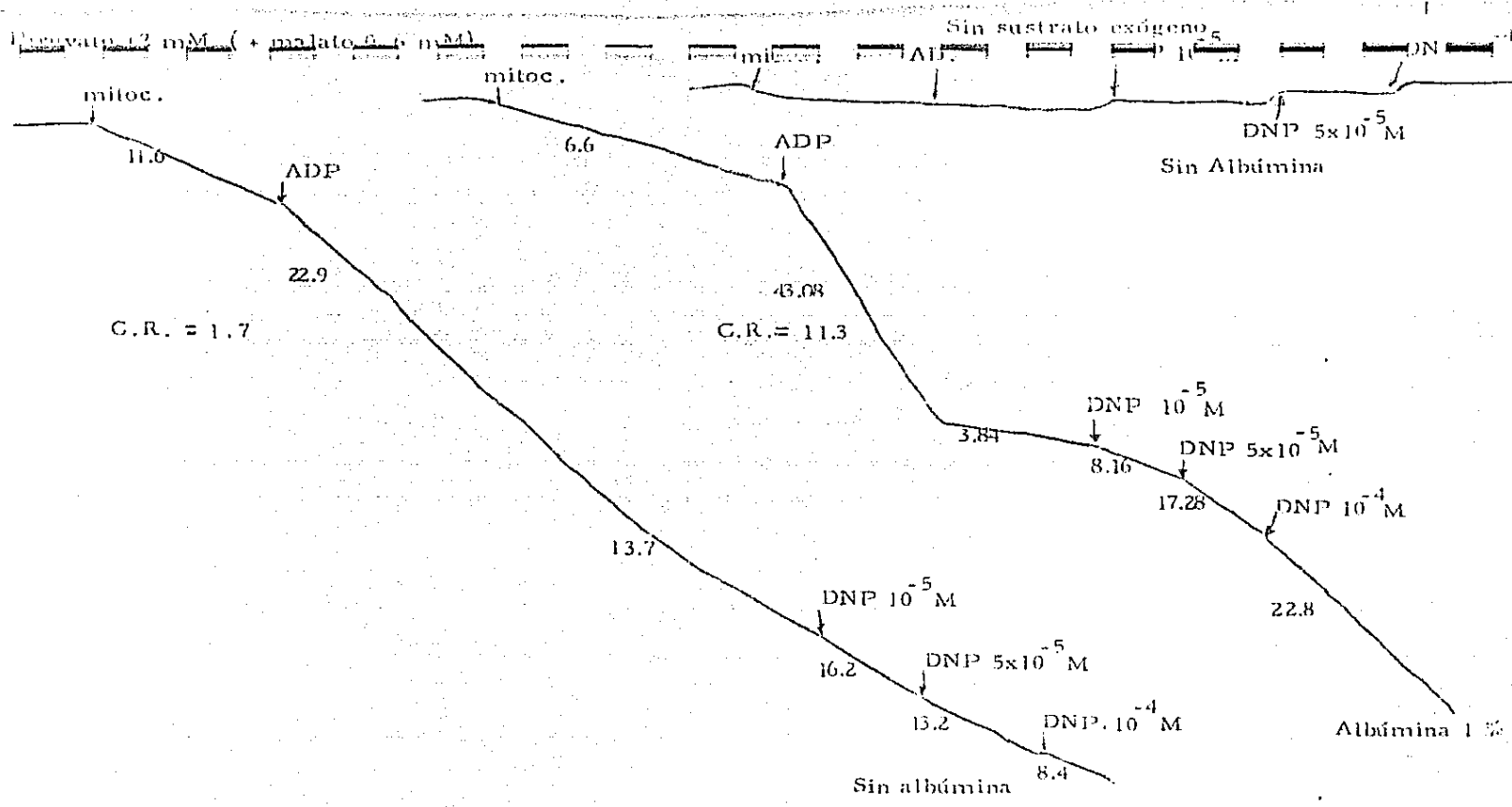


Figura 6.- Consumo de oxígeno con piruvato como sustrato.

Condiciones iguales a las de la figura 4.



DISCUSION GENERAL

Las mitocondrias del testículo sufren cambios morfológicos y bioquímicos a través de la espermatogénesis. Morfológicamente, las mitocondrias de las células más primitivas, como son las espermatogonias y espermátocitos primarios proleptotenos y leptotenos, son escasas y semejantes a las mitocondrias de la mayoría de los tejidos. En cambio, las mitocondrias de las células más diferenciadas (espermátocitos postileptotenos y espermátidas), además de ser numerosas, presentan una forma vacuolada debido a que las crestas se pliegan hacia el borde externo (André, 1962; De Martino, 1979).

La ATPasa mitocondrial es una enzima particularmente importante, pues de ella depende la síntesis de ATP. En el testículo de rata adulta, es una enzima con características diferentes a las informadas en otros tejidos de mamíferos. Se ha dicho, repetidamente que la ATPasa muestra sensibilidad a los inhibidores que se unen a la porción F_0 , tales como oligomicina y DCCD. Para que estas drogas inhiban la actividad catalítica de la ATPasa es necesario que la parte hidrofílica de la enzima, designada como F_1 esté unida a la membrana (Dobrofsky, 1979). Esta aserción es válida para las funciones de la enzima relativas, tanto a la hidrólisis como a la síntesis de ATP.

En esta tesis se ha propuesto que por lo menos una parte de la ATPasa mitocondrial de testículo tiene una unión laxa con la membrana interna. Para hacer esta proposición nos basamos en la alta sensibilidad mostrada por la enzi-

ma hacia inhibidores como la efrapeptina, que actúan directamente sobre la porción F_1 , así como la escasa sensibilidad mostrada hacia inhibidores que se unen al factor membranal y el hecho de haber encontrado una buena parte de la F_1 en el sobrenadante de las partículas submitocondriales.

Hasta donde sabemos, las ATPasas con aparente defecto en su unión a la membrana sólo han sido descritas en levaduras (Schatz, 1968) y en células tumorales (Kužela, 1978). Según trabajos de Kužela y Kolarov (1978), en hepatoma de Zajdela, existe una falla en el ensamblaje de la F_1 con sus demás componentes y no una unión laxa con la membrana, como se había sugerido en trabajos previos.

Considerada globalmente, la capacidad de la ATPasa de testículo para sintetizar ATP parece ser deficiente. La actividad de la ATP sintetasa es tres veces menor en testículo comparada con la de hígado. Los controles respiratorios también son bajos en el testículo, en presencia de succinato, malato o piruvato, como sustratos oxidables. Asimismo, la transición estado 3-estado 4 no es muy clara. Esta situación parece depender fundamentalmente de que el consumo de oxígeno es alto en el estado 4. Las anteriores, son características de mitocondrias en las que las dos bombas de protones que constituyen la fosforilación oxidativa, no se encuentran del todo acopladas (Hansford, 1980). En las mitocondrias de testículo, aquellas ATPasas cuya porción F_1 no se encuentra firmemente unida a la membrana, podrían preferentemente hidrolizar al ATP que está siendo sintetizado por las que sí lo están.

En estas condiciones el AEP puede haber estado en una situación de estado 5, con la consecuencia fallia en la inhibición del consumo de oxígeno característica de un estado 4 controlado (Hansford, 1960).

Por otra parte, estratos como succinato no inhiben a la ATPasa en las mitocondrias enteras, como sucede en el hígado, donde la ATPasa se inhibe hasta un 50%. Aparentemente, por lo tanto, en las preparaciones mitocondriales de testículo está más favorecida la actividad que la síntesis de AIP.

Por lo que toca al efecto de los desoxiplenas, la ATPasa de testículo fue poco sensible a ellos. Se estudió si el 16 α -desaplaso estaba involucrado en la falta de sensibilidad del 2,4-dinitrofenol, como se informó ocurría en el hígado de ratón (Hansford, 1960). Se estudió si el 16 α -desaplaso estaba involucrado en la falta de sensibilidad del 2,4-dinitrofenol, como se informó ocurría en el hígado de ratón (Hansford, 1960). El estudio de la participación del 16 α -desaplaso en la insensibilidad de la ATPasa es particular.

En cuanto a la respiración, si se observa la curva estimulante del 2,4-dinitrofenol en la zona de mayor actividad del 16 α -desaplaso, lo cual indica que a este gradiente la proteína afectada está rodeada por la cadena respiratoria y la permeabilidad a H^+ que se disipa en el 16 α -desaplaso.

La hallazgo de un grado de sensibilidad a la inhibición de la ATPasa por el 2,4-dinitrofenol en un sistema de preparación de hígado de ratón, la actividad de la ATPasa se ha observado en un 50% por efecto del 2,4-dinitrofenol. Este no pudo observarse con la DEA por ausencia de este sustrato al

medio de incubación. Esto podría sugerir que la baja respuesta de la ATPasa al desacoplante no se debe a ácidos grasos liberados al medio de incubación.

En lo que se refiere a la respiración, la albúmina mejoró el control respiratorio y aumentó la actividad de la ATP sintetasa. Nuevamente parecería no deberse este fenómeno a la presencia de ácidos grasos ya que, en ausencia de sustrato exógeno y de albúmina (Fig. 6) no hubo un consumo apreciable de oxígeno. El efecto del DNP en presencia de BSA fue moderado. Con piruvato más albúmina hubo una respuesta positiva al 2,4-dinitrofenol. Sin albúmina el dinitrofenol inhibió la respiración debida a la oxidación de piruvato. En este caso particular, pudiera estar involucrada una inhibición del translocador del piruvato, por 2,4-dinitrofenol, según describió Lardy y col. (1978) sucede en espermatozoides de epidídimo de bovino. De cualquier forma, parece ser, que la albúmina protege a la membrana y a la ATPasa durante el proceso de aislamiento.

Chan y Higgins (1978) observaron que en mitocondrias envejecidas de hígado de rata la albúmina era capaz de remover algunos compuestos que tenían efecto desacoplante. Tal fue el caso de los ácidos grasos de cadena larga, producto de la degradación de los fosfolípidos de la membrana durante el proceso de envejecimiento de las mitocondrias. La albúmina removió aproximadamente el 50% del total de los ácidos grasos libres y el control respiratorio mejoró notablemente en esas mitocondrias aunque sin llegar a normalizarse del todo. Chefurka midió desde 1966 el contenido de ácidos grasos en las mitocondrias envejecidas y concluyó que la acumulación de ellos evita la estimulación de la ATPasa por el 2,4-dinitrofenol.

Por otro lado, Chan (1983) encontró que en mitocondrias de hepatoma, cuya ATPasa es poco sensible al DNP, el contenido de ácidos grasos aumentaba conforme el tumor crecía. Este mismo autor había observado previamente (1978) que las mitocondrias de células tumorales adsorbían una mayor concentración de albúmina que las mitocondrias de tejidos normales. Este hecho quizá señale una diferencia importante entre las membranas de los dos tipos de tejidos y puede reflejar el estado alterado del metabolismo energético en los tumores.

Ignoramos la razón por la cual la albúmina protege la ATPasa de las mitocondrias de testículo si son preparadas desde el inicio en su presencia.

Pensamos que la composición de la membrana interna puede ser de alguna manera diferente a la de los organelos de otros tejidos, que esto favorezca el desprendimiento de la porción F_1 durante el aislamiento de las mitocondrias y que sea este desprendimiento el que se puede evitar parcialmente por la presencia de la albúmina. Que este fenómeno se deba o no a una diferencia en ácidos grasos libres, no puede definirse en este momento.

El hecho de que las mitocondrias de testículo de rata adulta muestren un comportamiento aberrante, en lo que se refiere al efecto de inhibidoras y desacoplantes sobre la ATPasa, hace resaltar la pregunta inicialmente planteada sobre el grado de funcionalidad de la mitocondria. Por el momento, no podemos dar una respuesta completa a esta pregunta. Sabemos, que son capaces de sintetizar ATP, aunque no sea óptimamente. Además, hemos

mencionado que las mitocondrias presentan otras características diferentes a las de otros tejidos. Tenemos el dato de que algunas enzimas del ciclo de los ácidos tricarbóxicos aparecen en el proceso de diferenciación hasta los espermátocitos postleptoténos (Delhumeau-Ongay y col., 1982). Tal es el caso también de la deshidrogenasa láctica asociada a mitocondrias pesadas (Machado de Domenech y col., 1972).

Es importante no perder de vista la heterogeneidad de las células que forman el tejido testicular. Creemos que las características aquí señaladas, pudieran deberse a la multiplicación y diferenciación misma de la mitocondria, hasta hoy sólo descritas morfológicamente. Queda por definir a cuál de las estirpes celulares corresponden estos fenómenos y cómo se van modificando a través de la espermatogénesis.

Por esta razón pensamos será necesario abocarse en un futuro próximo a:

- a) Obtener las mitocondrias de cada una de las diferentes estirpes celulares del testículo y estudiar las características de la ATPasa para ver como se modifica a través de la diferenciación.
- b) Estudiar si el contenido de ácidos grasos libres varía en estas mitocondrias a través de la espermatogénesis y la variación de la composición de la membrana interna de la mitocondria a través de la diferenciación del organelo.
- c) Investigar si estas mitocondrias tienen los factores F_0 y OSCP que unen a la F_1 con sus componentes membranales.

d) Medir la actividad de la adenín nucleótido translocasa y su posible correlación con la falta de estimulación de la ATPasa por los agentes desacoplantes de la fosforilación oxidativa.

El testículo ha sido hasta ahora, un órgano poco conocido desde el punto de vista bioquímico. Tiene características metabólicas semejantes en algunos casos a las levaduras y en otros a tejidos cancerosos. Creemos, pues, que el conocimiento del mismo así como de su regulación nos llevarán a comprender mejor el fenómeno biológico de la diferenciación celular.

RESUMEN Y CONCLUSIONES

Se estudió el efecto de inhibidores y desacoplantes de la fosforilación oxidativa sobre la actividad de la ATPasa y sobre la respiración en mitocondrias de testículo adulto, tomando como referencia preparaciones mitocondriales de hígado.

Los resultados obtenidos mostraron que la ATPasa mitocondrial de testículo fue poco sensible a inhibidores que se unen a la porción F_0 de la enzima como oligomicina y DCCD. Esta sensibilidad fue detectada sólo a pHs mayores de 7.5. Como contraste, la actividad enzimática fue inhibida casi totalmente por efrapeptina.

Al preparar partículas submitocondriales (pH 8.6) se perdió del todo la sensibilidad a los inhibidores de F_0 . También desapareció en parte la sensibilidad a efrapeptina, inhibidor específico de la F_1 . Esta se solubilizó, ya que pudo recuperarse en el sobrenadante una actividad de ATPasa sensible a efrapeptina y a quercetina.

Cuando se midió la capacidad de la enzima para sintetizar ATP se encontró que la relación ATP sintetasa/ATPasa fue 3:1 en testículo y 30:1 en el hígado. La adición de albúmina logró incrementar la relación en el testículo 5:1.

Las mitocondrias de testículo fueron sometidas a choque hiposmótico y tinción negativa. Las fotografías al microscopio electrónico mostraron que sólo algunas regiones de la membrana tenían F_1 , el resto carecían de ella.

Por lo que se refiere al efecto de los agentes desacoplantes, la ATPasa de tes-

tefculo mostr6 cierta sensibilidad al dinitrofenol s6lo cuando las mitocondrias fueron aisladas en presencia de 1% de alb6mina. En estas condiciones se observ6 un incremento de la actividad de un 50%. En otras condiciones, la ATPasa de testfculo fue insensible a los agentes desacoplantes de la fosforilaci6n oxidativa. Se estudi6 la posible participaci6n del ion magnesio en esta falta de respuesta a los desacoplantes. Los resultados no indican la participaci6n de magnesio en este comportamiento de la ATPasa.

La respiraci6n s6 fue estimulada por el 2,4-dinitrofenol cuando se utilizaron succinato y malato como sustratos oxidables. En cambio, con piruvato como sustrato el 2,4-dinitrofenol inhibi6 la respiraci6n.

Cuando se estudi6 el efecto del dinitrofenol sobre la respiraci6n en presencia de alb6mina, el desacoplante tuvo un efecto de estimulaci6n moderado con succinato, malato y tambi6n con piruvato.

Nuestros resultados nos hacen suponer que por lo menos parte de la ATPasa mitocondrial de testfculo tiene una uni6n laxa con la membrana interna y durante el aislamiento de las mitocondrias se desprende gran parte de la porci6n F_1 .

BIBLIOGRAFIA

- André, J. (1962) *J. Ultrastruct. Res.*, Suppl. 3, 1-85.
- Bishop, P.M.F. (1964) en "Recent Advances in Endocrinology", p.222 ed. Churchill London.
- Bishop, D.W. (1969) en "Reproduction and Sexual Behavior", p.261, Diamond M. Indiana Univ. Press Bloomington.
- Burgos, M.H. y Vitale-Calpe, R. (1967) *Am. J. Anat.* 120, 227-
- Barbour, R.L. y Chan, S.H.P. (1983) *Cancer Res.* 43, 1511-1517.
- Chan, S.H.P. y Higgins, E. (1978) *Can. J. Biochem.* 56, 111-116.
- Chefurka, W. y Dumas, T. (1966) *Biochemistry*, 12, 3904-3911.
- Clermont, Y. (1958). *Cell Res.* 15, 138-
- Davis, J.R. y Morris, R.N. (1963) *Am. J. Physiol.* 205, 833
- Delhumeau-Ongay, G., Trejo-Bayona, R. y Lara-Vivas, L. (1973) *J. Reprod. Fert.* 33, 513
- Delhumeau-Ongay, G., Trejo, R., Alonso, R. y Hernández, H. (1982), XII Congreso Internacional de Bioquímica, Perth Australia. pp 95.
- De Martino, C., Floridi, A., Marcante, M.L., Malorni, W., Scorza, E.P., Sallaci, M. y Silvestrini, B. (1979) *Cell Tissue Res.* 196, 1-22
- Dickens, F. y Simer, F. (1931) *Biochem. J.* 25, 985
- Firlit, C.F. y Davis, J.R. (1965) *Quart. J. Microscop. Sci.* 106, 93
- Free, M.J. (1970) en "The Testis", vol. II, p. 125, eds. Johnson, A.D., Gomes, W.R. y VanDemark, N.L. Academic Press, London.

- Free, M.J. y VanDemark, N.L. (1968) *Am. J. Physiol.* 214, 863
- Fritz, I.B. (1973) en "Current Topics in Cellular Regulation", vol. 7, p. 129, eds., Horecker, B.L. y Stadtman, E.R., Academic Press, London.
- Gómez-Puyou, A. (1981) *Arq. Biol. Tecnol.* 24, (2), 207-221.
- Hansford, R.G. (1980) en "Current Topics in Bioenergetics" vol. I, pp.
- Härkönen, M. y Kärmano, M. (1971) *J. Reprod. Fert.* 25, 29
- Hayashi, J.I. (1980) *Arch. Biochem. Biophys.* 205, 27-35.
- Hollinger, M.A. y Davis, J.R. (1968) *J. Reprod. Fert.* 17, 343
- Hoocker, C.W. (1970) en "The Testis", vol. I, p. 483, eds., Johnson, A.D., Gomes, W.R. y VanDemark, N.L., Academic Press, London.
- Hoskins, D.D. y Stephens, D.T. (1969) *Biochim. Biophys. Acta*, 191, 292
- Katzen, H.M. (1966) *Adv. Enz. Reg.* 5, 335
- Kačela, Š., Kolarov, J., Krempaský, V., Lakota, J. y Uhlazy, U. (1978) *FEBS Lett.* 91, 222-226.
- Lacy, D. (1962) *Erit. Med. Bull.* 18, 205
- Lacy, D. y Lofts, B. (1962) *Physiol. (London)*, 161, 23
- Lacy, D., Lofts, B., Kinson, G., Hopkins, D. y Dott, H. (1965) *Endocrinol.* 5, 693
- Leiderman, B y Mancini, R.E. (1968) *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 128, 818
- Linford, E. (1968) *Biochem. J.* 110, 45 p.
- Machado de Domenech, E., Domenech, E., Aoki, A. y Blanco, A. (1972) *Biol. of Reprod.* 6, 136
- Mancini, R.E., Nolasco, J. y De la Balze, F.A. (1952) *Anat. Record.* 114, 27

- Means, A.R. y Hall, P.F. (1968) *Endocrinology*, 83, 86.
- Morton, B.E. y Lardy, H.A. (1967) *Biochem.* 6, 43-49.
- Penefsky, H.S. (1979) en "Advances in Enzimology and Related Areas of Molecular Biology" (Meister, A., ed.), vol. 49, p. 223-280. John Wiley and Sons, Inc., New York.
- Schatz, G. (1968) *J. Biol. Chem.* 243, 2192-2199.
- Schmidt, F.C. (1964) *Anat.* 63, 707
- Satchell, B.P. (1970) en "The Testis", vol. 1, p. 101, eds., Johnson, A.D., Gomes, W.R. y Van Demark, N.L., Academic Press, London.
- Sosa, A., Altamirano, E., Hernández, P. y Rosado, A. (1972) *Life Sciences II*, part II, 499
- Tarada, H. (1961) *Biochim. Biophys. Acta*, 639, 225-242.
- Vázquez-Memije, M.E. (1974) Tesis profesional, Facultad de Química-UNAM.
- Vilar, O., Pérez del Cerro, M.I. y Mancini, R.E. (1962) *Exptl. Cell Res.* 27, 158.
- Van Dop, C., Hutson, S.M. y Lardy H.A. (1978) *Arch. Biochem. Biophys.* 187, 235-242.