

720661



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

188

POSIBLE REGULACION DE LA GLICOLISIS EN EL TESTICULO DE LA RATA A TRAVES DEL CONTROL DE SUS ATPASAS

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
ORIENTACION BIOQUIMICO MICROBIOLÓGICA
P R E S E N T A
ALICIA VALADEZ SALAZAR

1978



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 esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
 TESIS 1978
 M.T. 4229 2122
 FECHA _____
 DOC _____

POSIBLE REGULACION DE LA GLICOLISIS
 EN EL TESTICULO DE RATON A TRAVES
 DEL CONTROL DE LA TEMPERATURA



T E S I S
 QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
 QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
 ESPECIALIZACION BIQUIMICO MICROBIOLOGICA
 P R E S E N T A
 ALICIA VALADEZ CALAZAR

1978

JURADO ASIGNADO

Presidente	Q.F.B. Maria Luisa García Padilla
Vocal	Q.F.B. Paulina Castro Ardon
Secretario	Dra. Graciela Delhumeau de Ongay
1 ^{er} Suplente	M. en C. Dolores Lastra Azpilicueta
2 ^o Suplente	Dra. Beatríz Medina Jiménez

Sitio donde se desarrolló la tesis:

Laboratorio de Hormonas Protéicas, Subjefatura de Investigación
Básica, Centro Médico Nacional, IMSS.

Sustentante Alicia Valadez Salazar Alicia Valadez Salazar

Asesor del Tema Graciela Delhumeau de Ongay Graciela Delhumeau de Ongay

A MIS PADRES

A MIS HERMANOS

A MIS AMIGOS

Mi más profundo agradecimiento a la Dra. Graciela Delhumeau de Ongay por la dirección de este trabajo y las enseñanzas recibidas durante el mismo.

También quiero agradecer al Dr. Adalberto Parra su apoyo y a mis compañeros de laboratorio su colaboración y ayuda.

Agradezco a Silvia Alatorre la realización del análisis estadístico de los datos y a la Sra. Ma. Cristina Heredia Urbina su asistencia secretarial.

Este trabajo fue realizado con ayuda de la Fundación Ford y del Instituto Mexicano del Seguro Social.

C O N T E N I D O

	Pag
INTRODUCCION	1
MATERIAL Y METODOS	9
RESULTADOS	17
DISCUSION	26
RESUMEN Y CONCLUSIONES	35
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	38

INTRODUCCION

El testículo es un órgano que forma parte del aparato reproductor masculino que se destaca por funcionar como glándula mixta, endócrina y exócrina (35). La primera función reside fundamentalmente en el tejido intertubular y la segunda en los túbulos seminíferos. En éstos se localiza el epitelio germinal, que es una población celular altamente organizada en combinación con las células de Sertoli. La población de células de los túbulos seminíferos es una de las más elaboradas y complicadas organizaciones en la arquitectura del cuerpo humano.

Las células germinales se presentan fundamentalmente en 4 tipos o estadios de maduración: espermatogonias, espermatocitos, espermátides y espermatozoides (19). La diferenciación de dichas células es un evento de cronología muy precisa y específica para cada especie. El resultado de esta diferenciación celular, llamada espermatogénesis, es el espermatozoide, que con el fluido testicular, es el producto final de la función exócrina del testículo (63).

Los túbulos seminíferos, que albergan a las células de Sertoli y al epitelio germinal, se encuentran limitados por las células de la membrana basal (26). Adheridas a ella, se encuentran las células de Sertoli (15-20% de la población celular testicular) (1). Estas engloban a una parte considerable de las células germinales y se unen entre sí por uniones herméticas que no permiten el paso libre de sustancias a las células germinales y forman una barrera hematotesticular (26,57,64,66). Mantienen con las células germinales una estrecha intimidad y se les ha atribuido, entre otras, funciones de actividad nutricia y fagocitaria en relación con ellas (26). Las espermatogonias, que son las células más primitivas del epitelio germinal, se localiz

zan en la periferia de la membrana basal, alternando con las células de Sertoli. Se encuentran fuera de la barrera hematotesticular y son células diploides que dan lugar a los espermatocitos primarios. En la rata, éstos aparecen en sus primeras fases a los 9 a 10 días de edad. Los espermatocitos primarios representan la primera división meiótica, caracterizada por una larga profase en la que es posible distinguir diferentes tipos de espermatocitos: preleptotene, leptotene, zigotene, paquitene y diplotene (17). La segunda división meiótica sucede en los espermatocitos secundarios, cuya vida media es muy breve, para dar a continuación las espermátides, que son células haploides que ya no se dividen y que en el proceso llamado espermiogénesis se diferencian en 19 estadios distinguibles morfológicamente (45), culminando con los espermatozoides. En general, la espermatogénesis de la rata albina de 21 días de edad contiene dos poblaciones de células, las espermatogonias y los espermatocitos primarios y es hasta los 23 a 26 días de edad cuando empiezan a aparecer las espermátides. Las espermátides, que son las células más abundantes (constituyen aproximadamente el 60% de la población celular testicular (1,16)), se diferencian hasta la etapa de espermatozoides entre los 23 y los 40 a 45 días de edad (17), en que éstos son empujados hacia la luz del túbulo y expulsados con la participación activa de las células de Sertoli en el proceso denominado espermiación (26).

Los túbulos seminíferos carecen de vasos linfáticos y capilares en su interior (63). El tejido intertubular está constituido por las células de Leydig, tejido conectivo, vasos linfáticos y sanguíneos (63). Las células de Leydig tan sólo constituyen el 3% de la población celular testicular y en ellos reside la función endócrina del mismo, como es la producción de andrógenos (35).

La vascularización del tejido intertubular y la ausencia de ella en el intratubular, plantean una diferencia en la disponibilidad que tienen ambos tejidos, tanto de nutrientes como de oxígeno.

Es de interés señalar que en la mayoría de los mamíferos, el proceso de la espermatogénesis se lleva a cabo a una temperatura inferior a la del resto del cuerpo (75), ya que en ellos, los túbulos se localizan fuera del abdomen, en el escroto (75) La diferencia en temperatura es mantenida por un mecanismo de enfriamiento vascular en el escroto. Numerosos investigadores han registrado temperaturas intratesticulares en mamíferos adultos incluyen do la rata. Los valores informados para el testículo de la rata varían de 29°C a 35°C, señalándose una diferencia de 3°-5°C entre las temperaturas abdominal y testicular (40). Esta diferencia en temperaturas, se ha encontrado ser esencial para una espermatogénesis normal. Una alteración en la temperatura normal, sea por criptorquidia* u otras causas, se traduce en la destrucción de una gran parte del epitelio germinal (9,36,46,51) y en alteraciones importantes del metabolismo testicular (28,51).

Sin embargo, es importante señalar que el testículo, al nacimiento, se encuentra localizado particularmente en el abdomen y que va descendiendo a su localización escrotal durante la infancia, coincidiendo al final de este descenso con la formación de la barrera hemato-testicular, cuando los espermatoцитos primarios del tipo paquitene hacen su aparición en la parte interior - de esta barrera de permeabilidad (55).

Es conveniente aunar las características anatómicas y ambientales con la llegada y tipo de nutrientes para comprender mejor las peculiaridades fisiológicas del testículo.

*ubicación abdominal

Por lo menos hay tres principales compartimentos fluídos en el testículo por los que pueden entrar o salir nutrientes o sustancias de desecho de las células testiculares (63). El primer compartimento está formado por el suministro de sangre de la arteria testicular a través de la red capilar en el tejido intersticial. El segundo es el fluído intersticial entre los túbulos, que drena a vasos linfáticos y a grandes venas. El tercero es el fluído formado en los túbulos seminíferos, que sale a la luz de los mismos, va a drenar al fluído del rete testis* y se acepta, arrastra consigo productos del metabolismo de las células intertubulares (63).

La permeabilidad restringida de los túbulos puede ser importante en el mantenimiento de la composición única del rete testis y el fluído tubular y tiene significación endocrinológica en el proceso de la espermatogénesis (57,64,66).

La tensión de oxígeno en un tejido refleja a grandes rasgos, el balance entre el suministro y el consumo de oxígeno en el tejido. El fluído sanguíneo a través del testículo es menor comparado con el de otros órganos (68) y la baja temperatura escrotal también modifica la tensión de gas en el tejido (28). Mediciones en sangre venosa espermática de tensión de oxígeno, indican que el medio ambiente interno del testículo puede ser hipóxico. Este factor puede proveer una limitación en el proceso de producción aeróbica de energía del testículo. Por lo tanto, se puede esperar un camino glicolítico eficiente o un anaeróbico para la producción de energía, especialmente en aquellas células situadas hacia la luz del túbulo, las cuales están más lejos del aporte sanguíneo (27). Esto es, de hecho, lo que sucede en el testículo.

El testículo maduro depende fundamentalmente de la glucosa exógena para man-

*red testicular

tener su metabolismo energético (27). Una hipoglicemia inducida por insulina en ratas adultas, se traduce en un daño externo al epitelio germinal, con gestión y edema del intersticio y vacuolización de las células de Sertoli (53).

A pesar de utilizar preferentemente la glicólisis, no es ésta la única vía de oxidación de la glucosa en el testículo. Puede oxidarse en un 0.5% por la vía colateral de las pentosas y la producción de $^{14}\text{CO}_2$ a partir de glucosa ^{14}C (29) acompañada de un consumo de oxígeno, señala un funcionamiento del ciclo de Krebs. Sin embargo, se desconoce a qué grado participan las mitocondrias en el metabolismo energético, ya que además de mostrar una morfología muy peculiar⁽²⁾, en trabajo reciente de nuestro laboratorio se ha demostrado que por lo menos una parte de su ATPasa, que normalmente es responsable de la síntesis de ATP, se encuentra laxamente unida a la membrana (23), característica poco compatible con una eficiente función en el sentido Mitchelliano.

La característica del testículo de tener glicólisis aeróbica elevada, es de particular interés. El grado de glicólisis aeróbica que lleva a cabo un tejido, corresponde a los niveles de lactato que a partir de glucosa produce en presencia de oxígeno. El testículo en estas condiciones, produce gran cantidad de lactato, cosa que realizan pocos tejidos normales del organismo, tales como la retina y el cerebro (52). Es, sin embargo, una característica metabólica de las células tumorales (60,77). Se ha observado que en el testículo la glucosa causa una estimulación de la producción aeróbica y anaeróbica de lactato, aunque no se sabe el porcentaje de participación de la glicólisis aeróbica en el metabolismo energético del testículo in vivo. Cabe señalar aquí el hecho, quizá debido entre otros factores, a que la temperatura testicular es

menor a la de los demás tejidos, de que contiene gran cantidad de isoenzimas específicas. Por ejemplo, es notable la existencia de la deshidrogenasa láctica -x (LDH-x) específica del testículo (5,10,15), la cual se encuentra en mayor proporción que las demás isoenzimas lácticas. La LDH-x aparece a los 20 a 30 días de edad en la rata (7,8) coincidiendo con la aparición de la barrrera hemato-testicular (55). Es inhibida por altas concentraciones de piruva to y no se inhibe a altas concentraciones de lactato (4,6,20,24) lo que explica que el testículo produzca grandes cantidades de lactato a partir de - glucosa, que ya se señaló, es el sustrato exógeno esencial del testículo adulto.

La velocidad con que funciona un camino metabólico como la glicólisis, es regulada por múltiples factores. Entre ellos destaca, por su importancia, la existencia de enzimas "marcapaso", de las cuales es un ejemplo la fosfofructocinasa (13,38). Esta enzima es inhibida por altos niveles de ATP y es estimulada por ADP y fosfato inorgánico (13,38), sugiriendo que los niveles intracelulares de estos nucleótidos, al regular la actividad de esta enzima, son, a su vez, factores importantes en la regulación de la velocidad de la glicólisis (6). La relación entre los niveles de ATP y ADP refleja el "estado energético" de la célula y es éste y no la concentración de nutrientes quien marca la dirección del metabolismo de los mismos hacia el catabolismo o el anabolismo (47), en algunos casos por mecanismos como el descrito para la fosfofructocinasa.

La velocidad de la vía glicolítica, es, en la mayor parte de los tejidos, -- afectada por la concentración celular de oxígeno, ya que se ha demostrado que al pasar una célula de condiciones anaeróbicas a condiciones de aerobiosis,

generalmente disminuye la utilización de la glucosa y se observa una inhibición de la producción de lactato (60,77). A la suma de estos dos fenómenos, se les ha llamado efecto Pasteur y es ampliamente reconocido que se trata de una interacción de dos compartimentos celulares, el intra y el extra mitocondrial, de mecanismo muy complejo y que dista mucho de ser bien conocido (60, 77).

El testículo lleva a cabo el consumo de glucosa acompañado de una apreciable producción de lactato aún incubado en condiciones aeróbicas (48), lo que implica que tiene un efecto Pasteur deficiente. Esta falla podría también estar relacionada con el funcionamiento un tanto peculiar de sus mitocondrias (23).

Además se sabe que el testículo contiene ATPasas muy elevadas, al compararlo con otros tejidos normales (21,22). Esta actividad de hidrolizar ATP está en relación con la maduración del epitelio germinal (22), presentándose un máximo a los 22-25 días de edad de las ratas, es decir inmediatamente antes de completarse la meiosis y disminuyendo progresivamente hasta el momento de -- iniciar la madurez sexual, a los 40-45 días de edad.

Pensando en términos de economía, no es fácil encontrar una explicación a este fenómeno, ya que, si el testículo obtiene una buena parte de su energía por la glicólisis, que tiene un rendimiento energético muy pobre (2 ATP/mol de glucosa), es poco congruente que manifieste actividades enzimáticas tan elevadas que hidrolizan el ATP.

En células tumorales coinciden también estos dos hechos (30,72,77). Racker planteó la hipótesis de que, ya que el producto de la reacción catalizada por ATPasas es ADP y fosfato inorgánico y estos son los activadores de la glicó-

lisis a través de su efecto sobre la fosfofructocinasa y otras enzimas similares, es necesario para estas células sacrificar parte del ATP producido - por esta vía para poder mantenerla activa (72). Para demostrar esta relación entre la actividad de ATPasas y la glicólisis, estudió la producción de lactato en presencia de diferentes inhibidores de ATPasas, demostrando que en diferentes tipos de células tumorales, una o varias ATPasas participaban en la regulación de la glicólisis (71,72).

Nos ha parecido de interés intentar establecer si esta regulación de la glicólisis por ATPasas es una característica exclusiva de células tumorales o si puede hacerse extensiva a células normales que manifiesten la coexistencia de glicólisis aeróbica y de ATPasas elevadas, como es el caso del testículo.

En el presente trabajo se establecieron las condiciones óptimas para determinar la producción de lactato (producto final de la glicólisis), por fragmentos de testículo de rata en diversas etapas de maduración del epitelio germinal, en condiciones anaeróbicas y aeróbicas.

Una vez estandarizada la metodología, se estudió el efecto, sobre la producción de lactato, de inhibidores informados en la literatura como específicos de algunas ATPasas, a saber: oligomicina, inhibidor de ATPasas mitocondriales (44), Ouabaína, inhibidor de la ATPasa dependiente de Na^+ y K^+ (11), quercetina, inhibidor de la porción F_1 de la ATPasa mitocondrial y de otras ATPasas membranales (42,61).

MATERIALES

- ✓ Glucosa (anhidra) - Merck
- ✓ Deshidrogenasa láctica (LDH) de músculo de conejo, de 450 U/mg (5 mg/ml)-
Böehringer.
- ✓ Acido L(+) láctico (ácido libre) - Sigma Chemical, Co.
- ✗ Quercetina (anhidra) - Sigma Chemical, Co.
- ✗ Oligomicina (15% oligomicina A, 85% oligomicina B) - Sigma Chemical, Co.
- ✗ Ouabaína (octahidrato) - Sigma Chemical, Co.
- ✓ 2,4 - Dinitrofenol (DNP) - Sigma Chemical, Co.
- ✗ Carbonil-cianuro-p-trifluorometoxifenil hidrazona (FCCP)- Donativo del Dr.
Antonio Peña, del Departamento de Biología Experimental, Instituto de Biología, UNAM.
- ✓ Mezcla de carbógeno (95% de O_2 , 5% de CO_2) - Infra, S.A.
- ✓ Nitrógeno (N_2 puro) - Infra, S.A.
- ✓ Sacarosa - Backer.
- ✓ Trifosfato de adenosina, sal disódica (ATP) - Sigma Chemical, Co.
- ✓ Clorhidrato de trietanolamina (TEA) - Calbiochem.
- ✓ Tris - (hidroximetil amino metano), (Tris) - Sigma Chemical, Co.
- ✓ Sal tetrasódica del ácido etilen diamino tetraacético (EDTA) - Eastman Organic Chemicals.
- ✓ Albúmina bovina (cristalina) - Calbiochem.
- ✓ Se usaron ratas machos albinas, de la cepa Sprague Dowley, de 21 y 38 días de edad, así como ratas adultas de 250 g de peso aproximadamente, proporcionadas por el Bioterio de la Subjefatura de Investigación Básica del Centro Médico Nacional, alimentadas ad libitum con purina chow.

METODOS

I. INCUBACION DE FRAGMENTOS DE DIVERSOS TEJIDOS.

1. Obtención de los fragmentos de tejidos.

Las operaciones que se describen a continuación, se llevaron a cabo en un laboratorio frío a 4°C y las soluciones fueron enfriadas a 0°C en hielo.

A. Testículo.

Se utilizaron de 2 a 20 animales en cada experimento, dependiendo del peso de los testículos, que varía en función de la edad. Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical y decapitados para exanguinarlos al máximo posible. Los testículos fueron extraídos rápidamente y sumergidos en solución salina G isotónica pH. 7.4 (composición mM: NaCl, 137, KCl, 5.5, KH₂PO₄,

1.1, Na₂HPO₄, 1.1, MgSO₄, 0.63). Por disección, se les despojó de la túnica albugínea y de los vasos sanguíneos gruesos, secándolos suavemente sobre papel filtro Whatman No. 40 para eliminar el exceso de líquido y poder pesar el tejido húmedo.

B. Cerebro.

Se usaron tres ratas de 21 días de edad en cada experimento. Fueron sacrificadas por decapitación y rápidamente se retiró la piel que cubría la parte superior de la cabeza, para dejar el cráneo libre. Se cortó el hueso del cráneo por la mitad con tijeras pequeñas, tratando de no tocar el cerebro. Con unas pinzas se separaron cada una de las mitades del hueso. El cerebro ya libre, se desprendió cuidadosamente y fue sumergido en solución salina G. La parte utilizada para las incubaciones, fue la corteza cerebral (substancia gris) que se obtuvo por cortes de 1.5 mm a cada lado de los ló-

bulos cerebrales, por medio de un bisturí. Se eliminó el exceso de líquido, secando el tejido sobre papel filtro para pesarlo posteriormente.

C. Corazón.

Se utilizaron dos ratas adultas en cada experimento. Fueron sacrificadas por dislocación cervical y posterior decapitación para exanguinar al máximo posible. Se retiró la piel que recubría el tórax y se hizo un corte en el esternón y costillas, dejando libre el corazón. Rápidamente se perfundió con 10 ml de solución salina G por medio de una jeringa, introduciendo el líquido por las venas que llegan al corazón. Posteriormente fue desprendido y sumergido en solución salina G donde fue picado en fragmentos de 3 mm aproximadamente. Se retiró el exceso de líquido, secando suavemente el tejido sobre papel filtro antes de pesarlo.

D. Músculo esquelético.

Se utilizaron tres ratas de 21 días en cada experimento. Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical.

Se hizo un corte de la piel en la parte posterior de las patas traseras, dejando al descubierto el tejido muscular. Se cortaron los extremos de los músculos gastrocnemio y sóleo y con ayuda de unas pinzas, se sumergieron en solución salina G, donde se picaron. Se retiró el exceso de líquido, secando los fragmentos sobre papel filtro antes de pesar la cantidad deseada.

2. PROCEDIMIENTO DE INCUBACION DE LOS FRAGMENTOS DE TEJIDO.

3 { En una balanza Roller-Smith de dos platillos, se pesaron aproximadamente 50 mg de tejido para cada uno de los frascos de incubación, de fondo plano, de 8 ml de capacidad. Estos contenían previamente un ml de la mezcla de in-

3 } cubación, con la siguiente composición: solución salina G, pH 7.4, en el caso de los controles, y solución salina G, pH 7.4, conteniendo glucosa 10 mM en los frascos con sustrato exógeno. Cuando se estudiaron inhibidores poco solubles en agua como la oligomicina, quercetina, 2,4-DNP y FCCP, se disolvieron en dimetil formamida. En esos experimentos, se hicieron los controles correspondientes del efecto del disolvente. La ouabaína fue disuelta en solución salina G ó en solución salina G conteniendo glucosa, según el caso. Todas estas sustancias fueron adicionadas después de los fragmentos de tejido e inmediatamente antes de iniciar las incubaciones. Todos los pasos anteriores se llevaron a cabo a 0°C. + Reactivo
- React

3 } Se colocaron los frascos en una incubadora de Dubnoff a la temperatura que se indicará en cada experimento. Se mantuvo una agitación de 100 r.p.m. y una aereación constante con una mezcla de O₂ 95%, CO₂ 5%, para los experimentos en aerobiosis, y en N₂ (nitrógeno puro), para los experimentos en anaerobiosis. El tiempo de incubación fue de 45 min, al término del cual la reacción se detuvo por la adición de 0.25 ml de HClO₄ al 30% a 0°C (concentración final, 6%). - React

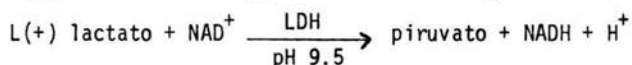
En el momento de iniciar la incubación de cada frasco, se agregó la misma -- cantidad de HClO₄ a otro, idéntico, que se utilizó para obtener el valor del tiempo cero.

Después de dejar reposar cada frasco 20 min a 0°C, se pasaron las muestras a tubos de centrifuga y se centrifugaron a 1500 x g, durante 10 min (centrifuga internacional PR-6 rotor 253) para separar el precipitado de macromoléculas. Después de decantar el sobrenadante, se guardó el precipitado a -20°C

para posterior determinación de proteínas. El sobrenadante se neutralizó a pH 7.0 con K_2CO_3 , 3.75 M, agitando rápidamente el tubo para eliminar el CO_2 formado en la reacción. El precipitado de $KClO_4$, se eliminó centrifugando a $1500 \times g$ durante 10 min y del sobrenadante así obtenido, se tomaron alícuotas para determinar ácido láctico.

II. DETERMINACION DE ACIDO LACTICO (METODO DE FELT-HANSEN AND SIGGAARD ANDERSEN (73)).

El método está basado en la reacción catalizada por la deshidrogenasa láctica (LDH), utilizando NAD^+ , de acuerdo a la siguiente reacción:



El desplazamiento de la reacción hacia la formación de piruvato, se favorece por el pH alcalino y por la adición de hidrazina que elimina el piruvato producido en forma de hidrazona. El NADH producido en la reacción, se midió espectrofotométricamente a 350 nm. En vista de la estequiometría de la reacción, la concentración de NADH producido, se consideró igual a la concentración de lactato en la muestra. Inmediatamente antes del análisis, los reactivos se mezclaron en tubos de ensaye, en el siguiente orden, (manteniéndolos a $0^\circ C$ hasta el momento de iniciar la incubación):

0.5 ml de arsenito de sodio 0.5 M, pH 9.5

23 μ l de solución de hidrazina 0.1 M

23 μ l de suspensión de LDH de 5 μ g/ml

50 μ l de solución de NAD^+ 27 mM

} react.

Se adicionaron a la mezcla 0.1 ml de agua para el tubo blanco y una alícuota de 0.1 ml de sobrenadante neutralizado para los problemas; volumen final de 0.7 ml.

La incubación se llevó a cabo a temperatura ambiente por un lapso de 60 minutos exactamente. La absorbancia fue leída a 350 nm en un espectrofotómetro de doble rayo Hitachi Perkin-Elmer.

Para obtener la curva estándar de lactato, se utilizó una solución de ácido L(+) láctico 1 mM en HClO₄ al 6%, incluyéndose en cada experimento, las siguientes cantidades:

0, 11,5, 23.1, 46.21, 69.31 y 92.41 nmoles de lactato respectivamente por celdilla (0.7 ml).

III. PREPARACION DEL HOMOGENEIZADO TOTAL DE TESTICULO DE RATA.

El número de animales varió de 2 a 5, según la edad y peso de los testículos para reunir aproximadamente 3 g de tejido húmedo. Los animales se sacrificaron por dislocación cervical y fueron decapitados para exanguinarlos al máximo posible. Los testículos fueron extraídos rápidamente y sumergidos en un medio isotónico amortiguado (sacarosa 0.25 M, EDTA 0.05 mM, trietanolamina 3 mM, pH 7.4). Posteriormente se les quitó la túnica albugínea y los vasos sanguíneos gruesos, eliminando el exceso de líquido con papel filtro Whatman No. 40. Se pesaron en un vaso de precipitado de 30 ml de capacidad que contenía 5 ml del mismo medio. El tejido fue picado finamente con tijeras, en fragmentos de 2 a 3 mm, para homogeneizarlo posteriormente en un homogeneizador de Potter-Elvehjem durante 30 segundos, adicionando el volumen necesario de medio para lograr una concentración final de tejido del 10% P/V. Se filtró por lana de vidrio, constituyendo el llamado homogeneizado total. → cat.

De todas las preparaciones obtenidas, fueron conservadas alícuotas a -20°C para la posterior determinación de proteínas. Todas las manipulaciones

descritas fueron realizadas a 0°C.

IV. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE ATPasas.

Se empleó el método de Bonting (11) modificado (Delhumeau-Ongay y Col, (22), que permite medir el fosfato liberado en la reacción enzimática que hidroliza ATP. El medio de incubación utilizado fue: ATP, 2 mM, sacarosa, 200 mM, MgCl₂, 5 mM, tris, 25 mM, a pH 7.5, preparación enzimática, 0.05 ml, en un volumen final de 0.5 ml. La temperatura de incubación fue de 37°C. Los tubos de incubación se procesaron por triplicado, iniciando la reacción al adicionar el sustrato al medio de incubación. Se incubó durante 0, 1 y 2 minutos. [Cuando se estudió el efecto de quercetina, ésta se adicionó disuelta en dimetil formamida, después de la preparación enzimática e inmediatamente antes de iniciar la reacción, haciendo los controles correspondientes del efecto del disolvente]. La reacción se detuvo por la adición de 2.5 ml de -- HClO₄ al 6% (concentración final 5%) a 0°C. Después de dejar reposar 20 min a 0°C, los tubos fueron centrifugados a 1500 x g durante 10 min en una centrífuga internacional PR-6 rotor 253 y decantados. En 1.5 ml del sobrenadante, se determinó el fosfato inorgánico (Pi) por el método colorimétrico de Bonting y Col, (11), basado en la formación de un complejo colorido entre el fosfato, el sulfato ferroso y el molibdato de amonio, en medio ácido. La concentración de fosfato inorgánico, se determinó a partir de una curva estándar de fosfato disódico, expresando los resultados como μ moles de Pi producido/10 min/mg de proteína.

V. DETERMINACION DE PROTEINAS.

En todos los experimentos se efectuaron las determinaciones de proteínas

por triplicado, usando el método de Hartree (37). Para la curva estándar - de proteínas, se utilizó una solución de 100 $\mu\text{g/ml}$ de albúmina cristalina, incluyendo las siguientes concentraciones: 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 y 50 μg de proteína por tubo de reacción, en un volumen final de 2.5 ml.

VI. ANALISIS ESTADISTICO.

Todos los resultados fueron analizados estadísticamente por el método de la "t" independiente de Student con el fin de detectar significancia entre los controles, los controles con disolvente y los adicionados con inhibidores (18).

Además, en el caso de los experimentos en que se midió la producción de lactato, se analizaron los resultados por el método de varianza múltiple y por el método de Tukey (18).

R E S U L T A D O S

Con el objeto de establecer las condiciones más adecuadas para estudiar la producción de lactato por testículo de rata, se hicieron algunos experimentos preliminares. Se efectuaron inicialmente con testículo de rata adulta, que proporcionaba una mayor cantidad de tejido. Se revisaron las condiciones para la determinación de lactato, de acuerdo a la técnica mencionada en "Métodos".

Inicialmente se obtuvieron gráficas de densidad óptica, variando la longitud de onda, de cada uno de los reactivos que intervenían en la determinación de lactato, con el objeto de detectar si el máximo de absorción del NADH, tenía interferencia con alguno de los demás reactivos. La figura 1 muestra que no hubo tal interferencia. Se hicieron curvas de determinación de lactato en función del tiempo, con el objeto de definir el momento en el que se pudiera detectar enzimáticamente la totalidad del lactato producido. La figura 2 muestra que 60 minutos era tiempo suficiente para terminar la reacción. En la figura 3, se muestra una curva estándar de lactato con 60 minutos de incubación.

Debido a que la solución estándar de lactato era estable por mayor tiempo en medio ácido, fue necesario neutralizarla en el momento de usarla. Se efectuó el mismo procedimiento de neutralización en el sobrenadante de los frascos de incubación, antes de la adición de LDH.

Igualmente se establecieron las condiciones adecuadas para efectuar las incubaciones de los fragmentos de tejido.

ESPECTROS DE ABSORCION DE LOS REACTIVOS QUE
INTERVIENEN EN LA DETERMINACION DE LACTATO

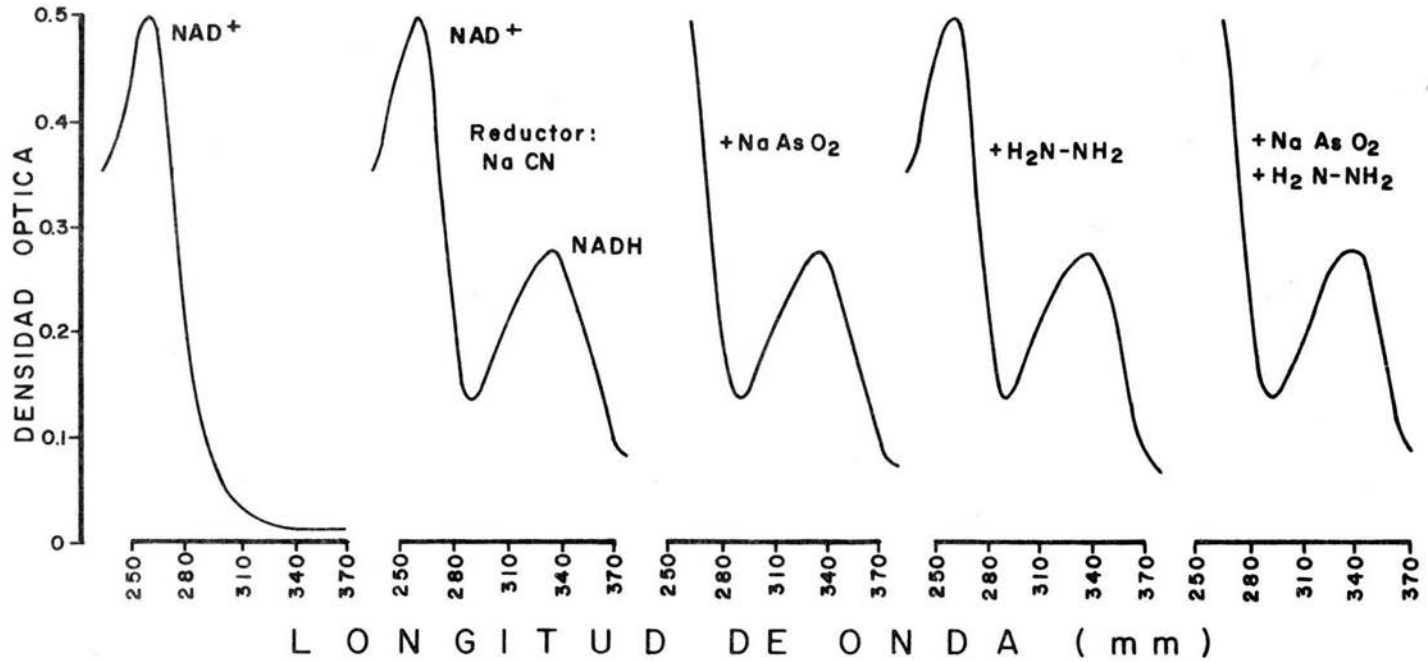


FIGURA 1

DETERMINACION DE LACTATO ESTANDAR
EN FUNCION DEL TIEMPO

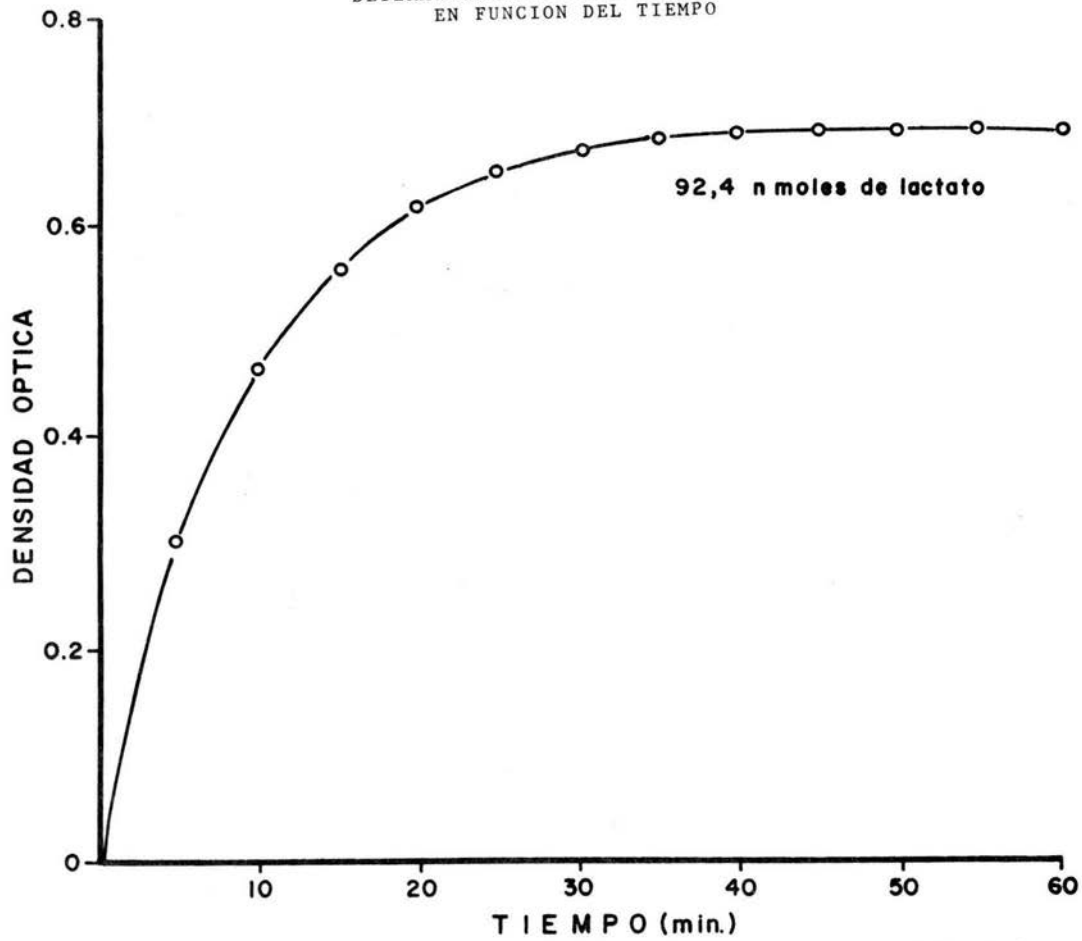


FIGURA 2

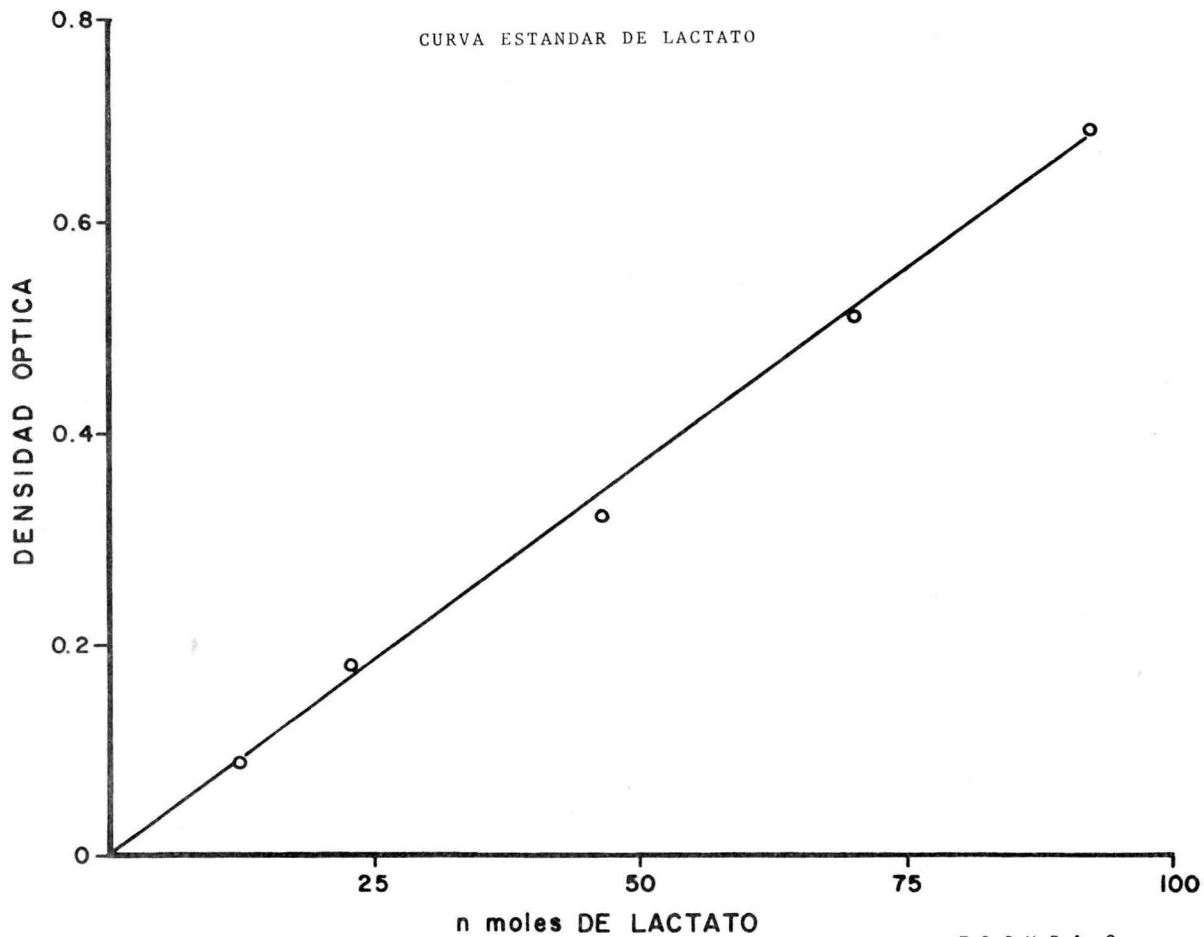


FIGURA 3

Se hicieron algunos experimentos en los que se varió la cantidad de tejido en un volumen fijo de incubación, tratando de que no fuera muy grande, pues tenía que tomarse en cuenta que más adelante se usarían ratas pequeñas, las cuales proporcionan menor cantidad de tejido. El peso húmedo/testículo (1) en cada edad estudiada, se muestra en la tabla 3. Se encontró que con 50 mg de tejido y un ml de volumen de medio de incubación, se obtenía una producción de lactato a una concentración que correspondía a la parte media de la curva estándar de lactato. Además se observó que si se usaba una mayor cantidad de tejido, la producción de lactato ya no era proporcional a la cantidad de tejido. Se escogió un ml de volumen de medio de incubación, ya que alcanzaba a cubrir perfectamente el fragmento de tejido y no hubo el caso de que se diluyera demasiado el lactato producido.

Se llevaron a cabo incubaciones de fragmentos de tejido a diversos tiempos, de cero hasta tres horas, observándose una disminución del volumen del medio de incubación a partir de los 60 minutos. En base a estos experimentos, se escogió 45 minutos como tiempo de incubación, en el cual había una disminución de volumen poco apreciable y además una velocidad lineal de producción de lactato a partir de glucosa exógena (fig. 4). Los valores mostrados corresponden a la diferencia del lactato producido en presencia y en ausencia de glucosa en cada tiempo señalado.

Se fijó una temperatura de incubación de 32°C para testículo y de 37°C para los demás tejidos, de acuerdo con las temperaturas fisiológicas de cada uno, a pesar de que cuando se incubó testículo a 37°C, se observó una mayor producción de lactato (fig. 5).

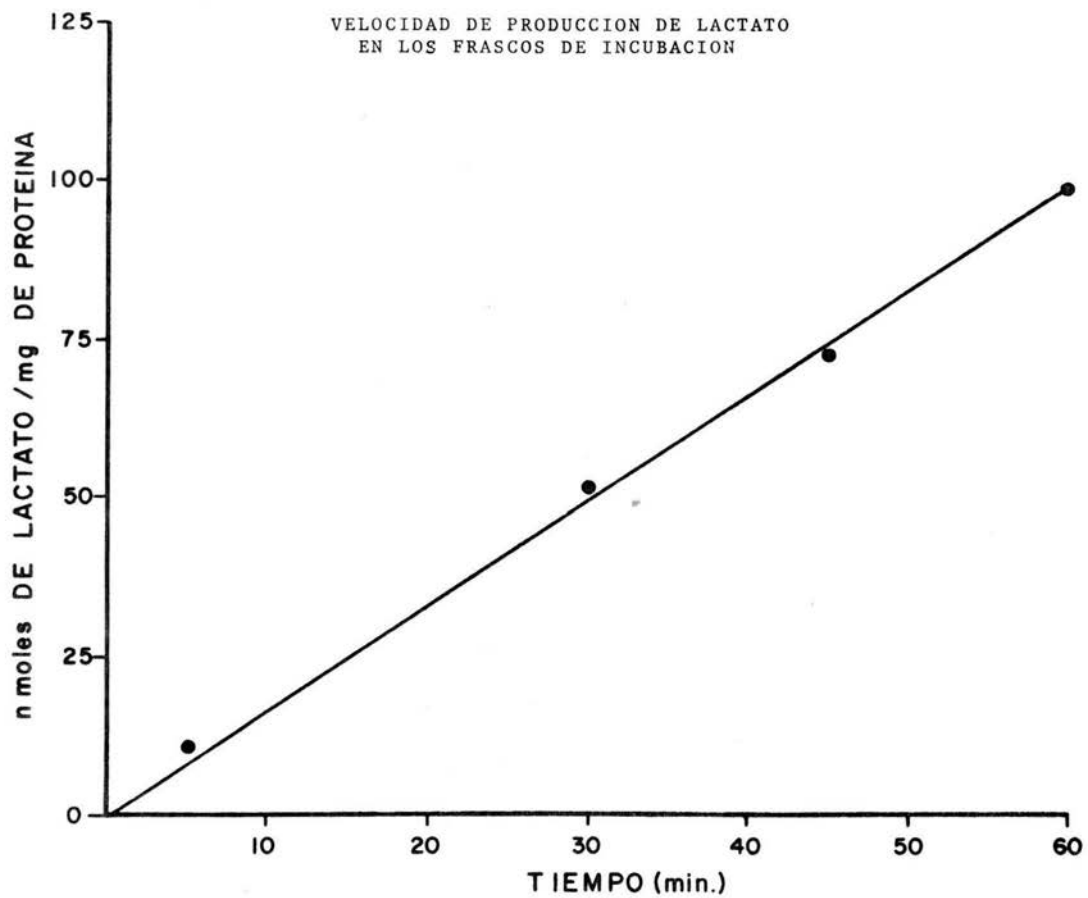


FIGURA 4

PRODUCCION DE LACTATO EN RATAS DE DIFERENTES EDADES
EN FUNCION DE LA TEMPERATURA DE INCUBACION

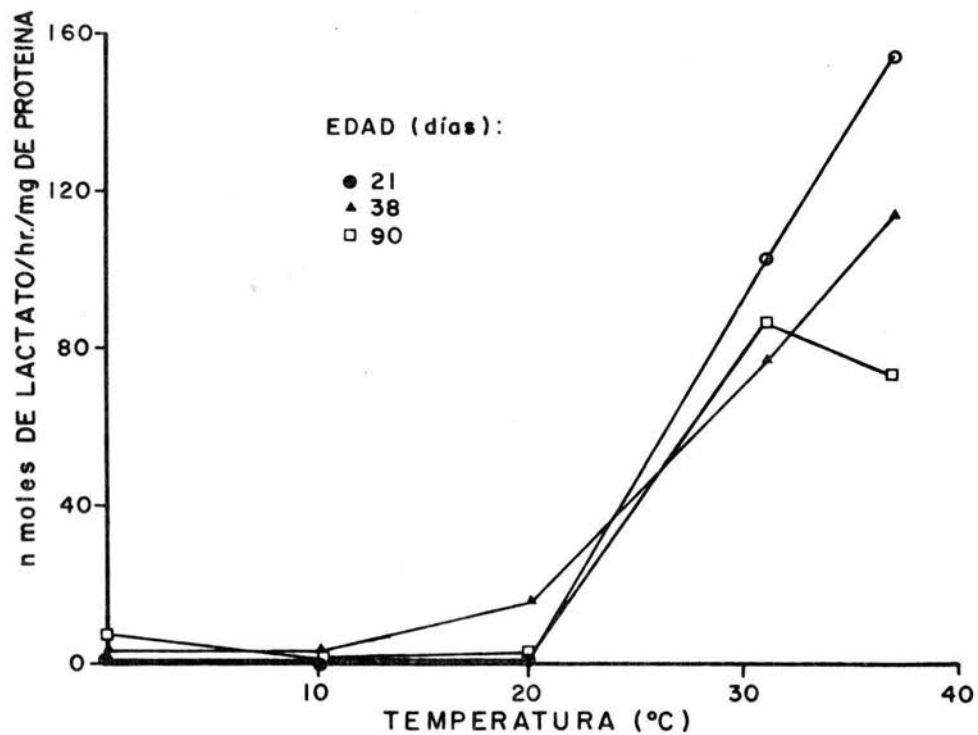


FIGURA 5

Se decidió llevar a cabo las incubaciones en agitación constante, fijando una agitación de 100 r.p.m., en la cual los fragmentos de tejido tenían un movimiento suave, al mismo tiempo que permitía cierta homogeneización constante del medio de incubación.

PRODUCCION DE LACTATO POR FRAGMENTOS DE DIFERENTES TEJIDOS

Para tener un marco de referencia al estudiar la producción de lactato por fragmentos de testículo, se seleccionaron como tejidos de comparación, el cerebro, que también tiene glicólisis aeróbica (52), el corazón, que se sabe inhibe su producción de lactato en aerobiosis (56) y el músculo esquelético, que con facilidad funciona como tejido anaeróbico (56).

Los resultados se muestran en la tabla 1. La producción de lactato ocurrió en muy diversa proporción en los tejidos en estudio bajo las distintas condiciones experimentales, que se analizan a continuación.

a) Efecto de glucosa.

La diferencia de producción de lactato en presencia y en ausencia de glucosa (Δ), fue notable en el cerebro y en el testículo, muy pequeña en el corazón y en el músculo esquelético en anaerobiosis y casi nula en ambos en aerobiosis.

Estos resultados indican la gran dependencia de glucosa, como sustrato exógeno, que es sabido tiene tanto el cerebro como el testículo (30). Esta dependencia es mucho menor en el corazón y, finalmente se sabe que el músculo esquelético utiliza preferentemente el glucógeno (33).

T A B L A 1

Producción de lactato por fragmentos de tejido de rata*.

Tejido	temperatura de incubación °C	Sustrato	Anaerobiosis			Aerobiosis		
			Endógenos	Glucosa	Δ	Endógeno	Glucosa	Δ
Cerebro**	37		32.9 +11.8 n=3	231.6 +32.4 n=3	198.7 +22.0	0.0 n=3	151.6 +25.9 n=3	151.6
Testículo**	32		36.82 +11.5 n=6	220.9 +39.1 n=5	212.9 + 9.8	3.9 +3.0 n=9	81.9 +17.1 n=9	79.7 +13.4
Corazón***	37		18.3	44.5	26.2	0.0	0.5	0.5
Músculo** esquelético	37		134.5 +13.13 n=2	142.6 + 8.7 n=2	11.1 +4.44	101.7 + 9.76 n=2	102.9 +10.17 n=2	1.2 +1.1

* nmoles de lactato/hora/mg de proteína, ± D.S.

n=número de experimentos.

** 21 días de edad.

*** adultas.

b) Influencia de la fase gaseosa. Efecto Pasteur.

Los valores de lactato producido en anaerobiosis fueron mayores que los obtenidos en aerobiosis en todos los tejidos. En las dos condiciones, la producción de lactato fue más alta en cerebro, testículo y músculo esquelético, que en el corazón. La presencia de oxígeno fue totalmente inhibitoria para la producción de lactato en el corazón y parcialmente inhibitoria para los otros tejidos.

Esta inhibición puede expresarse mejor en términos de Efecto Pasteur, definido como la inhibición del consumo de glucosa y cesación de acumulación de lactato debido al consumo de oxígeno (60).

Al no depender del consumo de glucosa, es obvio que el músculo esquelético no llena los requisitos de un efecto Pasteur. El efecto Pasteur de los otros tres tejidos en estudio, se muestra en la tabla 2. Los valores mostrados, son resultados del siguiente cálculo:

$$\text{Efecto Pasteur} = 100 \times \frac{\text{lactato en anaerobiosis} - \text{lactato en aerobiosis}}{\text{lactato en anaerobiosis}}$$

En la columna A de la tabla 2, se utilizaron los valores de la tabla 1, en presencia de glucosa. En la columna B, los de la diferencia obtenida en presencia y en ausencia de glucosa. Puede verse que ambas columnas muestran valores del mismo orden de magnitud.

En el corazón, la presencia de oxígeno, inhibió totalmente la producción de lactato. En el testículo, la inhibición fue parcial (alrededor del 60%) y en el cerebro, fue pequeña (alrededor del 30%).

EFEECTO DE LA EDAD DEL ANIMAL EN LA PRODUCCION DE LACTATO

Se seleccionaron para este estudio 21, 38 y 90 días de edad, respectivamente.

A los 21 días de edad, el epitelio germinal incluye todos los tipos de espermátocitos primarios, pero ninguna espermátide. A los 38 días de edad, incluye espermátides hasta el estadio 14 de Clermont, pero no han aparecido los espermatozoides. A los 90 días de edad, las ratas son adultas y la espermatogénesis es completa (45). La tabla 3 muestra la producción de lactato a partir de glucosa por fragmentos de testículo de ratas de las tres edades mencionadas. Los valores mostrados, son el promedio de n experimentos \pm Desviación Estándar y representan la diferencia entre el lactato producido en presencia y en ausencia de glucosa.

En todos los animales se observó que en ausencia de oxígeno, la producción de lactato a partir de glucosa, fue mayor que cuando estuvo presente. No hubo una diferencia significativa entre las tres edades estudiadas tanto en aerobiosis como en anaerobiosis. Si se considera como 100% la producción de lactato en anaerobiosis, la producción en aerobiosis representa del 31 al 37% en las tres edades, lo que implica cerca de un 60% de inhibición de la producción de lactato debida a la presencia de oxígeno. (Efecto Pasteur).

En las ratas adultas, se encontró mayor variación en la producción de lactato, como lo demuestra el valor de la desviación estándar, por lo que en adelante, se prefirió trabajar en animales con testículos inmaduros (21 ó 38 días de edad).

T A B L A 3

Producción de lactato por fragmentos de testículo de ratas de diferentes edades

Edad (días)	Peso húmedo por testículo (g)	Fase gaseosa	Anaerobiosis nmoles de lactato/ hora/mg de proteína*	Aerobiosis nmoles de lactato/ hora/mg de proteína*	Efecto Pasteur %
21	<u>0.23</u> +0.05		<u>212.9</u> + 9.8 n=4	<u>79.7</u> +13.4 n=9	61.0
38	<u>0.639</u> +0.08		<u>198.5</u> +11.8 n=4	<u>62.7</u> + 6.5 n=11	68
90	<u>1.557</u> +0.25		<u>218</u> +10 n=3	<u>81.8</u> +20 n=13	62.4

* lactato producido en presencia de glucosa menos lactato produciendo por sustratos endógenos, \pm D.S.

n=número de experimentos.

Temperatura de incubación 32°C.

EFEECTO DE QUERCETINA SOBRE LA PRODUCCION DE LACTATO

Una vez definidas las condiciones para el estudio de la glicólisis en el tes tículo, se procedió a examinar el efecto que sobre el proceso pudieran tener diversos inhibidores de ATPasas.

En primer término se estudió el efecto de la quercetina, inhibidor de ATPasas membranales (tabla 4).

La quercetina inhibió la producción de lactato. En aerobiosis, tal inhibición fue del orden de 37 a 50%, no habiendo diferencia significativa en el orden de inhibición entre ambas edades. En anaerobiosis aún cuando la producción de lactato fue mayor que en aerobiosis, el orden de inhibición fue del mismo -- rango que en aerobiosis, alrededor de 45%.

El disolvente usado para la quercetina fue dimetil formamida y su presencia no afectó significativamente la producción de lactato.

EFEECTO DE OLIGOMICINA SOBRE LA PRODUCCION DE LACTATO

La oligomicina es un inhibidor específico de la ATPasa mitocondrial y por ende, bloquea la fosforilación oxidativa de las mitocondrias. Se usó en una concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$ (2.6 $\mu\text{g/ml}$ de proteína), que en trabajo anterior de - nuestro laboratorio, se demostró era suficiente para inhibir la ATPsintetasa (21). Los resultados se muestran en la tabla 5.

Con sustratos endógenos, hubo una estimulación de la producción de lactato, en presencia de oxígeno. En anaerobiosis no hubo efecto. En aerobiosis y en presencia de glucosa hubo también una estimulación en la producción de lacta to debida a la oligomicina, del orden de 260%. Esta estimulación no fue sig-

T A B L A 4

Efecto de quercetina sobre la producción de lactato

Fase gaseosa Edad (días)	ANAEROBIOSIS			AEROBIOSIS		
	Control nmoles de lactato/ hora/mg de proteína*	+ Quercetina** nmoles de lactato/ hora/mg de proteína*	%	Control nmoles de lactato/ hora/mg de proteína*	+ Quercetina** nmoles de lactato/ hora/mg de proteína*	%
21	212.9 + 9.8 n=4	74.0 +26.1 n=3	35 +13	79.7 +13.5 n=6	38.9 +14.2 n=7	48.8 +16.9
38	229.3 +10.8 n=2	113.7 +23.9 n=2	49.5 +7.2	62.8 + 6.5 n=6	25.8 +11.9 n=10	46.0 +13.2

* Diferencia entre el lactato producido en presencia y en ausencia de glucosa.

** 0.164 mM (50 µg/ml), alrededor de 12 µg/mg de proteína.

T A B L A 5

Efecto de oligomicina sobre la producción de lactato *

Edad (días)	Adición	Sin Glucosa		Con Glucosa			Δ		
		Control	Oligomicina**	Control	Oligomicina**	%	Control	Oligomicina**	%
21	Anaerobiosis	48.2 +14.3 n=3	38.9 ± 2.04 n=2	244.7 ± 17.5 n=3	217.8 ± 7.5 n=2	89.0 +10.3	212.9 ± 9.8 n=4	178.96 ± 9.5 n=2	97.78 ± 8.58
	Aerobiosis	3.9 +4.7 n=9	23.36 +13.76 n=4	81.9 ± 17.1 n=10	268.6 ± 45.5 n=3	269.0 +56.8	79.7 +13.5 n=9	245.2 ± 33.4 n=3	274.4 +15.5
38	Anaerobiosis	31.9 +10.2 n=3	34.79 +14.0 n=3	242.9 ± 28.3 n=7	224.1 ± 39.0 n=3	87.5 +22.3	211.5 ± 11.8 n=7	189.31 ± 35.4 n=2	88.66 +14.5
	Aerobiosis	2.8 ± 3.6 n=8	12.34 ± 8.2 n=5	62.7 ± 10.6 n=11	161.65 ± 23.0 n=8	257.8 33.5	62.8 ± 6.5 n=6	140.25 ± 26.0 n=8	250.1 ± 46.0

* nmoles de lactato/hora/mg de proteína

** 0.028 mM (10 µg/ml)

nificativamente diferente entre ambas edades. En anaerobiosis en cambio, no se observó un efecto significativo.

Se hicieron también experimentos en donde los inhibidores fueron adicionados en forma simultánea al medio de incubación (tabla 6).

En presencia de glucosa y en aerobiosis, la estimulación producida por la oligomicina fue contrarrestada por la quercetina. Tomando como 100% el valor del lactato obtenido en presencia de oligomicina sola, la inhibición producida por la adición simultánea de la quercetina, fue del mismo orden observado - que al agregar al control la quercetina sola. En anaerobiosis no hubo nuevamente efecto de la oligomicina sola. La combinación de la oligomicina más la quercetina, inhibió la producción de lactato hasta un valor del mismo orden observado que cuando la quercetina se agregó como único inhibidor.

T A B L A 6

Efecto de oligomicina y quercetina sobre la producción de lactato

	Control %	Quercetina* %	Oligomicina** %	Quercetina* Oligomicina** %
Anaerobiosis	100	41.3	100	49
Aerobiosis	100	41.1	100	42

* 0.164 mM (50 µg/ml).

** 0.028 mM (10 µg/ml).

EFFECTO DE AGENTES DESACOPLANTES DE LA FOSFORILACION OXIDATIVA
SOBRE LA PRODUCCION DE LACTATO

Tanto el 2, 4-dinitrofenol (DNP) como el carbonil-cianuro-p-trifluorometoxifenil hidrazona (FCCP), son conocidos como agentes desacoplantes de la fosforilación oxidativa de las mitocondrias y por lo tanto son también inhibidores de la síntesis mitocondrial de ATP. Se hicieron experimentos preliminares usando estos dos agentes, a las concentraciones que se sabe son óptimas para ejercer su efecto desacoplante: 1×10^{-4} M para el DNP (43) y 2×10^{-6} M para el FCCP (32).

Los resultados que se muestran en la tabla 7 fueron similares a los obtenidos con oligomicina. La inhibición que se observó en anaerobiosis fue de muy baja significancia. En cambio en aerobiosis, nuevamente se observó una estimulación de la producción de lactato. Tomando como 100% el valor máximo obtenido en cada una de las condiciones, el orden de inhibición debido a la -- quercetina sola o acompañando a los otros agentes, fue similar al observado anteriormente.

EFFECTO DE OUABAINA SOBRE LA PRODUCCION DE LACTATO

En numerosos tejidos se ha descrito el efecto inhibitorio de la ouabaína sobre la ATPasa dependiente de Na^+ y K^+ , bloqueando el transporte de estos iones a través de la membrana plasmática (67).

A pesar de que en el testículo este efecto no ha sido demostrado más que indirectamente (67), se decidió estudiar su efecto sobre la producción de lactato, ya que ha sido el inhibidor de ATPasas que más consistentemente ha

T A B L A 7

Efecto de agentes desacoplantes de la fosforilación oxidativa sobre la producción de lactato

ADICIONES	ANAEROBIOSIS %	AEROBIOSIS %
Ninguna	100	100
2,4-DNP*	80.32	268.4
FCCP **	70.3	221.3
Quercetina***	41.3	41.1
2,4-DNP+Quercetina	67.8	-
FCCP+Quercetina	38.4	-
<hr/>		
2,4-DNP	100	100
2,4-DNP+Quercetina	-	46.8
<hr/>		
FCCP	100	100
FCCP+Quercetina	-	48.6

* 1×10^{-4} M

** 2×10^{-6} M

*** 1.64×10^{-4} M

mostrado inhibir la glicólisis en células tumorales.

La tabla 8 muestra los resultados de los experimentos en los que se estudió el efecto de la ouabaína sobre la producción de lactato en presencia de glucosa. Aún a concentraciones de 1×10^{-4} M no se observó ningún efecto significativo sobre la glicólisis aeróbica ó anaeróbica

EFFECTO DE QUERCETINA SOBRE LA ACTIVIDAD DE ATPasa DE HOMOGENEIZADO

TOTAL DE TESTICULO DE RATA

Es bien conocido el efecto inhibitorio de la oligomicina sobre la ATPasa mitocondrial, aunque en el testículo este efecto tiene características peculiares (23).

La quercetina, a su vez, se ha informado es inhibidor de ATPasas membranales (11,71,72).

En vista de la marcada inhibición de la producción de lactato ejercida por la quercetina, se llevaron a cabo algunos experimentos en los que se estudió el efecto de la quercetina sobre la actividad de la ATPasa-Mg²⁺ de homogeneizados totales de testículo de rata. Los resultados se muestran en la tabla 9. Se observó entre 15 y 30% de inhibición de la actividad enzimática - en las condiciones estudiadas.

T A B L A 8

Efecto de ouabaína sobre la producción de lactato

ANAEROBIOSIS		AEROBIOSIS	
Control	+ Ouabaína*	Control	+ Ouabaína*
nmoles de lactato/hora/mg de proteína			
218.9 +28.3 n=3	207.7 +17.6 n=2	61.4 +10.6 n=8	55.9 +21.1 n=3

* 1×10^{-4} M

T A B L A 9

Efecto de quercetina sobre la actividad
de ATPasa de homogeneizados totales de rata*

Experimento número	Control $\mu\text{moles Pi}/10 \text{ min}$ /mg proteína	+ Quercetina			p**
		Concentración mM	$\mu\text{moles Pi}/10 \text{ min}$ /mg proteína	%	
1	5.73 <u>+0.40</u>	0.132	4.77 <u>+0.1</u>	83.2	<0.005
2	4.02 <u>+0.1</u>	0.132	3.31 <u>+0.2</u>	82.3	<0.001
3	5.63 <u>+0.07</u>	0.164	4.78 <u>+0.1</u>	84.9	<0.005
4	3.88 <u>+0.3</u>	0.198	2.6 <u>+0.1</u>	67.0	<0.005

* Medio de incubación (mM): sacarosa 200, MgCl_2 , 5.0, ATP, 2.0, 0.05 ml de homogeneizado total al 10% P/V (0.3 mg de proteína aproximadamente), temperatura de incubación 37°C, volumen final 0.5 ml.

** Calculado a partir de la "t" de Student.

DISCUSION

Es bien sabido que el testículo adulto depende de la glucosa como sustrato exógeno (3,27,29,54,65), casi tanto como el cerebro (30,52), también se sabe que el testículo in vitro, produce gran cantidad de lactato a partir de glucosa, tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas (25,29,48). Esta producción de lactato aumenta al incrementar la cantidad de glucosa en el medio (27).

Las condiciones fisiológicas de relativa hipoxia del testículo (27,28,68,70), inducen a pensar que es posible que las células germinales puedan usar la vía glicolítica para oxidar glucosa hasta lactato. La observación de que las características cinéticas sui generis de la principal isoenzima de la deshidrogenasa láctica LDH-x, favorecen la producción de lactato (4,6,69), es congruente también con la utilización de la vía glicolítica, así como los niveles de lactato que se han detectado en el fluido testicular, que supuestamente incluye productos de desecho de células germinales (27,58,74). Nuestros resultados (tabla 1), además de confirmar hallazgos previos, apoyan dicha suposición.

El hecho de no encontrar diferencia significativa en el lactato producido a los 21, 38 y 90 días de edad de las ratas (tabla 2), confirma la sugerencia de que tanto espermatozoides primarios en el estadio paquitene, como espermátides y espermatozoides, comparten este tipo de metabolismo (27) ya que son respectivamente el tipo celular predominante en cada una de las edades estudiadas (1).

Sin embargo, a pesar de todas las evidencias arriba señaladas apoyando la gli

cólisis aeróbica del testículo, es importante subrayar que ignoramos hasta ahora en qué porcentaje participa en el metabolismo energético del testículo in vivo.

Aún más, pensamos que nuestros datos, así como los informados por otros autores sobre producción testicular de lactato in vitro, es posible que sean diferentes a los fisiológicos, ya que en otros tejidos y particularmente en el cerebro, se ha demostrado que la concentración de oxígeno en el microambiente de las células, es un elemento importante de regulación del tipo de metabolismo (glicolítico u oxidativo) que ellas realicen (52,59). De hecho, los datos que informamos (tablas 1 y 2) referentes al cerebro, son acordes con los obtenidos por otros autores en condiciones experimentales similares, pero diferentes a los obtenidos in vivo. Por ejemplo, en el hombre, por medición de diferencias arteriovenosas de la concentración de lactato en sangre, ha podido inferirse que el efecto Pasteur en el cerebro in vivo, es del orden del 85% y que el metabolismo de la glucosa es eminentemente oxidativo, aunque sí existe un 15% de glicólisis aeróbica (49,52). También se ha señalado la extraordinaria capacidad del cerebro de adaptarse en cuestión de segundos a condiciones de hipoxia, cambiando su metabolismo oxidativo a glicolítico, como respuesta inmediata a la necesidad de abastecer su requerimiento de energía (50,52).

En el caso del músculo, en lo que se refiere a la utilización de sustratos, es bien sabido que en general consume su propio glucógeno (56), aunque en determinadas circunstancias, la fuente inmediata de energía es la fosfocreatina (56). En lo que toca a su metabolismo, se sabe que depende del tipo de músculo en estudio el que sea aeróbico o anaeróbico. En términos generales,

el metabolismo aeróbico es proporcional al número de mitocondrias y éste se presenta en función del tipo de actividad que ejerce cada músculo (35). Ejemplos de músculos en los que predomina el metabolismo anaeróbico son el sóleo y el gastrocnemio, así como el corazón lo es de metabolismo aeróbico (31,35). Asimismo, este órgano dispone de un mecanismo de regulación de la glicólisis por el funcionamiento de sus mitocondrias en condiciones aeróbicas (35).

Nuestros resultados (tablas 1 y 2), son acordes con todos estos conceptos, que sobre metabolismo muscular están informados en la literatura.

En vista de estas consideraciones es razonable concluir que la dependencia de glucosa es diferente en cada tejido y que ésta dependencia está dada según los requerimientos energéticos y las condiciones a las que está sujeto cada tejido.

Independientemente de que no pretendemos hacer extrapolaciones de nuestras observaciones a lo que sucede in vivo, en nuestras condiciones experimentales encontramos que la producción de lactato en todos los tejidos estudiados, fue mayor en condiciones anaeróbicas que en condiciones aeróbicas. De hecho en el corazón esta producción fue nula en presencia de oxígeno.

Refiriéndonos particularmente al testículo, es difícil comparar los datos de producción de lactato obtenidos en el presente trabajo con los informados por otros autores (48), ya que éstos expresaron sus datos de distinta manera y usaron diferentes condiciones experimentales en lo que se refiere a la determinación de lactato, la edad de los animales y la temperatura de incubación. Leiderman y Mancini (48), usaron ratas prepúberes de 15 días de edad y adultas e incubaron los fragmentos de testículo a 37°C. Esta temperatura, según nuestros datos (figura 5) arroja cifras diferentes a las de las incubaciones

efectuadas a 32°C. Esta diferencia puede tener una importancia fisiológica, ya que se ha informado que si se incubaba testículo escrotal en agua a 42°C por 30 min ó hay ubicación abdominal de un testículo (criptorquidia) por dos semanas, se presenta degeneración testicular (9). Lee y col. informaron que si se incubaba testículo a 37°C por un período de 60 min, hay ruptura de lisosomas en las espermátides, lo que lleva a la destrucción celular que inicia el fenómeno de regresión del epitelio germinal (46). Además, muy recientemente, se ha informado que si se expone un testículo escrotal de rata a una temperatura de 38 a 41°C de 30 min a 1.5 h, el órgano responde aumentando al doble su consumo de oxígeno (51), lo que indica una alteración metabólica, que no se define si es debida o no a un aumento, por el calor, de la concentración de oxígeno en el microambiente de la célula. Se ha estudiado la disminución fisiológica de la temperatura que ocurre en el testículo al bajar de la posición abdominal en animales inmaduros, a la escrotal en animales adultos (27). Las ratas inmaduras poseen una temperatura testicular un poco menor a la corporal y las adultas, de 32-35°C (40). Además de estas observaciones, en estudios de viabilidad de células dispersas de testículo en un amplio rango de temperaturas, mostraron que la viabilidad de 95% presentada a 32°C, bajó a 30-45% a temperaturas por debajo de 15°C ó por arriba de 33°C (1). Por todo lo expuesto, pensamos fue justificado el empleo de una temperatura de 32-33°C para las incubaciones de testículo.

La disminución de la producción de lactato a 37°C en testículo de rata adulta (fig. 5), es congruente tanto con una menor actividad metabólica por destrucción de algunas células germinales durante el tiempo que duró la incubación (46,51), como con la posibilidad de que el mayor consumo de oxígeno que acompaña a una elevación de temperatura (51), corresponda a un desplazamiento

del equilibrio entre metabolismo glicolítico y oxidativo, a favor de este último. También explica en parte, que Leiderman y Mancini (48) encontraran una mayor producción aeróbica de lactato en testículos adultos.

El fenómeno de la glicólisis aeróbica ha sido objeto de estudio principalmente por ser habitual en células cancerosas. Esta observación original de Warburg, que también señaló que existe una buena correlación entre la velocidad del crecimiento tumoral y la glicólisis aeróbica (77), ha sido recogida por Racker para postular una visión modificada sobre el cáncer (61). En vista de que muchas de las células tumorales muestran ATPasas elevadas (14,62,71,72,78), Suolima y col. pensaron que una ó varias ATPasas al permitir la producción de ADP y fosfato inorgánico, participaban en la regulación de la glicólisis aeróbica de estas células (71,72). Esta idea recibió apoyo experimental al encontrar estos autores que inhibidores específicos de diversas ATPasas, eran capaces de inhibir la producción aeróbica de lactato por diversos tipos de células cancerosas.

El testículo no es un tejido maligno, pero el hecho de que sí presente in vitro la coexistencia de glicólisis aeróbica y ATPasas elevadas, permitió pensar en la posibilidad de que también pudieran estar relacionadas entre sí.

El testículo mostró in vitro capacidad de tener glicólisis aeróbica elevada y un efecto Pasteur disminuído (60%). En trabajo anterior de nuestro laboratorio, se demostró que tiene también una o varias ATPasas sumamente activas que parecen localizarse particularmente en las células germinales (22). Siendo la concentración testicular de ATP muy elevada a los 30 segundos de haber cortado el aporte de oxígeno al órgano (36), es evidente que su metabolismo energético es sumamente eficiente y poco congruente con las actividades de ATPasa

arriba señaladas, a menos que éstas participaran en la regulación de la glicólisis a través de los productos de la reacción que catalizan (ADP y fosfato inorgánico), a semejanza de lo postulado por Racker y col. en células tumorales.

Los resultados de inhibición de la producción testicular de lactato por el bioflavonoide quercetina, que se ha descrito como inhibidor de ATPasas membranales (18, 72), apoyan esta idea. El hecho de que los resultados de inhibición de la producción de lactato con quercetina fueran del mismo orden, tanto en aerobiosis como en anaerobiosis (tabla 4), sugieren que la ATPasa mitocondrial que participa en la síntesis de ATP, según la hipótesis de Mitchell, no es la responsable de la regulación de la glicólisis. Podría serlo aquella fracción de ATPasa mitocondrial, que según experimentos de nuestro laboratorio (23), está laxamente unida a la membrana y es poco sensible a oligomicina y muy sensible a efrapentina (inhibidor específico de la porción F_1) y a quercetina.

La inhibición por quercetina de la producción de lactato y de la actividad de ATPasas totales, resulta difícil de correlacionar. En el primer sistema se tienen fragmentos tisulares en donde se ignora la función de las barreras de permeabilidad para la quercetina, además el sistema no permite descartar la idea de que la inhibición de la producción de lactato por el bioflavonoide, pudiera deberse a que afecte alguna enzima glicolítica. Aunque este argumento ha sido desechado experimentalmente en células tumorales (61), es importante de ser considerado en estudios futuros con testículo. En el segundo sistema, la organización celular se ha perdido y aunque en estas condiciones mejora el acceso al inhibidor, se mantienen ciertas barreras de permeabilidad, como son las membranas de los organelos. Así por ejemplo, se ha informado que la quercetina es inhibidor de la porción F_1 de la ATPasa de partículas submitocondriales (42,61). No

podemos sin embargo definir si en las mitocondrias de testículo, la porción F_1 de la ATPasa fue o no accesible a la quercetina. Por otro lado, de ser solo una (o dos) la(s) ATPasa(s) testicular sensible a la quercetina, la inhibición de la actividad no sería muy perceptible debido a la elevada actividad de ATPasas demostrada en homogeneizados totales de testículo (22), como en efecto fue el caso.

En este trabajo se observó una estimulación en la producción de lactato en presencia de oligomicina en condiciones aeróbicas, hasta niveles de lactato similares a los obtenidos en condiciones anaeróbicas. Este resultado es congruente con la idea de que las mitocondrias sí participan en el metabolismo energético del testículo; puesto que al bloquear la oligomicina la síntesis aeróbica de ATP, el órgano echa mano de su mecanismo glicolítico para satisfacer sus demandas de energía. En cambio al superponer a la adición de oligomicina, la presencia de quercetina, esta manifestó su poder inhibitorio de la producción de lactato en un porcentaje similar al mostrado en ausencia de oligomicina. Pensamos que este resultado también apoya la idea de que no es la ATPasa mitocondrial en su concepción Mitchelliana, la que participa en la regulación glicolítica, pues estando inhibida por la oligomicina, pudo observarse la inhibición de producción de lactato por la quercetina, supuestamente a través de la inhibición que ésta ejerce sobre las otras ATPasas (ATPasa mitocondrial no funcional como ATPsintetasa y quizá otras ATPasas membranales).

El FCCP y el 2,4-DNP tuvieron un efecto similar al observado por oligomicina, lo que era de esperarse, ya que estos compuestos son desacoplantes de la fosforilación oxidativa e inhiben la síntesis de ATP (33,43) al disipar el potencial de membrana generado por el gradiente de protones.

El efecto de 2,4-DNP puede ser, sin embargo, de índole más compleja ya que recientemente se ha demostrado su interacción con ATPasas del tipo de la acetomiosina (79).

Respecto a la ATPasa dependiente de Na^+ y K^+ , se ha informado ser sensible a quercetina en algunas células tumorales en las que demostró estar involucrada en el mecanismo de regulación de la glicólisis (41,71,72). En testículo se ha inferido solamente la presencia de la ATPasa dependiente de Na^+ y K^+ por la inhibición del transporte de K^+ por ouabaína, aunque no ha podido demostrarse una inhibición de esta ATPasa por el glucósido (67). Se ha sugerido que las otras ATPasas son tan elevadas, que impiden detectarla.

Con los resultados obtenidos en este trabajo, se abren nuevos caminos de investigación con el planteamiento de nuevas preguntas. Estos estudios preliminares obtenidos in vitro bien podrían extenderse a células dispersas aisladas de testículo, tales como poblaciones enriquecidas de espermatoцитos y espermátides (1) en las cuales el estudio del efecto de la temperatura, oxígeno, agentes químicos, etc. permitiría un mejor conocimiento del efecto del microambiente sobre el metabolismo de las células germinales en estas etapas de su diferenciación.

Aún más, en experimentos hechos in vivo en condiciones en las que el tejido testicular no haya sido separado del resto del cuerpo, existiendo una oxigenación fisiológica, sería posible observar la producción de lactato y confirmar la regulación de la glicólisis por ATPasas utilizando agentes químicos, inclusive a largo plazo.

La realización de este trabajo tiene como aspecto finalista el conocimiento de aspectos metabólicos peculiares del epitelio germinal del testículo, el

cual nos lleva a un enfoque más racional para tratar el problema del control de la fertilidad masculina a nivel gonadal, de manera que pueda llegar a regularse a voluntad sin afectar en forma importante a las células de otros tejidos.

RESUMEN Y CONCLUSIONES

El presente trabajo tuvo como objetivo fundamental investigar si en el testículo de la rata existe el mecanismo de regulación de la glicólisis por una o varias ATPasas que ha sido postulado en células tumorales, basándonos en que comparte con ellas dos características metabólicas: la de tener glicólisis aeróbica y ATPasas elevadas.

Se estudió la producción de lactato por fragmentos de testículo de ratas en presencia y en ausencia de glucosa, tanto en aerobiosis como en anaerobiosis, estableciendo las condiciones más adecuadas para el estudio. El efecto Pasteur observado en nuestras condiciones experimentales fue de 60%.

Con el objeto de averiguar si el tipo de metabolismo glicolítico variaba con la diferenciación del epitelio germinal, se utilizaron ratas de edades diversas: 21, 38 y 90 días, por tener respectivamente como población predominante del epitelio germinal, espermatoцитos primarios, espermátides tempranas y espermatozoides, sin encontrar diferencias significativas.

La posible relación entre alguna ó algunas ATPasas y la glicólisis, se investigó midiendo la producción de lactato, en las condiciones señaladas, en presencia y en ausencia de diversos inhibidores de ATPasas, tales como: ouabaína (inhibidor de ATPasa dependiente de Na^+ y K^+), oligomicina (inhibidor de ATPasas membranales, particularmente de la porción F_1 de la ATPasa mitocondria). También se estudió el efecto de agentes desacoplantes de la fosforilación oxidativa, tales como 2,4-DNP y FCCP.

La ouabaína no tuvo efecto alguno sobre la producción de lactato bajo ninguna condición, observación acorde con el hecho de que en investigaciones previas no ha sido posible detectar por los medios habituales la presencia en el tes-

tículo, de la ATPasa dependiente de Na^+ y K^+ .

La oligomicina no tuvo ningún efecto en anaerobiosis. En cambio, en aerobiosis, elevó la producción de lactato a los niveles obtenidos en anaerobiosis, observación consistente con una inhibición de la producción de energía por medio de la fosforilación oxidativa. Resultados semejantes se obtuvieron en presencia de los agentes desacoplantes de la fosforilación oxidativa.

La quercetina inhibió alrededor de un 50% la producción de lactato en todas las condiciones estudiadas: aerobiosis, anaerobiosis y condiciones de anaerobiosis simuladas por la adición de oligomicina, 2,4-DNP ó FCCP.

Estas observaciones apoyan la hipótesis de que existe una actividad de ATPasa en el testículo cuya inhibición, por la quercetina, inhibe a su vez la glicólisis. No es posible, sin embargo, eliminar la posibilidad de un efecto directo de la quercetina sobre alguna enzima glicolítica.

Nuestros resultados apoyan la hipótesis de Racker de que las ATPasas pueden ejercer una acción reguladora de la glicólisis, quizá a través de los productos que catalizan, ADP y P_i , como efectores positivos de algunas enzimas glicolíticas. Es evidente que de ser así, no es este un fenómeno limitado al proceso de cancerización, sino que puede ser observado también en un tejido normal como el testículo, en donde coinciden la glicólisis aeróbica y la alta actividad de ATPasa total.

En cuanto a la actividad de la ATPasa sobre la cual ejerce su efecto la quercetina, sin desechar la posibilidad de que pueda ser un inhibidor de diversas ATPasas, sabemos por otro trabajo desarrollado en nuestro laboratorio, que inhibe la porción F_1 de la ATPasa mitocondrial testicular. Esta parece presentarse en dos formas: una, firmemente unida a la membrana (con actividad de ATP sintetasa y sensibilidad a oligomicina y a quercetina) y otra, laxa-

mente unida a la membrana (sin actividad de ATPsintetasa, resistente a oligomicina, pero sensible a quercetina.)

Como hipótesis de trabajo hacia el futuro, sugerimos que el papel fisiológico de esta ATPasa mitocondrial laxamente unida a la membrana, pudiera ser el de regular la actividad glicolítica del testículo.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Alemán, V., Trejo, R., Morales, E., Hernández-Jáuregui, P. y Delhumeau-Ongay, G. (1978) A simple and rapid technique to isolate enriched populations of spermatocytes and spermatids from the immature rat testis. *J. Reprod. Fert.* En Prensa.
2. André, J. (1962) Contribution a la connaissance du chondriome. Etude de ses modifications ultrastructurales pendant la spermatogenèse. *J. Ultrastruct. Res.*, Suppl. 3, 1-185.
3. Anison, E.F., Scott, T.W. y Waites, G.M.H. (1963) The role of glucose and acetate in the oxidative metabolism of the testis and epididymis of the ram. *Biochem. J.* 88, 482-488.
4. Battellino, L.J. y Blanco, A. (1970) Catalytic properties of the lactate dehydrogenase isozyme "x" from mouse testis. *J. Exp. Zool.* 174, 173-186.
5. Battellino, L.J. y Blanco, A. (1970) Testicular lactate dehydrogenase isozyme nature of multiple form in guinea pig. *Biochem. Biophys. A.* 212, 205-212.
6. Battellino, L.J., Ramos, J.F. y Blanco, A. (1963) Kinetic properties of rabbit testicular lactate dehydrogenase isozyme. *J. Biol. Chem.* 243, 5185-5192.
7. Blackshaw, A.W. y Elkington, J.S.H. (1970) The effect of age and hypophysectomy on growth and the isoenzymes of lactate dehydrogenase in the mouse testis. *Biol. Reprod.* 2, 268-274.
8. Blackshaw, A.W. y Elkington, J.S.H. (1970) Developmental changes in lactate dehydrogenase isozymes in the testis of the immature rat. *J. Reprod. Fert.* 22, 69-75.
9. Blackshaw, A.W. y Messey, P.F. (1972) The recovery of spermatogenesis in the rat testis after heat-induced degeneration. *J. Reprod. Fert.* 28, 142-143.
10. Blanco, A., Gutiérrez, M., Henquin, C.G. y De Burgos, N.M.G. (1969) Testicular lactate dehydrogenase isozyme: cyclic appearance in bats. *Science* 164, 835-836.
11. Bonting, S.L. y Simon, K.A. (1961) Studies on $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ activated ATPase. I Quantitative distribution in several tissues of the cat. *Arch. Biochem. Biophys.* 95, 416-423.
12. Carpenedo, F., Bortignon, C., Bruni, A. y Santi, R. (1969) Effect of quercetin on membrane-linked activities. *Biochem. Pharmacol.* 18, 1495-1500.
13. Chance, B., Ghosh, A., Higgins, J.J. y Maitra, P.K. (1964) Cyclic and oscillatory response of metabolic pathways involving chemical feedback and their computer representations. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 115, 1010-1024.

Referencias bibliográficas..

14. Chance, B. y Hess, B. (1959) Metabolic control mechanisms. III. Kinetics of oxygen utilization in ascites tumor cells. *J. Biol. Chem.* 234, 2416-2420.
15. Clausen, J. (1969) Lactate dehydrogenase isoenzymes of sperm cells and testis. *Biochem. J.* 111, 207-218.
16. Clermont, Y. y Morgentaler, H. (1955) Quantitative study of spermatogenesis in the hypophysectomized rat. *Endocrin.* 57, 369-385.
17. Clermont, Y. y Perey, B. (1957) Quantitative study of the cell population of the seminiferous tubules in immature rats. *Am. J. Anat.* 100, 241-267.
18. Cochraw, W.G. y Cox, G.M. (1957) *Experimental designs*. Y. Wilay y and Sons Inc. London.
19. Courot, M., Hochereau-de Reviere, M.T. y Ortavant, R. (1970) Spermatogenesis. En: *The Testis I*, p. 339-432. Eds. A.D. Johnson, W.R. Gomes y N.L. Vandemark. Academic Press, London.
20. Dawson, D.M., Goodfriend, T.L. y Kaplan, M.O. (1964) Lactic dehydrogenases: Function of the two types. *Science*, 143, 929-933.
21. Delhumeau-Ongay, G. (1974) Metabolismo energético del testículo. Los perfiles de la bioquímica en México. 243-262.
22. Delhumeau-Ongay, G., Trejo-Bayona, R. y Lara-Vivas, L. (1973) Changes of (Ca^{2+} - Mg^{2+}) adenosine-triphosphate activity in rat testis throughout maturation. *J. Reprod. Fert.* 33, 513-517.
23. Delhumeau-Ongay, G., Vázquez, M.M., Gallardo, T.G. y Valadez, S.A. (1978) Peculiaridades del metabolismo del testículo. Comunicación de la III Reunión Anual de la Academia Internacional de Biología de la Reproducción. Marzo 9-12 San Miguel Allende, Guanajuato.
24. Eby, D., Salthe, S. y Lukton, A. (1973) Frog lactate dehydrogenase: Kinetics at physiological enzyme levels. *Biochim. Biophys. A.* 327, 227-232.
25. Ewing, L.L., Baird, E.R. y Vandemark, N.L. (1966) Comparative metabolic activity of testis and kidney cortex slices of normal and hypoglycemic chickens and rabbits. *Comp. Biochem. Physiol.* 17, 455-465.
26. Fawcett, D.W. (1974) Interactions between Sertoli cells and germ cells. En: *Male fertility and sterility*. Proceedings of the Serono Symposia, vol. 5. p. 13-36. Eds. R.E. Mancini y L. Martini. Academic Press, London.
27. Free, M.J. (1970) Carbohydrate metabolism in the testis. En: *The testis II*. p. 125-192. Eds. A.D. Johnson, W.R. Gomes y N.L. Vandemark. Academic Press, London.

Referencias bibliográficas..

28. Free, M.J. y VanDemark, N.L. (1968) Gas tension in spermatic and periphe-
ral blood of rams with normal and heat-treated testis. *Am.J.Physiol.* 214
863-865.
29. Free, M.J. y VanDemark, N.L. (1968) Radiorespirometric studies on glucose
metabolism in testis tissue from rat, rabbit and chicken. *Comp. Biochem.
Physiol.* 30, 323-332.
30. Gaitonde, M.K. y Richter, D. (1966) Changes with age in the utilization
of glucose carbon in liver and brain. *J. Neurochem.* 13, 1309-1316.
31. Garland, P.B. y Randle, P.J. (1964) Regulation of glucose uptake by mus-
cle. 10. Effects of alloxan-diabetes, starvation, hypophysectomy and adre-
nelectomy, and fatty acids, ketone bodies and pyruvate, on the glycerol
output and concentration of free fatty acids, long-chain fatty acyl-
coenzyme A, glycerol phosphate and citrate-cycle intermediates in rat heart
and diaphragm muscles. *Biochem. J.* 93, 678-687.
32. Guerrieri, F., Larusso, M., Pansini, A., Ferrarese, V. y Papa, S. (1976)
On the mechanism of action of oligomycin and acidis uncouplers on proton
translocation and energy transfer in "sonic" submitochondrial particles.
J. Bioenerg. Biomembr. 8, 131-142.
33. Haan, E.J., Groot, G.S.P., Scholte, H.R., Tager, J.M. y Wit-Peeters, E.M.
(1973) Biochemistry of muscle mitochondria. p. 418-469. En: *The structure
and function of muscle*. Eds. H.B.Geoffrey. Academic Press. N.Y.
34. Hackenbrock, Ch.R., Rehn, T.G., Weinback, E.C. y Lemssters, J.J. (1971)
Oxidative phosphorylation and ultrastructural transformation in mitochon-
dria in the intact ascites tumor cell. *J. Cell. Biol.* 51, 123-137.
35. Hall, P.F. (1970) Endocrinology of the testis. En: *The testis II*. p. 2-71.
Eds. A.D. Johnson, W.R. Gomes y N.L. VanDemark. Academic Press, London.
36. Harkonen, M. y Kormano, M. (1971) Energy metabolism of the normal and
cryptorchid rat testis. *J. Reprd. Fert.* 25, 29-39.
37. Hartree, E.F. (1972) Determination of protein: A modification of the Lowry
method that gives a linear photometric response. *Analytic. Biochem.* 48, 422-
427.
38. Hoskins, D.D., Stephens, D.T. y Casillas, E.R. (1971) Enzymic control of
fructolysis in primate spermatozoa. *Biochim. Biophys. A.* 237, 227-238.
39. Kato, T. y Lowry, O.H. (1973) Enzymes of energy-converting systems in in-
dividual mammalian nerve cell bodies. *J. Neurochem.* 20, 151-163.
40. Kormano, M. (1967) Development of the rectum-testis temperature difference
in the postnatal rat. *J. Reprd. Fert.* 14, 427-437.
41. Kuriki, Y. y Racker, E. (1976) Inhibition of (Na⁺ K⁺) adenosine triphos-
phatase and its partial reactions by quercetin. *Biochem.* 15, 4951-4956.

Referencias bibliográficas..

42. Lang, D.R. y Racker, E. (1974) Effects of quercetin and F₁ inhibitor on mitochondrial ATPase and energylinked reactions in submitochondrial particles. *Biochim. Biophys. A.* 333, 180-186.
43. Lardy, H.A. y Wellmans, H. (1953) The catalytic effect of 2,4-dinitrophenol on adenosinetriphosphate hydrolysis by cell particles and soluble enzymes. *J. Biol. Chem.* 201, 357-370.
44. Lardy, H.A., Witonsky, P. y Johnson, D. (1965) Antibiotics as tools for metabolic studies. IV. Comparative effectiveness of oligomycines A, B, C, and rutamycin as inhibitors of phosphoryl transfer reactions in mitochondria. *Biochem.* 4, 552-554.
45. 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, 548-573.
46. Lee, L.P.K. y Fritz, I.B. (1972) Studies on spermatogenesis in rats. V. Increased thermal lability of lisosomes from testicular germinal cells and its possible relationship to impairments in spermatogenesis in cryptorchidiam. *J. Biol. Chem.* 247, 7956-7961.
47. Lehninger, A. (1975) *Biochemistry*. p. 371. Worth Publishers Inc.
48. 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, 818-821.
49. Lowry, O.H. y Passoneau, J.V. (1961) The relationships between substrates and enzymes of glycolysis in brain. *J. Biol. Chem.* 239, 31-42.
50. Lowry, O.H., Passonneau, J.V., Hasselberg, F.X., y Schultz, D.W. (1964) Effect of ischemia on know substrates and cofactors of the glycolytic pathway in brain. *J. Biol. Chem.* 239, 18-30.
51. Main, S.J. y Waites, G.M. (1977) The blood-testis barrier and temperature damage to the testis of the rat. *J. Reprod. Fertil.* 51, 439-450.
52. Maker, H.S. y Lehrer, G.M. (1972) Carbohydrate chemistry of brain. En: *Basic Neurochemistry*. p. 169-189. Eds. R.A. Wayne, G.J. Siegel, R. Katzman, W. Agranoff. Little Brown and Company, Boston.
53. Mancini, R.E., Penkos, J.C., Izquierdo, I.A. y Heinrich, J.J. (1960) Effects of acute hypoglycemia on rat testis. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 104, 699-706.
54. Means, A.S. y Hall, P.F. (1968) Protein biosynthesis. in the testis. II. Role of adenosine triphosphate (ATP) in stimulation by glucose. *Endocrin.* 83, 86-96.

Referencias bibliográficas..

55. Neaves, W.B. (1977) The blood-testis barrier. En: The testis IV. p. 126-162 Eds. A.D. Johnson y W.R. Gomes. Academic Press, London.
56. Needham, D.M. (1973) Biochemistry of muscle. En: The structure and function of muscle. p. 364-415. Eds. H.B. Geoffrey, Academic Press. N.Y.
57. Okumura, K., Lee, P.P. y Dixon, R.L. (1975) Permeability of selected drugs and chemicals across the blood-testis barrier of the rat. J. Pharmacol. Exp. Ther. 194, 89-95.
58. Pande, J.K., Chowdhury, S.R., Das Gupta, P.R., Chowdhury, A.R., y Kar, A.B. (1966) Biochemical composition of the rat testis fluid. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 121, 899-902.
59. Phizackerley, P.J.R. y Fixter, L.M. (1973) Effects of anoxia in vitro on cellular respiration of brain cortex. J. Neurochem. 20, 123-134.
60. Racker, E. (1974) History of the Pasteur effect and its pathobiology. Molec. Cell. Biochem. 5, 17-23.
61. Racker, E. (1976) A new book at mechanisms in bioenergetics. Academic Press. London.
62. Scholnick, P., Lang, D. y Racker, E. (1973) Regulatory mechanisms in carbohydrate metabolism. X. Stimulation of aerobic glycolysis by energy-linked ion transport and inhibition by dextran sulfate. J. Biol. Chem. 248, 5175-5182.
63. Setchell, B.P. (1970) Testicular blood supply, lymphatic drainage and secretion of fluid. En: The testis. I. p. 101-239. Eds. A.D. Johnson, W.R. Gomes y N.L. VanDemark. Academic Press, London.
64. Setchell, B.P. (1974) The entry of substances into the seminiferous tubules En: Male fertility and sterility. Proceedings of the Serrero Symposia. vol. 5. p. 37-57. Eds. R.E. Mancini y L. Martini. Academic Press, London.
65. 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, 623-630.
66. Setchell, B.P. y Singleton, H.M. (1971) The penetration of rubidium, sucrose and inulin into rat seminiferous tubules in vivo and in vitro. J. Physiol. 217, 5P-16P.
67. Setchell, B.P., Smith, M.W. y Munn, E.A. (1972) The stimulation by bicarbonate of adenosine triphosphatase activity in the seminiferous tubules of rodents and the lack of effect of ouabain. J. Reprod. Fert. 28, 413-418.

Referencias bibliográficas..

68. Setchell, B.P. y Waites, G.M.H. (1964) Blood flow and the uptake of glucose and oxygen in the testis and epididymis of the ram. *J. Physiol.* 171, 411-425.
69. Shat, L. y Segel, H.L. (1969) Reduction of α -ketoglutarate by homogeneous lactic dehydrogenase-x of testicular tissue. *J. Biol. Chem.* 244, 4393-4397.
70. Steinberger, E. y Wagner, C. (1961) Observations on the endogenous of rat testicular tissue. *Endocrin.* 69, 305-311.
71. Suolinna, E-M., Bucksbaum, R.N. y Racker, E. (1975) The effect of flavonoids on aerobic glycolysis and growth of tumor cells. *Cancer Res.* 35, 1865-1872.
72. Suolinna, E.M., Lang, D.R. y Racker, E. (1974) Quercetin, an artificial regulator of the aerobic glycolysis on tumor cells. *J. Natl. Cancer Inst.* 53, 1515-1519.
73. Tfelt-Hansen, P. y Siggaard-Andersen, O. (1971) Lactate and pyruvate determinations in 50 μ l whole blood. *Scand. Clin. Lab. Invest.* 27, 15-19.
74. Voglmayer, J.K., Waites, G.M.H. y Setchell, B.P. (1966) Studies on spermatozoa and fluid collected directly from the testis of the conscious ram. *Nature* 210, 861-862.
75. Waites, G.M.H. (1970) Temperature regulation and the testis. En: *The Testis*. I. p. 241-279. Eds. A.D. Johnson, W.R. Gomes y N.L. VanDemark. Academic Press, London.
76. Waites, G.M.H. (1977) Fluid secretion. En: *The testis IV*. p. 91-123. Eds. A.D. Johnson y W.R. Gomes. Academic Press. London.
77. Warburg, O. (1926) *Über den stoffwechsel der tumoren*. C.R. E. Racker (1974) History of the Pasteur effect and its pathobiology. *Mol. Cell Biochem.* 5, 17-23.
78. Wu, R. y Racker, E. (1959) Regulatory mechanisms in carbohydrate metabolism IV. Pasteur effect and crabtree effect in ascites tumor cells. *J. Biol. Sci.* 234, 1036-1041.
79. Yamada, Y. y Watanabe, S. (1977) Competitive and uncompetitive effects of 2,4-dinitrophenol on ATPase activities of rabbit skeletal actomyosin and myosin. *J. Biochem.* 82, 893-900.