



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE QUIMICA

**Actividad de Adenosin Trifosfatasa
(ATPasa) Dependiente de Ca^{2+} - Mg^{2+}
de Testículo de Rata en Diversas
Condiciones de Maduración y de
Regresión del Epitelio Germinal.**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO - FARMACEUTICO - BIOLOGO
P R E S E N T A
Marta Elisa Vázquez Memije

1 9 7 4



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.

NO. Pests 337
AÑO. 1974
FECHA M.I. ~~337~~ 340
PROC. _____

A M I S P A D R E S

A M I H E R M A N O

A M I S A M I G O S

	Presidente:	<u>Estela Sánchez de Jiménez</u>
	Vocal:	<u>Edmundo Chávez Cossío</u>
Jurado asignado	Secretario:	<u>Graciela Delhumea de Ongay</u>
originalmente:	1er. Suplente:	<u>Martha Enríquez López</u>
	2do. Suplente:	<u>Ana Ma. Gutiérrez Arcos</u>

Sitio donde se desarrolló el tema: Laboratorio de Hormonas Protéicas, División de Biología de la Reproducción, Departamento de Investigación Científica del Instituto Mexicano del Seguro Social, bajo la dirección de la Dra. Graciela D. de Ongay.

Con profundo agradecimiento a la Dra. Graciela Delhumeau de Ongay, al Dr. Adalberto Parra C., al Dr. Alfredo Gallegos C. y a todas las personas que de una u otra manera me brindaron su colaboración y estímulo durante la realización de este trabajo.

También deseo expresar mi gratitud al Dr. Jorge Iván Olivera L. por la hipofisectomía y al Dr. Francisco Caracheo R. por la criptorquidia experimental, intervenciones quirúrgicas realizadas por ellos en algunas de las ratas. Al Dr. Pablo Hernández Jaúregui por las microfotografías que se muestran en esta tesis.

Asimismo, agradezco a la Sra. Rosalinda Todd de Villanueva, su ayuda secretarial.

C o n t e n i d o :

	Pags.
Introducción	1
Materiales y Métodos	23
Resultados	29
Discusión	36
Resumen y Conclusiones	44
Bibliografía	45

I N T R O D U C C I O N

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 dehidrepiandrosterona (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. 1952; Clermont, 1958; Schmidt, 1964).

Los túbulos seminíferos constituyen la porción exócrina del testículo. Sus características más importantes son: estar limitados por el complejo lamelar basal, carecer tanto de vasos sanguíneos como linfáticos y por lo tanto tener una hipoxia relativa (Free y VanDemark, 1968) y tener 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 "abrazo" a -- las células germinales de su alrededor ha hecho pensar que juegan un papel fundamental en la diferenciación de las mismas -- (Vilar y col., 1962; Firlit y Davis, 1965) y aún más, también en el mecanismo de expulsión de los espermatozoides (espermiación) (Burgos y Vitale, 1967).

Las células del epitelio germinal reciben diversos nombres de acuerdo con su estadio de diferenciación; espermatogonias, espermatocitos de primero y segundo orden y espermatidas.

Las células más primitivas del epitelio germinal son las espermatogonias. Se encuentran localizadas junto a la membrana basal y después de varias divisiones mitóticas y de la diferenciación de la mayoría de las células hijas, dan lugar a los espermatocitos primarios, que sufren la meiosis. La reducción en el número de cromosomas se efectúa en el curso de dos divisiones sucesivas. Los cambios morfológicos que muestran los espermatocitos primarios durante la larga profase de la meiosis han

permitido distinguir entre ellos diversos tipos de células: - preleptotene, leptotene, zigotene, paquitene y diplotene.

Al final de la primera división meiótica se obtienen los espermatocitos secundarios, con el número de cromosomas reducido a la mitad pero contenido diploide de DNA. La segunda división meiótica da lugar a las espermátidas que son células haploides en número de cromosomas y contenido de DNA (Dowben, 1971; Courot y col., 1970). Las espermátidas, a través de numerosas modificaciones, tanto morfológicas como metabólicas, (en la rata se distinguen 19 fases definidas) (Leblond y Clermont, 1952), conocidas bajo el nombre de espermiogénesis, culminan su diferenciación con la producción de los espermatozoides, que son expulsados al lumen del túbulo seminífero.

Se ha demostrado que existe un patrón cronológico de desarrollo bien establecido que controla la proliferación de las células germinales y que da lugar a la formación de asociaciones o generaciones de células en el mismo estadio de diferenciación. Las más avanzadas son empujadas hacia la luz del túbulo seminífero por las asociaciones celulares de los estadios más primitivos (Leblond y Clermont, 1952).

En la rata, Clermont y Perey (1957) observaron que al nacer, las cuerdas sexuales que serán después los túbulos seminíferos, sólo contienen células de soporte (posteriormente de Sertoli) y gonocitos. Estos van degenerando o transformándose en espermatogonias, que comienzan a aparecer como tales a los

4 días de edad del animal. A los 9 días de edad han desaparecido totalmente los gonocitos y a los 12 días de edad aparecen los espermatoцитos más primitivos. En las ratas de 15 a 18 días de edad las células de Sertoli ya no presentan mitosis. Los espermatoцитos muestran estadios más avanzados de maduración, que culminan a los 23 días de edad, en que comienza la aparición de las espermátidas más primitivas. El proceso de espermiogénesis se completa a los 45 días de edad, en que aparecen los primeros espermatozoides. Ese momento se considera el inicio de la madurez sexual en estos roedores. La precisión cronológica con que aparecen las diversas estirpes celulares permite seleccionar la población de células que se desea tener presente en el testículo en un momento dado del proceso de maduración por la selección adecuada de la edad del animal de experimentación.

El testículo, a partir de la pubertad (en la rata después de los 15 días de edad), es un órgano cuyas funciones son controladas hormonalmente.

Las gonadotropinas que regulan la fisiología testicular son dos hormonas proteicas secretadas por la hipófisis: la hormona estimulante del folículo o FSH y la hormona estimulante de las células intersticiales o ICSH también conocida como hormona luteinizante o LH.

Se ha demostrado que la ICSH estimula la biosíntesis de andrógenos in vivo (Brink-Johnsen y Eik-Nes 1957; Hall y col.,

1963) y también in vitro (Braddy, 1951; Hall y Eik-Nes 1962).-
Además, esta hormona estimula la biosíntesis de proteínas - --
(Hall y Eik-Nes 1962).

Generalmente la FSH ha sido considerada como la hormona -
responsable de mantener la espermatogénesis (Nelson, 1952; - -
Gemzell y Roos, 1966). Steinberger y Duckett (1967) han postu-
lado que solamente se requiere durante la fase final de la es-
permiogénesis y proponen el siguiente esquema para explicar la
regulación hormonal de la espermatogénesis:

- La formación de espermatogonias tipo A a partir de gono-
citos, posiblemente requiera de testosterona.

- Las divisiones mitóticas de las espermatogonias tipo A,
la formación de espermatogonias tipo B y el desarrollo de los
espermatocitos hasta la fase de paquitene, pueden efectuarse -
en ausencia de hormonas.

- La división meiótica probablemente requiera de testoste-
rona.

- La maduración de las espermátides de la fase 1-12 ó 15-
de la espermiogénesis puede realizarse sin hormonas o sin re-
querir testosterona.

- La fase final de la espermiogénesis, es decir, la madu-
ración de las espermátides, del estadio 12 a 19, requiere de -
FSH. (Steinberger y Steinberger, 1969).

Means y Hall (1967) han observado que la FSH estimula la síntesis de proteínas en el testículo de ratas inmaduras de 15 a 24 días de edad pero no en el adulto.

Al presentarse una falla hormonal se produce lo que se conoce como regresión del epitelio germinal.

Así, Clermont y Morgentaler (1955), demostraron que en ratas hipofisectomizadas el proceso de espermatogénesis no continuaba más allá de los espermátocitos. La hipofisectomía aparentemente produce varias lesiones: regresión del tejido intersticial, bloqueo en la maduración de espermátidas, serios daños a la profase meiótica e interferencia con la formación cuantitativa de espermatogonias tipo A.

Se ha demostrado también que el epitelio germinal es muy sensible al aumento de la temperatura del ambiente testicular. La criptorquidia, al hacer cambiar la temperatura ambiental -- del testículo de 33°C que tenía en el escroto a 37°C en el abdomen, produce en 5 a 6 semanas desaparición de las espermátidas y un gran número de espermátocitos. En cambio, por lo menos aparentemente, el tejido intersticial es poco afectado -- (Fritz, 1973; Waites, 1970; VanDemark y Free, 1970).

—

Es importante hacer notar que, ya sea por hipofisectomía o por criptorquidia, a pesar del término usual, no se induce en el animal de experimentación una regresión verdadera de las células del epitelio germinal a un estadio anterior de diferenciación. Por el contrario, una célula germinal sigue su proceso de diferenciación exactamente al ritmo normal hasta encon--

trar un ambiente desfavorable (hormonal, de temperatura u otros). En ese momento no pasa al estadio siguiente, sino que degenera y es eliminada del sistema (Clermont y Harvey, 1965).

El manejo experimental de las condiciones hormonales o de temperatura ambiental del testículo permite también seleccionar la población celular que se desea tener presente en el testículo de un animal adulto. Sólo es importante considerar que al haber estado ya expuestas estas células a la acción de hormonas no necesariamente son iguales a las presentes en el testículo inmaduro. De hecho se han informado diferencias morfológicas (Clermont y Perey, 1957; Clermont y Morgentaler, 1955) y funcionales (Lin y Fritz, 1972).

Por lo que respecta al metabolismo del testículo, se modifica dependiendo de la condición fisiológica en que se encuentre el órgano. El consumo de oxígeno en el testículo de la rata varía con la edad: en el testículo inmaduro el consumo es mayor, va descendiendo conforme se acerca a la madurez y se estabiliza en la edad adulta (Tepperman, 1950), a menos que se induzca por algún medio la regresión del epitelio germinal, en cuyo caso vuelve a aumentar (Featherstone y col., 1955; Steinberger, 1961).

El testículo adulto depende de glucosa como sustrato exógeno más que ningún otro órgano, a excepción del cerebro (Free 1970). Por la hipoxia relativa de las células más numerosas -- del testículo adulto normal, que son las de diferenciación más avanzada del epitelio germinal (Free y VanDemark, 1968) se ha-

pensado que posiblemente la glucosa sea oxidada preferentemente por glicolisis. De hecho, el testículo adulto produce una cantidad considerable de lactato a partir de glucosa, tanto en condiciones anaeróbicas (Dickens, 1930; Härkönen, 1971) como aeróbicas (Dickens, 1931; Hollinger, 1968; Leiderman y Mancini 1968).

No es sin embargo la glicolisis la única vía de oxidación de la glucosa. Puede oxidarse en la rata hasta en un 0.5% por la vía colateral de las pentosas (Free y VanDemark, 1969) y la producción de $^{14}\text{CO}_2$ a partir de glucosa uniformemente marcada con ^{14}C simultánea con un consumo de oxígeno ha sugerido que el ciclo de los ácidos tricarbóxicos es operante en el testículo. Sin embargo el hecho de que en la rata esa producción de $^{14}\text{CO}_2$ no justifique más que el 30% del consumo total del órgano, ha permitido sugerir que quizá se esté llevando a cabo una oxidación preferencial de lípidos endógenos, limitándose entonces el papel de la glucosa a la alimentación del ciclo de los ácidos tricarbóxicos con los metabolitos que requiere para funcionar (Free, 1970). Esta idea ha sido apoyada por el hecho de que el piruvato alimenta al ciclo metabólico común no solamente a través de la piruvato deshidrogenasa (Lin y Fritz, 1972) sino a través de una o más enzimas málicas de gran actividad (Mounib y Eisan, 1972).

Además, al incubar testículo adulto en presencia de glucosa uniformemente marcada, una parte importante de la radioactividad aparece en aspartato, glutamato y glutamina (Hollinger y

Davis, 1968), que puede incorporarse por un lado a las bases de los nucleótidos y por otro, indirectamente, al ciclo de los ácidos tricarbóxicos. En cuanto a la fracción lipídica, un -- 60% de su marcaje se localiza en la porción glicerol (Scott y Setchell, 1968), a pesar de que in vitro, acetato puede fácilmente incorporarse a colesterol y a ácidos grasos (Johnson y col., 1970; Morris y Chailsoff, 1959).

La dependencia del testículo adulto de la presencia de -- glucosa exógena es tal que si se incuba in vitro el testículo-adulto en ausencia de glucosa, decaen rápidamente tanto el consumo de oxígeno (Free, 1970) como los niveles de ATP (Means y Hall, 1968) estimulando su adición a ambos, así como a la velocidad de síntesis de proteínas (Davis y Morris, 1963; Means y Hall, 1968).

En cambio, el testículo inmaduro o con regresión del epitelio germinal no manifiesta dependencia de la glucosa exógena. Aún más, la adición de ésta provoca un efecto Crabtree, disminuyendo el consumo de oxígeno, y al incubar el órgano in vitro su presencia no altera para nada, ni la disminución de los niveles de ATP ni la velocidad de síntesis de proteínas, a pesar de que en esas condiciones ésta es más elevada (Means y Hall, - 1968; Tepperman y col., 1949). Parece ser que en el testículo-inmaduro y en el adulto con regresión del epitelio germinal adquiere una mayor importancia el metabolismo de los lípidos -- (Free, 1970; Lin y Fritz, 1972; Johnson, 1970) y en el primero particularmente quizá el de los cuerpos cetónicos (Lin y Fritz

1972), a pesar de que en esas condiciones el testículo carece de la enzima carnitil acetil transferasa, que aparece con los espermátocitos más avanzados y las espermátidas primitivas -- (Fritz, 1973). Es evidente pues que en el curso de su maduración el testículo modifica numerosos aspectos de su metabolismo energético. Además de los mencionados es importante señalar que son numerosas las enzimas que manifiestan su actividad por primera vez en el testículo (o la modifican) al aparecer la línea celular de las espermátidas (Bishop, 1969), siendo una buena parte de ellas isoenzimas con características diferentes a las de otros tejidos. Tal es el caso de la hexocinasa (Linford, 1968; Katzen, 1966; Sosa y col., 1972), fosfofructocinasa (Hoskins y Stephens, 1969), fosfogliceratocinasa (VandeBerg y col., 1973), deshidrogenasa láctica asociada a mitocondrias pesadas (Zinkham, 1968; Clausen, 1969; Blackshaw y Elkington, 1970) y fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos (Monn y col., 1972), para mencionar tan solo algunos ejemplos.

En lo que toca concretamente al ATP, sea cual fuere la maquinaria encargada de producirlo, es eficiente, puesto que a los dos minutos de interrumpir el aporte sanguíneo al testículo su concentración es de 2.5 mM (Härkönen y Korman, 1971). Es notable, sin embargo, que al incubarlo in vitro desaparezca el ATP rápidamente (Härkönen y Korman, 1971; Means y Hall, 1968). Este fenómeno ha permitido sugerir que quizá el testículo carece del sistema regulador de los niveles de ATP (Means y Hall, 1968; Hollinger, 1971) existente en otros órganos (Hollinger, 1971; Atkinson y Walton, 1967).

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. (1973a) estudiaron la capacidad del testículo de la rata para hidrolizar ATP en diversas condiciones de maduración (Delhumeau-Ongay y col., 1973a) y de regresión del epitelio germinal (Delhumeau-Ongay y col., 1973b).

Informaron la presencia de una elevada actividad de ATPasa ($\text{Ca}^{2+} - \text{Mg}^{2+}$), que está presente desde las 24 horas después del nacimiento y que incrementa continuamente su actividad hasta los 21-24 días de edad, donde logra un valor máximo. Cronológicamente, esa pendiente ascendente de actividad ATPásica corresponde a la aparición y diferenciación de espermatogonias y espermatocitos (Clermont y Perey, 1957). Después de este punto la actividad enzimática disminuye y la pendiente negativa corresponde a la etapa de la espermiogénesis. Se estabiliza a partir del día 45 de edad, en que empiezan a aparecer los espermatozoides (Delhumeau-Ongay y col., 1973a).

En animales adultos, los autores indujeron la regresión del epitelio germinal por diversos métodos, tales como hipofisectomía y criptorquidia experimental, observándose en todos los casos un incremento significativo en la actividad de ATPasa ($\text{Ca}^{2+} - \text{Mg}^{2+}$), coincidiendo cronológicamente con el cese de la espermiogénesis (Delhumeau-Ongay y col., 1973b).

Considerando estos hallazgos dentro del marco de los cambios tan notables, ya mencionados, que presenta el patrón del-

metabolismo energético testicular en función del estado de diferenciación del epitelio germinal, nos pareció de interés profundizar el estudio de la actividad ATPásica del testículo de la rata, planteándonos las siguientes preguntas:

¿Cuál es la localización intracelular de la ATPasa - Ca^{2+} - Mg^{2+} cuya actividad varía durante la maduración y la regresión del epitelio germinal? ¿Se trata de una o de varias?

En el caso de que estuviera involucrada la ATPasa mitocondrial ¿ se comporta en forma semejante a la de otros tejidos?

¿ su comportamiento se modifica en condiciones de inmadurez o de regresión del epitelio germinal?

Antes de definir el planteamiento del trabajo experimental de la presente tesis nos parece imprescindible resumir algunas nociones sobre la función de las ATPasas celulares cuantitativamente más importantes en otros tejidos.

I ATPasa microsomal

La ATPasa microsomal es una enzima que se encuentra fuertemente adherida a la membrana del retículo endoplásmico. Juega un papel muy importante en el ciclo contracción-relajación de miofibrillas del músculo y en la regulación de los niveles del calcio (Martonosi, 1972).

Para que las fibrillas musculares puedan contraerse requieren de una concentración de Ca^{2+} del orden 10^{-3} a 10^{-2} M.

Este es proporcionado por el retículo endoplásmico, en cuyo interior se encuentra. La expulsión del Ca^{2+} de las vesículas del retículo endoplásmico es dependiente de la concentración de ADP, ATP, fosfato inorgánico presentes en el medio circundante. Simultáneamente con la expulsión del Ca^{2+} el músculo se contrae utilizando la energía de hidrólisis del ATP catalizada por la ATPasa de las miofibrillas. Para que el músculo pueda relajarse, requiere que la concentración de Ca^{2+} baje a niveles de 10^{-6} a 10^{-7} M, lo cual se logra por mediación de la ATPasa microsomal de las membranas del retículo endoplásmico. La enzima es activada por calcio e introduce al ión al interior de las vesículas del retículo endoplásmico mediante un transporte activo que requiere energía. Esta energía se obtiene por la hidrólisis del ATP catalizada por la ATPasa. Por cada mol de ATP que se hidroliza se transportan dos átomos de Ca^{2+} .

Es pues evidente el fundamental papel de la ATPasa microsomal en el ciclo contracción-relajación del músculo, ya que es un fenómeno dependiente de la concentración de calcio que exista en el medio. Si la concentración aumenta (10^{-3} - 10^{-2} M) surge la contracción, si disminuye a 10^{-7} M, es posible la relajación.

Los desacoplantes de la síntesis de ATP mitocondrial como azida y 2,4-dinitrofenol, no afectan la fosforilación acoplada a calcio en el retículo endoplásmico.

Una concentración de ADP arriba de 1mM inhibe tanto a la ATPasa como al transporte de calcio (ver revisión de Martonosi 1972).

II ATPasa mitocondrial

a) Factores que la constituyen.

— Tzagoloff y colaboradores (1971) han extraído y purificado el complejo ATPasa mitocondrial sensible a oligomicina de la levadura. Su peso molecular se ha calculado en 460000. El complejo ATPasa de levadura está constituido por lo menos de nueve diferentes subunidades proteicas. Para que exista sensibilidad a oligomicina D se requiere la presencia y unión de tres factores;

— F_1 ATPasa soluble en agua, no inhibida por oligomicina. Esta ATPasa fue purificada primeramente por Pullman y colaboradores (1960) de mitocondrias de corazón de buey. El peso molecular de F_1 de levadura se ha calculado en 340000. Este F_1 consta por lo menos de cinco subunidades proteicas.

— Proteína que confiere sensibilidad a oligomicina (Oligomycin sensitivity conferring Protein, abreviada OSCP). Este componente es una sola proteína que se ha demostrado es indispensable para conferir la sensibilidad a oligomicina al complejo ATPasa mitocondrial. Este factor probablemente corresponda a la sub-unidad siete del complejo.

— Factor membranal. Este factor consta por lo menos de tres sub-unidades proteicas y es el componente menos soluble.

Mediante inhibidores de síntesis de proteínas ha podido determinarse que en el proceso de la biogénesis de las mitocon

drias el factor F_1 y OSCP tienen origen citoplasmático, en tanto que las subunidades del factor membranar (subunidades seis, cinco y nueve) son de origen mitocondrial, al igual que la subunidad ocho del componente F_1 (ver revisión de Tzagoloff y col. 1973).

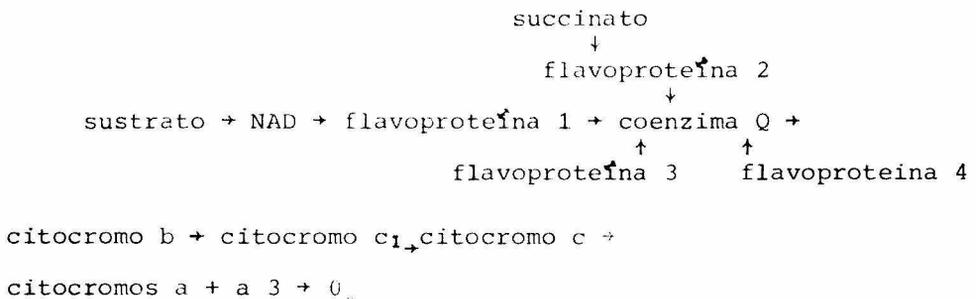
b) Función de la ATPasa mitocondrial.

A la ATPasa mitocondrial se le ha asignado un papel muy importante en una de las teorías más aceptadas para explicar la fosforilación oxidativa, que es la teoría quimiosmótica de Mitchell.

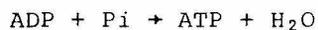
La fosforilación oxidativa es el proceso en el cual se conserva en la síntesis de ATP, la energía derivada del flujo de electrones producidos en la oxidación de los intermediarios del ciclo de los ácidos tricarbóxicos, a lo largo de la cadena respiratoria, (Lehninger, 1973). Esta cadena está constituida por varios eslabones de enzimas de transporte electrónico con niveles de energía sucesivamente inferiores hasta reducir al oxígeno molecular que es el último aceptor electrónico de la respiración. Durante este proceso se conserva gran parte de la energía libre del flujo de estos electrones en forma de energía del enlace fosfato del ATP. El transporte electrónico y la fosforilación oxidativa suceden en casi todas las células aerobias y las enzimas que catalizan estas reacciones se encuentran en la membrana interna de las mitocondrias.

Mediante sensibles determinaciones espectrofotométricas

perfeccionadas por Chance, así como por el uso de inhibidores y por las determinaciones de los potenciales estándar de reducción de los pares redox involucrados, ha resultado posible determinar la secuencia de reducción de los transportadores en la cadena respiratoria, según el esquema siguiente:



Se han calculado a lo largo de la cadena respiratoria cada uno de los cambios de energía libre estándar que ocurren cuando dos parejas redox de potenciales estándar de reducción conocidos reaccionan una con la otra. Se ha podido comprobar que existen tres sitios de la cadena en donde se desprende una cantidad de energía libre suficiente para que pueda llevarse a cabo la reacción endérgica:



Esto implica, naturalmente, la existencia de un mecanismo de fosforilación oxidativa capaz de acoplar el exérgico proceso de la respiración con la síntesis de ATP (Lehninger, 1973)

El acoplamiento de la fosforilación del ADP a la respiración fue postulado por primera vez por Engelhardt al principio de los años 1930 y desde entonces es impresionante la magnitud

del trabajo experimental que se ha llevado a cabo para estudiar el fenómeno (Lehninger, 1973; Lehninger, 1964; Racker, 1965; King, 1966; Lardy, 1969).

Loomis y Lipmann encontraron que la fosforilación oxidativa puede dissociarse de la respiración por agentes específicos, particularmente por el 2,4- dinitrofenol y otros nitrofenoles (c.f. Lehninger, 1970). En presencia de estos agentes la respiración de un tejido puede continuar normalmente o aún estimularse, pero no se lleva a cabo la fosforilación del ADP. Por esta razón esos compuestos se conocen como agentes desacoplantes. Se han convertido desde entonces en instrumentos de diagnósticos muy útiles en el estudio de las transformaciones energéticas celulares.

La fosforilación oxidativa es extremadamente lábil, muestra su máxima actividad en suspensiones recientes de tejidos que no han sido fraccionados. Una observación muy importante es que para que tenga efecto el proceso de la fosforilación se necesita que la membrana mitocondrial interna mantenga su estructura razonablemente inalterada.

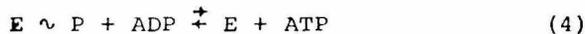
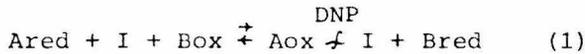
La fosforilación oxidativa puede resultar inhibida por antibióticos como la oligomicina (Lardy y col., 1958; Huijing y Slater, 1961), de tal modo que el control respiratorio por ADP es también inhibido. Esta inhibición puede parecer invertida por el 2,4-dinitrofenol, que sin embargo, no restaura la fosforilación. Paralelamente la oligomicina es un inhibidor de la ATPasa mitocondrial (Lardy y col., 1958) y el 2,4- dinitrofe-

nol, en cambio, la estimula.

Para explicar el mecanismo de la fosforilación oxidativa se han postulado tres hipótesis que se resumen a continuación:

1. Hipótesis del acoplamiento químico.

Esta hipótesis postulada desde Chance y Williams, (1956); Slater, (1958) y Pinchot y Hormansky (1962); puede resumirse en el siguiente esquema:



Presupone que al ser oxidado el acarreador Ared por el siguiente acarreador Box, se genera un compuesto de alta energía Aox ~ I, en donde I puede ser de índole proteica. Aox es después desplazado por la enzima E para formar E ~ I y el fosfato a continuación desplaza a I para dar lugar a la fosfoenzima E ~ P ~ E, que es el donador inmediato de fosfato al ADP. Piensan los autores que la oligomicina bloquea el proceso en donde se indica en el esquema y que el 2,4- dinitrofenol (DNP) provoca la ruptura de Aox ~ I ó E ~ I para regenerar Aox e I ó bien E e I respectivamente. Según este esquema, la actividad de ATPasa sería la suma de las reacciones 2, 3 y 4, después de la acción del 2,4- dinitrofenol (c.f. Lehninger, 1973).

Existen dos hechos que no son fácilmente explicados por

esta teoría: a) después de muchos años de investigación, no ha sido posible aislar o poner de manifiesto la existencia de los intermediarios de alto contenido de energía y b) la membrana tiene que mantener su estructura razonablemente inalterada en el proceso de la fosforilación.

2. Hipótesis quimiosmótica

Tomando en cuenta estos dos hechos que no ha podido explicar la hipótesis química de acoplamiento, el bioquímico inglés Peter Mitchell (1966) postuló que el transporte de electrones a lo largo de la cadena respiratoria genera un gradiente de --iones H^+ a través de la membrana y que este gradiente está formado por la extracción de iones H^+ del compartimento intramitocondrial y su expulsión al medio circundante. Este gradiente --de H^+ energéticamente rico, es el que junto con el gradiente --de potencial eléctrico que se crea a través de la membrana, --originan la formación del ATP a partir de ADP y fosfato, en --una reacción de deshidratación o condensación.

Postula Mitchell que una ATPasa capaz de eliminar el agua procedente del ADP y fosfato está orientada en el plano de la membrana mitocondrial de tal modo que el agua resulta eliminada del ADP y del fosfato en forma de iones H^+ y OH^- sintetizándose así el ATP. Mitchell también ha postulado que el 2,4-dinitrofenol desacopla la fosforilación oxidativa porque es un --ácido aromático débil liposoluble que puede ser absorbido en --la fase lipídica de la membrana para actuar como transportador de protones, de tal modo que iguala la concentración de H^+ a --

ambos lados de la membrana y descarga el gradiente de pH necesario para la formación de ATP.

3. Hipótesis de acoplamiento conformacional

Es sabido que las mitocondrias aisladas se hinchan en presencia de determinados agentes tales como fosfato, y se contraen nuevamente en presencia de ATP, con expulsión de agua. Las mitocondrias en las células intactas experimentan también cambios de volumen energético - dependientes. A partir de estas observaciones se postuló que la energía del transporte electrónico se conserva gracias a las enzimas acoplantes de tal modo que puede realizar: a) el trabajo químico de la fosforilación de la cadena, b) el trabajo osmótico necesario para la acumulación de iones y c) el trabajo mecánico correspondiente a los cambios de conformación de las membranas mitocondriales.

Con la evidencia de que los cambios conformacionales pueden ser muy rápidos, Green y col. han sugerido que la energía del transporte electrónico se convierte directamente en un estado de conformación de la membrana rico en energía y este estado se supone que es la fuerza impulsora para la fosforilación del ADP (c.f. Lehninger, 1970).

III Otras actividades enzimáticas que hidrolizan el ATP.

Además de las ATPasas microsomal y mitocondrial podríamos mencionar otras enzimas que hidrolizan al ATP: la ATPasa (Na^+ - K^+) de la membrana plasmática encargada de mantener los nive-

les adecuados de Na^+ y K^+ intra y extracelularmente; la adenil ciclasa que cataliza la conversi3n de ATP a AMP c3clico + pirofosfato que r3pidamente se escinde para producir fosfato inorg3nico en presencia de una pirofosfatasa inorg3nica y numerosas enzimas que al catalizar reacciones biosint3ticas que requieren energ3a hidrolizan ATP.

Atkinson ha sugerido que la regulaci3n de las rutas que producen y utilizan enlaces fosfato de alta energ3a es una funci3n del nivel energ3tico del sistema ATP - ADP - AMP. Ha mostrado c3mo las secuencias metab3licas productoras de ATP y las que lo emplean responden al nivel energ3tico del sistema ATP - ADP - AMP. El estado estacionario metab3lico es el punto en el cual la producci3n de ATP es igual a su utilizaci3n. Si el nivel energ3tico desciende por debajo de este punto, las secuencias productoras se aceleran por la respuesta de sus enzimas reguladoras a la concentraci3n de ATP - ADP y AMP. Si el nivel energ3tico aumenta por encima de lo normal tiene lugar una inversi3n. El sistema ATP - ADP - AMP resulta as3 nivelado para actuar de modo 3ptimo en el estado estacionario y se resiste fuertemente a cualquier desviaci3n del mismo (c.f. Lehninger, 1970).

Es sabido que el test3culo no mantiene sus niveles de ATP in vitro (Means y Hall, 1968) y que es activamente hidrolizado por un homogeneizado total de test3culo (Delhumeau-Ongay y col 1973a).

Es posible que una buena parte de esa actividad hidrol3tica pudiera corresponder a las necesidades energ3ticas del epi-

telio germinal, que sobre todo en sus estadios más primitivos tiene una proliferación sumamente activa (Hollinger, 1971).

También es posible que otra parte importante de la hidrólisis del ATP se deba a la presencia de una o varias ATPasas, cuya localización intracelular y características es por lo tan importante definir.

En la presente tesis se pretende:

- 1.- Determinar la localización intracelular de la ATPasa - (Ca^{2+} - Mg^{2+}) de testículo de rata adulta normal.
- 2.- Determinar cuál o cuáles de las actividades ATPasa - (Ca^{2+} - Mg^{2+}) son responsables del incremento en actividad observado anteriormente en homogeneizados totales de testículo inmaduro y adulto criptorquídico (Delhumeau-Ongay y col., 1973 a; b).
- 3.- En el caso de que sea detectada una elevada actividad de ATPasa mitocondrial, estudiar su sensibilidad a los agentes que habitualmente modifican su actividad: 2,4- dinitrofenol, estimulándola y oligomicina, inhibiéndola.
- 4.- Extender este estudio a diversas condiciones fisiológicas del testículo: inmaduro, adulto normal, adulto criptorquídico y adulto de animales hipofisectomizados.

MATERIALES Y METODOS

Adenosín trifosfato sal disódica (ATP) - Sigma Chemical Co.

Oligomicina (15% oligomicina A, 85% oligom. B) -

Sigma Chemical Co.

2,4- Dinitrofenol - Sigma Chemical Co.

Tris (hidroximetil amino metano (tris) - Sigma Chemical Co.

Clorhidrato de trietanol amina (TEA) - Calbiochem

Sal tetrasódica del ácido etilén dinitrilo tetra-acético (EDTA)
Eastman Organic Chemicals

Los animales de experimentación fueron ratas albinas machos de la cepa Sprague Dawley proporcionadas por el Bioterio del Departamento de Investigación Científica del IMSS alimentadas ad libitum con purina Chow sin ayuno previo al sacrificio.

Método para preparar ratas con criptorquidia experimental

Esta operación quirúrgica fué practicada a ratas adultas-- cuyo peso corporal era de 180 ± 20 g., usando éter como anestésico. La rata fué colocada en decúbito ventral, rasurada la región inguinal. Sobre la línea media posterior a la cicatriz umbilical y anterior al prepucio se hizo una incisión de 1.5 cm. en la piel. La operación fué bilateral, y en cada lado el músculo cremáster fué disecado y retraído, expulsando el testículo a la cavidad abdominal. El músculo fué seccionado en su base y suturado el canal inguinal para evitar que el testículo regresara a su posición escrotal. Fué practicada otra incisión de plano -

muscular a la altura de la cicatriz umbilical sobre la línea media para realizar una ligadura de la grasa epididimal con la pared del abdomen y se suturó por planos. Después de la intervención cada rata fué inyectada intramuscularmente con penicilina de absorción lenta (15000 u.i.). Los animales fueron sacrificados entre la sexta y novena semanas después de establecida la criptorquidia bilateral.

La intervención quirúrgica de estos animales fué realizada por el Dr. Francisco Caracheo Reyes y colaboradores en los quirófanos de la División de Cirugía Experimental del Departamento de Investigación Científica del IMSS.

Hipofisectomía .- La intervención fué realizada en animales adultos de 250 ± 20 g de peso corporal por vía parafaríngea extrayendo la glándula completa por succión suave por medio de una pipeta Pasteur.

Las hipofisectomías fueron llevadas a cabo por el Dr. Jorge Iván Olivera López en los quirófanos de la División de Cirugía Experimental del Departamento de Investigación Científica del IMSS.

Preparación de partículas subcelulares de testículo de rata.

El número de animales utilizados en cada experimento varió de 3 a 15 según el peso de los testículos, a manera de reunir alrededor de 2 g de tejido húmedo. Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical y decapitados para exanguinar -- al máximo posible. Los testículos fueron extraídos rápidamente,

enjuagados en sacarosa 0.32 M y tanto la arteria espermática como la túnica albugínea fueron desechadas. Secando suavemente -- los testículos con papel filtro Whattman No. 40 pudo eliminarse el exceso de líquido. Los testículos fueron pesados y colocados en un vaso de precipitados que contenía el medio de extracción-- (sacarosa 0.32 M). Picado finamente el tejido, fué pasado a un-- homogeneizador de Potter-Elvehjem homogeneizado durante 30 se-- gundos (de 4 a 5 subidas y bajadas), adicionado el medio de ex-- tracción necesario para lograr una concentración de tejido del-- 10% (p/v). Filtrado por lana de vidrio el homogeneizado fué dis-- tribuído en tubos de centrífuga (Internacional refrigerada mod. PR-6 provista con un aditamento de alta velocidad. Rotor 296).

La separación de las fracciones sub-celulares se llevó a-- cabo según el esquema de la figura 1.

El homogeneizado total fué centrifugado a 700 g durante - 7 min. obteniéndose la primera pastilla (P_1). El sobrenadante - (S_1) fué centrifugado a 3000 g durante 10 min, para la obtención de la fracción mitocondrial (P_2). El sobrenadante (S_2) siguió - centrifugándose ahora a 10000 g durante 20 min para obtener la-- pastilla (P_3). El sobrenadante (S_3) fué distribuído en tubos de ultracentrífuga (Spinco L-2 cabezal 50 Ti) y centrifugado a - - 153000 g durante 40 min para la obtención de la 4a. fracción -- (P_4) y el sobrenadante final (Sf).

Todas las pastillas, excepto la cuarta, fueron lavadas -- 1 vez resuspendiéndolas en su volumen original de medio de ex--

tracción y centrifugándolas a la misma velocidad y tiempo que fueron empleados para obtenerlas. Cada una de las pastillas fué resuspendida en su volumen original de sacarosa 0.32 M para llevar a cabo los ensayos enzimáticos.

Cuando se estudió especialmente la actividad enzimática de la fracción mitocondrial (P_2) fué utilizado el siguiente medio de extracción: sacarosa 0.32 M, trietanolamina 3 mM, EDTA 0.05 mM pH 7.2 - 7.4 siguiendo el esquema de centrifugación de la figura 1.

De todas las preparaciones obtenidas fueron conservadas alicuotas a -30°C para posteriormente determinar su concentración de proteínas por el método de Hartree (1972).

Todas las manipulaciones descritas fueron realizadas a 0°C .

Determinación de la actividad de adenosíntrifosfatasa

Se empleó el método de Bonting (1961) modificado (Delhumeau-Ongay y col., 1973a) que permite medir el fosfato inorgánico producido en la reacción enzimática. La actividad fué expresada en μmoles de fosfato inorgánico producido | unidad de tiempo por gramo de tejido húmedo o por gramo de proteína.

El medio de incubación utilizado, a menos que se indique otra cosa fué el siguiente:

	mM
ATP	2
Ca ⁺⁺ ó Mg ⁺⁺	5
<u>Tris</u>	<u>146</u>
pH	7.5
temperatura	37°C
preparación enzimática	0.05 ml
volumen total	0.5 ml

Los tubos de incubación contenían el volumen correspondiente a 4 alícuotas del medio de incubación y fueron procesados -- por triplicado o cuadruplicado. Los tiempos cero contenían el - volumen correspondiente a una alícuota y se procesaron separadamente por cuadruplicado.

La reacción enzimática fué iniciada al adicionar el sustrato al medio de incubación a menos que se indique en otra forma.

Fueron tomadas alícuotas a los 2, 4 y 8 minutos, tiempos- en que la velocidad inicial de la reacción enzimática fue li- - neal. Estas alícuotas fueron recibidas en tubos que contenían - 2.5 ml de HClO₄ al 6% a 0°C (la concentración final del HclO₄ - fué del 5%). Los tiempos cero fueron procesados adicionando la- enzima, enseguida el HClO₄ al 6% a 0°C y finalmente el substra- to. Después de dejar reposar 20 min. a 0°C para que precipita- ran las macromoléculas, fueron centrifugados los tubos en una - centrífuga internacional refrigerada PR-6 rotor 253 durante 10- min a 2500 rpm, decantados y en 1.5 ml del sobrenadante fué de- terminado el fosfato inorgánico.

Determinación de fosfato inorgánico (método de Bonting y col., 1961).

Es un método colorimétrico. El producto de la reacción -- entre el fosfato inorgánico y el reactivo utilizado es un complejo colorido, la intensidad de color es proporcional a la cantidad de fosfato inorgánico presente y el color es estable durante 20 horas. Para determinar la concentración en que se encontraba el fosfato inorgánico en la muestra problema, fué establecida en cada experimento una curva estándar de fosfato disódico (deshidratado en horno hasta peso constante) a concentraciones conocidas y extrapolados los valores de densidad óptica del problema en la curva estándar.

La cantidad de fosfato inorgánico producido en la reacción enzimática fué determinada en 1.5 ml del problema, adicionando 1.5 ml del reactivo preparado inmediatamente antes de la determinación. El reactivo fué preparado adicionando 400 mg de sulfato ferroso a 10 ml de solución de molibdato de amonio al 1% en ácido sulfúrico 1.15 N. Dejando desarrollar la coloración durante 30 minutos, fué determinada la densidad óptica de las muestras problema y de la curva estándar a 700 nm en un espectrofotómetro de doble haz Hitachi Perkin Elmer Coleman modelo 124.

Los valores que se muestran son el promedio de 9 a 12 determinaciones de fosfato inorgánico \pm una desviación estándar.

Las determinaciones de significancia estadística se efectuaron por la prueba "t" de Student.

R E S U L T A D O S

Con el objeto de investigar la localización intracelular de la actividad enzimática de ATPasa - (Ca^{2+} - Mg^{2+}) en testículo adulto normal, inmaduro y adulto criptorquídico, fueron diseñados inicialmente varios experimentos para encontrar un esquema adecuado de centrifugación diferencial que permitiera el aislamiento de las diversas fracciones subcelulares. El que se encontró más reproducible para las tres condiciones fisiológicas estudiadas se muestra en la figura 1.

La composición morfológica aproximada de cada una de ellas según la observación respectiva de las microfotografías obtenidas con el microscopio electrónico, se detalla en la tabla 1, - indicándose el número de la figura correspondiente a cada microfotografía. Es evidente que las fracciones de mayor pureza, en cada caso, fueron P_2 y P_4 como representantes de las poblaciones mitocondrial y microsomal respectivamente.

Distribución de la actividad ATPásica

En un medio de incubación que contenía como ión al Ca^{2+} , - fué determinada en cada una de las fracciones subcelulares del testículo en sus diferentes condiciones fisiológicas, la actividad enzimática de ATPasa (figura 8). En estos experimentos de - distribución subcelular de la actividad enzimática, se utilizó Ca^{2+} como ión para evitar la posible participación de la piro-

ESQUEMA DE FRACCIONAMIENTO DE PARTICULAS
SUBCELULARES DE TESTICULO DE RATA POR
CENTRIFUGACION DIFERENCIAL

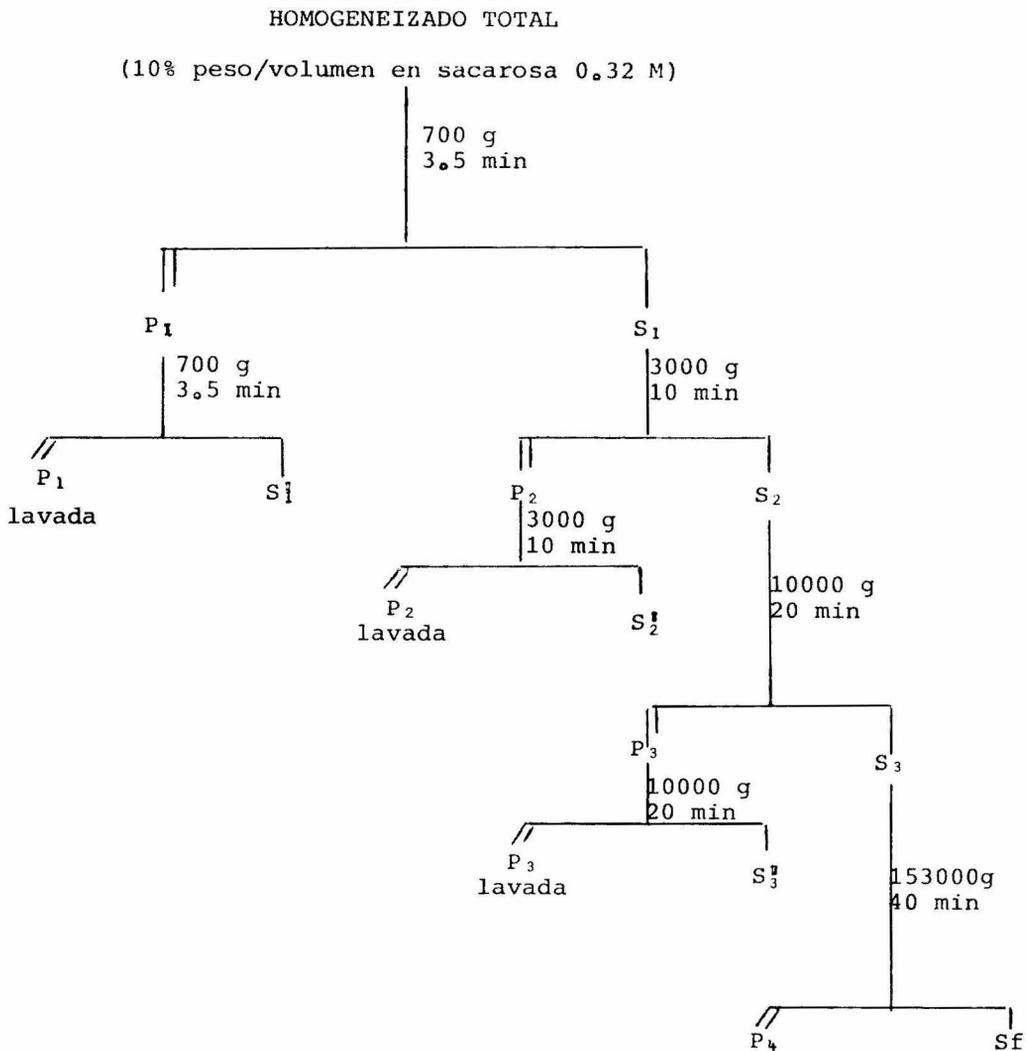


Figura 1.

T A B L A 1

COMPOSICION MORFOLOGICA APROXIMADA DE LAS
FRACCIONES SUBCELULARES DE TESTICULO DE
RATA*

Condición fisiológica del testículo	F r a c c i ó n			
	P ₁	P ₂	P ₃	P ₄
Adulto normal	Núcleos Restos celulares Células enteras	90% de Mitocondrias (figura 2)	50% de Mitocondrias 50% de vesículas de retículo endoplásmico liso (figura 3)	Retículo endoplásmico liso y ribosomas (figura 4)
Inmaduro (14 a 15 días de edad)	Núcleos Restos celulares Células enteras	95% de Mitocondrias (figura 5)	70% de Retículo endoplásmico liso y rugoso mitocondrias pequeñas y ribosomas (figura 6)	Retículo endoplásmico y ribosomas (figura 7)

* Según la observación de las microfotografías respectivas obtenidas con el microscopio electrónico.

FRACCIONES SUBCELULARES DL TESTICULO ADULTO NORMAL

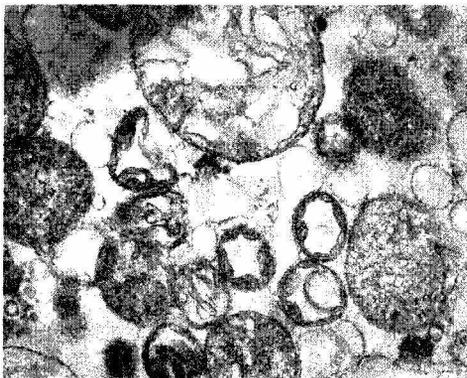


Fig 2
P₂
(x 795 000)

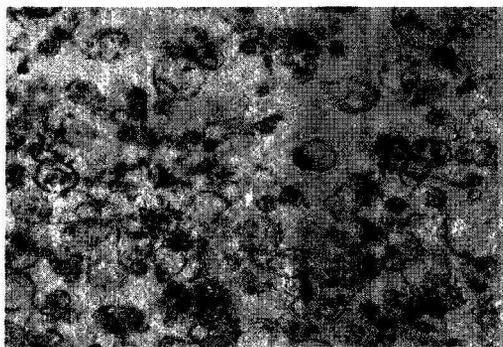


Fig 3
P₃
(x 20 000)

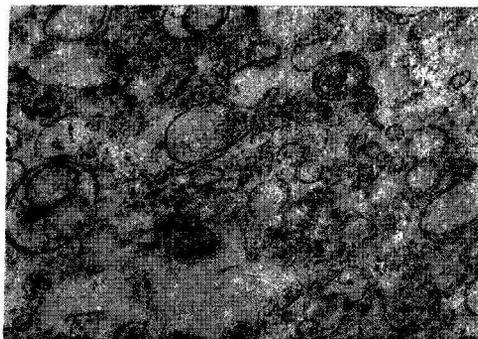


Fig 4
P₄
(x 76 000)

FRACCIONES SUBCELULARES DE TESTICULO INMADURO.

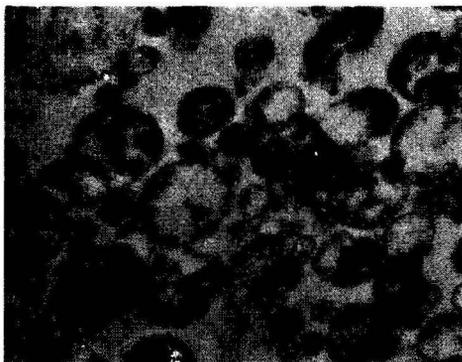


Fig 5
P2
(x 76 000)

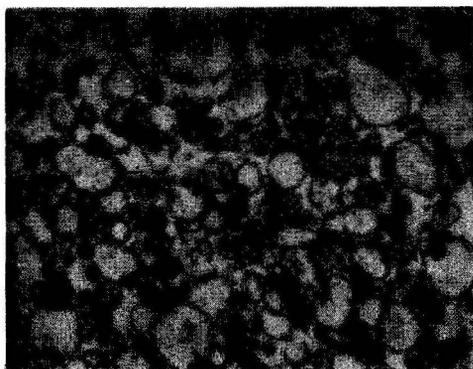


Fig 6
P3
(x 76 000)

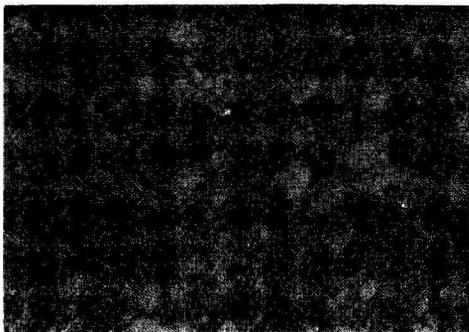
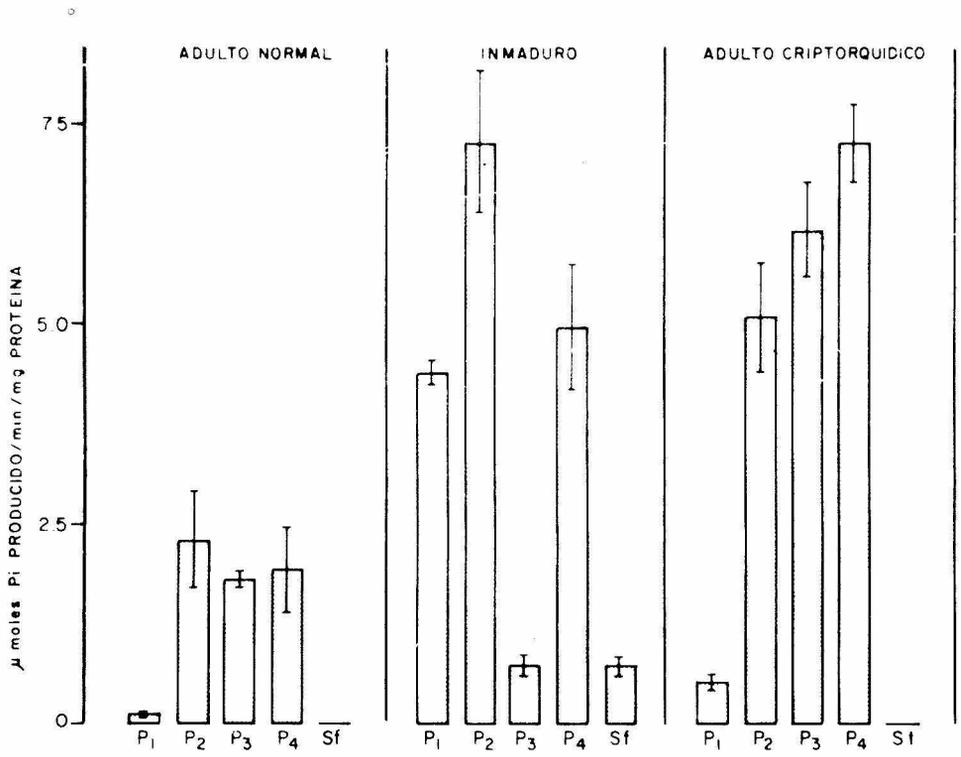


Fig 7
P4
(x 242 000)



fosfatasa dependiente de Mg^{2+} informada en testículo (Delhumeau-Ongay y col., 1973a) y para medir en sus óptimas condiciones - la actividad de la ATPasa microsomal (Martonosi, 1972).

En el testículo adulto normal y adulto criptorquídico, la actividad enzimática fué menor en la fracción P_1 , nula en el sobrenadante final y elevada en las fracciones P_2 , P_3 y P_4 .

En testículo inmaduro fué observada una actividad muy elevada en las fracciones P_1 , P_2 y P_4 . En las fracciones P_3 y sobrenadante final la actividad fué menor.

Tomando en cuenta la gran contaminación de las fracciones P_1 y P_3 con las demás, fué evidente la existencia de dos diferentes ATPasas, una mitocondrial (P_2) y otra microsomal (P_4).

Ambas fueron más activas en el testículo inmaduro y en el adulto criptorquídico al compararlas con las del testículo adulto normal. Sin embargo la distribución de la actividad no fué igual en los dos primeros. En el testículo inmaduro fué mayor la mitocondrial que la microsomal y en el criptorquídico la situación fué inversa.

Debido a que era de nuestro particular interés el metabolismo energético del testículo fundamentalmente en relación con la oxidación de carbohidratos y lípidos, decidimos enfocar nuestro trabajo al estudio de la ATPasa mitocondrial únicamente, utilizando con este fin la fracción P_2 y como ión el Mg^{2+} , ya que es éste el ión divalente que funciona en condiciones fisiológicas.

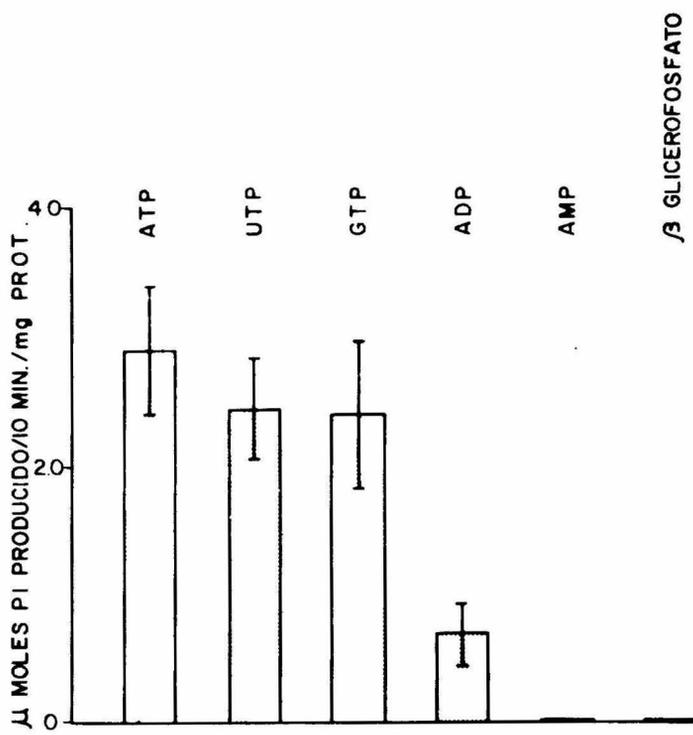
En primer término nos pareció de importancia examinar la especificidad de la hidrólisis enzimática del ATP por la fracción mitocondrial. Con este objeto fué determinada la producción de fosfato inorgánico a partir de diversos sustratos en presencia de iones Mg^{2+} y de la fracción mitocondrial del testículo - adulto. La figura 9 muestra que la actividad enzimática fué capaz de hidrolizar al ATP, GTP y UTP en forma similar, al ADP a menor velocidad y que en cambio no hidrolizó el AMP ni al β -glucorofosfato, apuntando por lo tanto a la especificidad hacia nucleótidos trifosfato característica de la ATPasa y a la presencia de una nucleótido difosfatasa de menor actividad.

Es bien sabido que la ATPasa mitocondrial de tejidos como el corazón y el hígado es estimulada por agentes desacoplantes de la fosforilación oxidativa como el 2,4- dinitrofenol (Lardy y col., 1953) e inhibida por antibióticos como la oligomicina - (Lardy y col., 1958; Huijing y Slater, 1961). Fueron estudiados por lo tanto estos efectos sobre la actividad de la ATPasa mitocondrial del testículo, comparando siempre con el efecto que estos agentes mostraban en nuestras manos sobre la ATPasa de mitocondrias de hígado de rata obtenidas siguiendo el mismo esquema de fraccionamiento de la figura 1.

Efecto de diferentes concentraciones de 2,4- dinitrofenol sobre la actividad de ATPasa mitocondrial tanto de hígado como de testículo .

Fué determinada la actividad enzimática en un medio de incubación que contenía al Mg^{2+} como ión exógeno y al 2,4- dinitro

Figura 9. Hidrólisis enzimática de diversos sustratos por la fracción mitocondrial de testículo de rata adulta normal.



fenol en las siguientes concentraciones: 0, 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} , 2.5×10^{-4} , 5×10^{-4} , 10^{-3} y 10^{-2} M. (figura 10). En el hígado fué observado el conocido efecto de este desacoplante, esto es, una estimulación de la actividad hasta del 215% a una concentración de 1×10^{-4} M ($p < 0.001$) y una inhibición a mayores concentraciones.

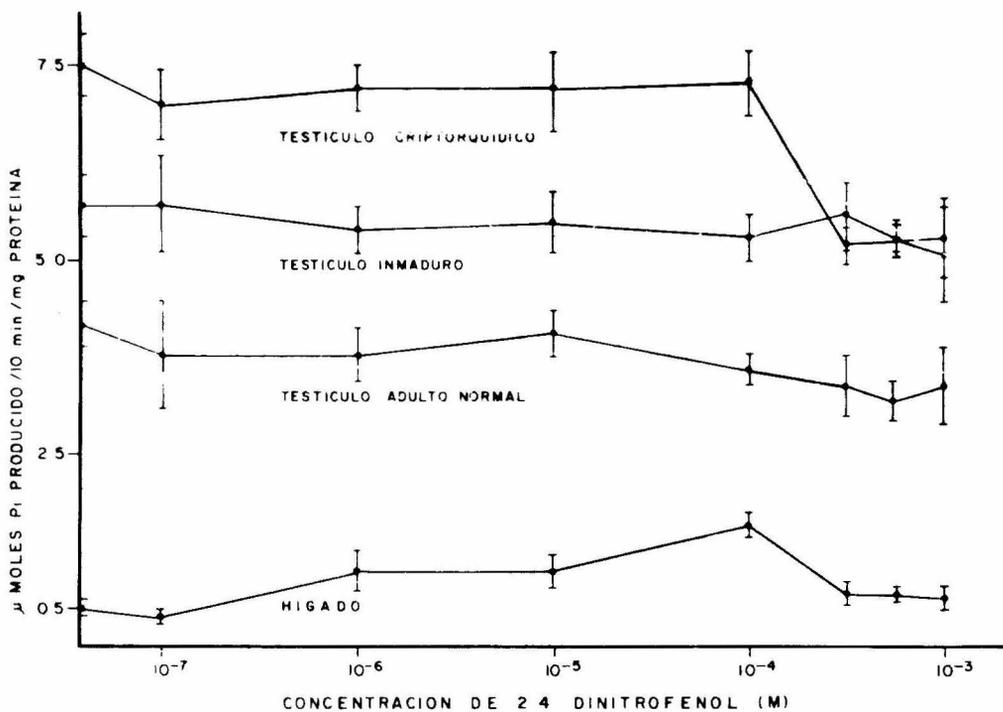
En el testículo inmaduro no fué observado efecto alguno sobre la actividad de ATPasa. Las diferencias observadas entre los valores promedio obtenidas para cada concentración fueron estadísticamente no significativas.

En el caso del testículo adulto normal y adulto criptorquídico tampoco fué observado algún efecto estimulativo, únicamente se manifestó una inhibición de la actividad en las soluciones más concentradas del 2,4- dinitrofenol, a partir de 2.5×10^{-4} M. En la tabla 2, se presenta el efecto del 2,4- dinitrofenol sobre ATPasa mitocondrial expresando la actividad porcentualmente.

Como la ATPasa mitocondrial del testículo demostró ser una enzima muy activa en presencia de magnesio, pensamos que quizá la presencia de este ión pudiera enmascarar el efecto del 2,4- dinitrofenol. Por ello, y para desechar esta posibilidad, fueron realizados experimentos utilizando las mismas concentraciones de 2,4- dinitrofenol en un medio de incubación carente de iones exógenos.

En la figura 11 puede observarse que la ATPasa mitocondrial del hígado, en ausencia de iones exógenos, se comportó --

Figura 10. Efecto de diferentes concentraciones de 2,4- dinitrofenol sobre la actividad de ATPasa mitocondrial tanto de hígado como de testículo de rata.



T A B L A 2

EFECTO DE 2,4-DINITROFENOL SOBRE LA ACTIVIDAD DE ATPasa MITOCONDRIAL

Concentración de 2,4-Dinitrofenol (M)	H í g a d o	T E S T I C U L O		
		Adulto Normal	Inmaduro (15 días de edad)	Adulto Criptorquídico
%				
0	100	100	100	100
1×10^{-7}	100	100	100	100
1×10^{-6}	202	100	100	100
1×10^{-5}	200	100	100	100
1×10^{-4}	215	100	100	100
2.5×10^{-4}	136	80	100	70
5×10^{-4}	139	80	100	70
1×10^{-3}	129	80	100	70
1×10^{-2}	57	40	100	34

% de la actividad enzimática

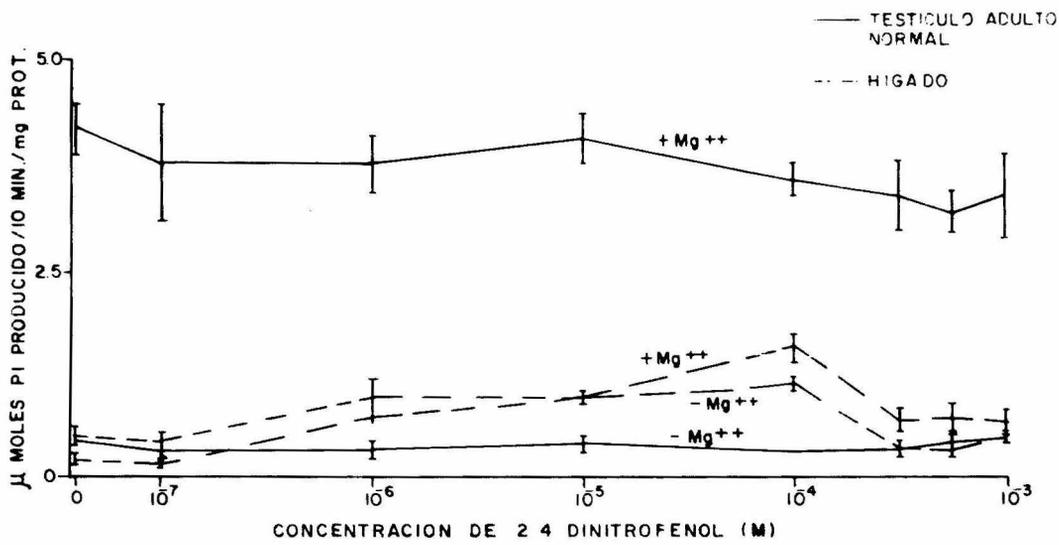
prácticamente igual que en presencia de Mg^{2+} , esto es, estimulación de la actividad enzimática hasta cuatro veces el valor basal por el 2,4- dinitrofenol e inhibición a concentraciones mayores. Es interesante hacer notar que la actividad enzimática se mantuvo en rangos semejantes a aquellos observados en presencia de iones. En cambio, el ATPasa del testículo, al suprimir la adición Mg^{2+} tampoco mostró sensibilidad hacia el agente desacoplante. Además, en estas condiciones, la disminución tan -- marcada que se observó en la actividad, confirmó que una gran parte de la actividad de ATPasa mitocondrial depende de iones Mg^{2+} .

En la tabla 3 se presenta el efecto del 2,4- dinitrofenol en ausencia de iones exógenos, sobre la ATPasa mitocondrial de testículo adulto criptorquídico. Se compara con los valores obtenidos con las mitocondrias de hígado. Como puede observarse, en estas condiciones el testículo criptorquídico también careció de sensibilidad hacia el 2,4- dinitrofenol y nuevamente pudo apreciarse la magnitud de la dependencia de Mg^{2+} de la ATPasa mitocondrial, que como sabemos ya, es aún más activa en esta -- condición de regresión del epitelio germinal del testículo.

Efecto de diferentes concentraciones de oligomicina sobre la actividad de ATPasa mitocondrial tanto de hígado como de testículo .

Fue determinada la actividad de la ATPasa mitocondrial -- tanto en el hígado como en el testículo en un medio de incubación que contenía Mg^{2+} 5 mM y oligomicina en las siguientes con

Figura 11. Efecto del 2,4- dinitrofenol sobre la actividad de ATPasa mitocondrial de hígado y de testículo adulto de rata, en presencia y en ausencia de Mg^{2+} exógeno.



T A B L A 3

EFFECTO DE 2,4- DINITROFENOL SOBRE LA
ACTIVIDAD DE ATPasa MITOCONDRIAL EN
AUSENCIA DE IONES EXOGENOS

Concentración de 2,4- Dinitro- fenol (M)	μMoles Pi producido/10min/mg prot.	
	H í g a d o	Testículo Adulto Criptorquídico
0	0.24 ± 0.06	1.20 ± 0.23
1×10^{-7}	0.18 ± 0	0.93 ± 0.29
1×10^{-6}	0.79 ± 0.04	0.93 ± 0.40
1×10^{-5}	0.99 ± 0.19	0.93 ± 0.12
1×10^{-4}	1.15 ± 0.08	1.26 ± 0.23
2.5×10^{-4}	0.34 ± 0.15	1.41 ± 0.33
5×10^{-4}	0.37 ± 0.07	0.99 ± 0.26
1×10^{-3}	0.49 ± 0.12	1.17 ± 0.41

centraciones: 0, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0 y 10 ug/ml respectivamente (tabla 4). Como era de esperarse, por el conocido efecto inhibitorio de la oligomicina sobre la ATPasa mitocondrial hepática - (Lardy y col., 1958), en este tejido fué observada una inhibición altamente significativa ($p < 0.001$) que llegó a ser del orden de un 65%. En cambio, tanto la ATPasa mitocondrial del testículo adulto normal como la del criptorquídico, mostraron una falta absoluta de sensibilidad a la oligomicina en todo el rango de concentraciones estudiadas.

En la tabla 5 se presentan los mismos valores de la tabla 4, pero expresados porcentualmente.

Efecto de 2,4- dinitrofenol, oligomicina y la combinación de ambos sobre la actividad de la ATPasa mitocondrial en diferentes condiciones fisiológicas del testículo y en hígado.

En la tabla 6 se presentan los resultados de una serie de experimentos en los que fueron utilizadas las concentraciones - 1×10^{-4} M de 2,4- dinitrofenol y 1 ug/ml de oligomicina respectivamente. Se escogieron porque son aquellos a los cuales se observó la estimulación y la inhibición máximas respectivamente - sobre la ATPasa mitocondrial de hígado. Se muestran los resultados de los experimentos individuales y no sus promedios debido a la variación que se encontró en los valores absolutos de actividad, de una preparación a otra.

En esta forma es posible observar la reproducibilidad del tipo de efecto del 2,4- dinitrofenol, de la oligomicina y de la

T A B L A 4

EFECTO DE OLIGOMICINA SOBRE LA
ACTIVIDAD DE ATPasa MITOCONDRIAL

Concentración de Oligomicina ($\mu\text{g/ml}$)	HIGADO	TESTICULO ADULTO NORMAL	TESTICULO CRIPTORQUIDICO
	μ Moles Pi producido / 10 min / mg proteína		
0	0.22 ± 0.03	2.25 ± 0.35	6.52 ± 0.38
0.05	0.18 ± 0.01	2.11 ± 0.15	6.64 ± 0.39
0.10	0.12 ± 0.032	2.66 ± 0.19	6.68 ± 0.46
0.50	0.11 ± 0.02	2.31 ± 0.26	6.65 ± 0.35
1.0	0.09 ± 0.02	2.31 ± 0.30	6.41 ± 0.31
10.0	0.08 ± 0.005	2.17 ± 0.32	6.46 ± 0.55

T A B L A 5
 EFECTO DE OLIGOMICINA SOBRE
 LA ACTIVIDAD DE ATPasa MITOCONDRIAL

Concentración de oligomicina (µg/ml)	HIGADO	TESTICULO ADULTO NORMAL	TESTICULO ADULTO CRIPTORQUIDICO
	%		
0	100	100	100
0.05	82	100	100
0.1	54	100	100
0.5	50	100	100
1.0	41	100	100
10.0	36	100	100

% de la actividad enzimática

T A B L A 6

EFEECTO DE 2,4- DINITROFENOL Y DE OLIGOMICINA
SOBRE LA ACTIVIDAD DE ATPasa MITOCONDRIAL

Condición Fisiológica	No. Ex- pto.	Sin adición	2,4dinitrofen.	Oligomicina	2,4 DNF + Oligom.
		µ Moles Pi producido / 10 min / mg protefna			
Testículo Adulto Normal	1	7.38 ± 0.63	6.72 ± 1.17	7.53 ± 1.17	6.17 ± 0.63
	2	10.0 ± 0.97	9.92 ± 0.73	9.61 ± 0.83	9.38 ± 0.83
	3	3.69 ± 0.61	4.12 ± 0.46	3.46 ± 0.58	3.25 ± 0.64
	4	5.94 ± 0.39	5.65 ± 0.47	6.23 ± 0.73	6.33 ± 0.78
Testículo Adulto Criptorqui- dico.	1	6.52 ± 1.44	5.57 ± 1.11	6.21 ± 1.66	6.9 ± 2.41
	2	10.34 ± 0.66	9.34 ± 0.91	9.36 ± 0.59	11.37 ± 1.14
	3	8.44 ± 1.24	8.86 ± 0.69	8.83 ± 1.19	7.82 ± 2.06
Testículo Rata Hipofisecto- mizada.	1	3.14 ± 0.22	3.28 ± 0.53	3.24 ± 0.46	2.99 ± 0.18
	2	5.00 ± 0.47	5.44 ± 0.51	5.48 ± 0.80	5.42 ± 0.86
	3	4.42 ± 0.41	3.27 ± 0.46	3.75 ± 0.47	3.55 ± 0.71
Testículo Inmaduro (14 - 15 días)	1	9.3 ± 0.79	12.3 ± 1.78	9.91 ± 0.95	9.35 ± 0.73
	2	8.52 ± 0.61	8.53 ± 0.50	10.96 ± 1.79	8.28 ± 0.35
	3	8.68 ± 0.68	8.40 ± 0.58	8.95 ± 0.57	8.21 ± 0.78
	4	8.60 ± 0.66	8.54 ± 0.96	7.34 ± 0.44	6.82 ± 0.90
Hígado Adulto Normal	1	1.66 ± 0.17	6.91 ± 0.14	0.60 ± 0.12	0.94 ± 0.13
	2	1.26 ± 0.22	3.48 ± 0.41	0.57 ± 0.08	0.24 ± 0.05
	3	1.05 ± 0.11	3.72 ± 0.38	0.83 ± 0.08	0.687 ± 0.04
	4	0.83 ± 0.10	1.86 ± 0.23	0.47 ± 0.140	0.308 ± 0.06

combinación de ambos, en primer término, sobre la ATPasa mitocondrial hepática, es decir, estímulo por la adición de 2,4- dinitrofenol e inhibición por la adición de oligomicina así como por la presencia simultánea de ambos.

En cambio en el testículo, independientemente del tipo de estirpes celulares que estuvieron presentes en cada situación fisiológica estudiada y de su grado de maduración, todas las preparaciones mitocondriales mostraron insensibilidad en la actividad de ATPasa a la adición de 2,4- dinitrofenol, de oligomicina, y de la combinación de ambos agentes.

D I S C U S I O N

En estudios previos llevados a cabo en nuestro laboratorio, se observó que el testículo adulto normal posee una elevada actividad de ATPasa - (Ca^{2+} - Mg^{2+}) y que esta actividad aumentaba notablemente en condiciones de inmadurez (Delhumeau-Ongay y col., 1973a) y de regresión del epitelio germinal (Delhumeau-Ongay y col., 1973b).

Era pues de interés para nosotros determinar la localización intracelular de esta actividad enzimática, tanto en el testículo adulto normal como en el inmaduro y el criptorquídico, tomando a éste como una de las varias condiciones posibles de regresión del epitelio germinal, sin olvidar, claro está -- los resultados obtenidos in vitro no necesariamente reflejan -- la situación que pueda existir in vivo.

En todas las condiciones fisiológicas estudiadas el testículo demostró poseer actividad ATPásica tanto en la fracción mitocondrial como en la microsomal, ambas más elevadas en la inmadurez y en la criptorquidia que en testículo adulto normal. Sin embargo este aumento en la actividad de ATPasa, que en los trabajos previos arriba mencionados se había detectado sin poder discriminar su localización intracelular, ahora se ha visto que no es de la misma naturaleza en la inmadurez y en la criptorquidia (ver figura 8).

En efecto, aunque ambas actividades de ATPasa están aumentadas, en el testículo inmaduro lo está más la mitocondrial, mientras que en la criptorquidia la más elevada es la microsomal. Nos referiremos a ésta en primer término.

Es importante considerar que al introducir el testículo - en el abdomen, el aumento de temperatura ambiental a que se expone el órgano destruye paulatinamente las células más avanzadas del epitelio germinal, de tal manera que a las 6 a 9 semanas de criptorquidia (condición de los animales estudiados por nosotros) se encuentran presentes en el testículo principalmente las espermatogonias {que no han dejado de estar expuestas a hormonas y que funcional y morfológicamente son diferentes de las de la rata inmadura (Clermont y Perey, 1957; Clermont y Morgentaler, 1955; Lin y Fritz, 1972)}, las células de Sertoli y las células del tejido intersticial, que se piensa conservan en estas condiciones la mayoría de sus funciones y muy particularmente la de producir esteroides (Waites, 1970; Hooker, 1970). - No es pues de extrañarse que, al aumentar proporcionalmente la población de este último tipo de células, el retículo endoplásmico, de importancia fundamental en la síntesis de esteroides, aparezca también en una mayor proporción. Ignoramos cual pueda ser el papel de la ATPasa - Ca^{2+} microsomal en el testículo. Es bien conocida su importancia en el ciclo contracción-relajación de miofibrillas del músculo, ya que se le atribuye el papel de la regulación de los niveles de Ca^{2+} , de los que a su vez depende la posibilidad de que el músculo se contraiga, si aumentan, o se relaje, si disminuyen (ver revisión de Martonosi, 1972).

Será de sumo interés en estudios futuros, examinar si esta actividad enzimática tiene alguna relación con la función -- productora o secretora de hormonas esteroides. Es posible sin embargo que también esté ligada a otras funciones, ya que la ac

tividad de ATPasa microsomal fuè tambièn de magnitud considerable en el testículo inmaduro, que por no haber estado aún expuesto a la acción de las gonadotrofinas carecía aún del estímulo necesario para producir andrógenos.

Consideremos ahora a la ATPasa mitocondrial, sobre la que se centró nuestro interés por pensar que podría estar más relacionada con el metabolismo oxidativo del testículo, que es sui generis, tanto por la presencia de una activa glicolisis aeróbica como por la dependencia de glucosa exógena que desarrolla el órgano durante su maduración (Free, 1970).

La ATPasa mitocondrial del testículo adulto normal mostró tener una elevada actividad específica, que fuè aún mayor en -- las fracciones mitocondriales del testículo criptorquídico y -- del inmaduro, teniendo éste los niveles más elevados. Estas observaciones llamaron nuestra atención, pues es bien sabido que la actividad ATPásica de mitocondrias recién preparados de tejidos tales como el hígado, el corazón, el riñón, etc. es baja, -- al grado de que, se menciona repetidamente en la literatura que para estudiar la función mitocondrial de tal o cual preparación "solo se utilizaron aquellos que mostraban bajos niveles de actividad de ATPasa" (Schnaitman y Greenawalt, 1968).

Nos pareció pues de interés estudiar algunas de las características de la actividad de ATPasa mitocondrial del testículo iniciando este estudio por el efecto que sobre ella podrían tener los clásicos agentes relacionados con la ATPasa mitocondrial: el 2,4- dinitrofenol como estimulante, y la oligomicina como --

inhibidor, ambos activos normalmente a bajas concentraciones -- (Lardy y col., 1958; Huijing y Slater, 1961; Lardy y Wellman, - 1953).

El 2,4- dinitrofenol, agente desacoplante de la fosforila-
ción oxidativa, habitualmente estimula la actividad de la ATPa-
sa mitocondrial cuando se agrega hasta concentraciones de 1×10^{-4} M (Lardy y col., 1953; Hemker, 1964). A mayores concentra-
ciones su efecto es inhibitorio, probablemente por alterar la -
molécula de la enzima (Hemker, 1964). En nuestros experimentos-
pudimos observar que a concentraciones inferiores a 1×10^{-4} M,
en ningún caso la ATPasa mitocondrial del testículo fué sensi--
ble a la adición de 2,4- dinitrofenol. Se utilizaron mitocon- -
drias recién preparadas, provenientes de testículos de animales
en muy diversas condiciones fisiológicas: inmaduras, adultos --
normales, adultos criptorquídicos e hipofisectomizados. Este ha
llazgo implica que independientemente del tipo de estirpes celu-
lares presentes, todas las poblaciones celulares del testículo-
presentaron mitocondrias en cuya ATPasa no fué posible detectar
sensibilidad al 2,4- dinitrofenol en las condiciones experimen-
tales utilizadas.

Se ha mencionado en la literatura la posibilidad de que -
sea la porción de ATPasa no activada por iones divalentes la --
sensible a 2,4- dinitrofenol (Pedersen, 1971). Considerando que
en testículo la activación de la enzima por Mg^{2+} fuera de tal -
magnitud que pudiera enmascarar el estímulo producido por 2,4--
dinitrofenol, en algunos experimentos se suprimió la adición --
del ión. Además de repetirse la insensibilidad al 2,4- dinitro-

fenol, pudo demostrarse que en comparación con las mitocondrias hepáticas, es muy elevada la diferencia en actividad de ATPasa en presencia y en ausencia de Mg^{2+} exógeno. Hacemos hincapié en la palabra "exógeno" porque no hicimos ningún intento de depletar de magnesio a las mitocondrias.

Hasta donde nosotros sabemos, es este el primer informe sobre una ATPasa mitocondrial de un tejido normal de mamífero - insensible al 2,4- dinitrofenol.

Recientemente se ha descrito la incapacidad del 2,4- dinitrofenol para estimular la ATPasa mitocondrial de algunas células de hepatoma (Pedersen, 1971; Kolarov, 1973). En estas mitocondrias se demostró que sus funciones de respiración, absorción de calcio, translocación de nucleótidos de adenina, así como el patrón electroforético de proteínas de las membranas mitocondriales no diferían mucho de las de las mitocondrias de células ascíticas tumorales de Ehrlich, considerados como poseedoras de mitocondrias normales (Kolarov, 1973). Estos datos parecerían apuntar a la noción de que la incapacidad del 2,4- dinitrofenol de estimular una actividad de ATPasa mitocondrial no necesariamente afecta a la funcionalidad global de esas mitocondrias.

En lo que toca al efecto inhibitorio del 2,4- dinitrofenol que observamos en algunas de las preparaciones de mitocondrias testiculares al agregar el agente desacoplante a altas concentraciones, está de acuerdo con el efecto inhibitorio observado en el hígado por nosotros mismos (figura 10) y por otros

autores así como con un estudio reciente en espermatozoide humano eyaculado (Abla y col., 1974).

Otro agente cuyo efecto inhibitorio sobre la actividad de ATPasa mitocondrial se ha vuelto clásico es el antibiótico oligomicina (Lardy y col., 1958; Lardy y McMurray, 1959; Huijug y Slater, 1961). En los numerosos intentos de estudiar los posibles factores de acoplamiento de la fosforilación oxidativa, -- uno de los más ampliamente estudiados es la ATPasa soluble de las mitocondrias o factor de acoplamiento F_1 de Pullman, Penefsky, Datta y Racker (1960a; 1960b), que se vuelve sensible a la oligomicina al agregarle otro factor submitocondrial al que se llamó F_o (Racker, E., 1962; Racker, E., 1963).

El extenso trabajo experimental de Tzagoloff y col. (ver-revisión, 1973) con mitocondrias de levaduras, le han permitido postular que el complejo ATPasa (peso molecular 460000) consta, por lo menos de nueve subunidades proteicas. De ellas, por lo menos cinco constituyen la ATPasa soluble o factor F_1 y para -- que exista la sensibilidad a oligomicina, es necesaria la presencia de una proteína, que distingue con las siglas OSCP (oligomycin sensitivity conferring protein ó proteína que confiere sensibilidad a oligomicina). Para integrar al factor F_1 con el factor OSCP ha postulado como necesaria la presencia de un factor membranal altamente hidrofóbico compuesto por lo menos de 3 subunidades proteicas.

En nuestros experimentos, en ninguna de las preparaciones mitocondriales de testículo estudiados pudimos encontrar un - -

efecto inhibitorio de la oligomicina sobre la actividad de ATPasa. En mitocondrias de hígado observamos, en cambio, un efecto similar al informado por diversos autores (Huijing y Slater, -- 1961; Lardy y col., 1958; Lardy y col., 1959).

Avner y Griffiths (1970), encontraron algunas mutantes de levaduras cuya ATPasa mitocondrial era resistente a oligomicina. -- Hasta donde sabemos, el presente trabajo es el primer informe de tal resistencia en mitocondrias de mamífero. Será de sumo interés en estudios futuros, realizar la purificación del complejo ATPasa mitocondrial de testículo y la separación electroforética de sus subunidades proteicas para indagar si el factor -- OSCP o algún otro componente se encuentra ausente o es de índole diversa a los de las ATPasas hasta ahora estudiadas (Tzagoloff, 1973; Pedersen, 1971).

Esa investigación se nos antoja importante, pues cada día cobra mayor aceptación en el mundo científico la hipótesis quimiosmótica de Mitchell (1966), que asigna un papel fundamental a la ATPasa mitocondrial en el fenómeno de la fosforilación oxidativa.

El hecho de que las mitocondrias del testículo en todas las condiciones fisiológicas estudiadas hayan demostrado ser -- aberrantes, por lo menos en lo que se refiere a las características de su ATPasa, plantea el interrogante sobre el grado de -- funcionalidad de estos organelos.

Morfológicamente, las mitocondrias presentan variaciones-

en el curso de la diferenciación celular, y en las estirpes celulares más avanzadas del epitelio germinal aparecen con formas y disposición muy peculiares (Machado de Domenech y col., 1973; Burgos y col., 1970).

Funcionalmente han sido calificadas como normales, en base a trabajo experimental sumamente limitado (Fritz, 1973; Free, - 1970), por lo que será de sumo interés en un futuro próximo hacer un estudio cuidadoso de la función de las mitocondrias testiculares en diversas condiciones de diferenciación en lo que se refiere a respiración en presencia de diversos sustratos, eficiencia en la fosforilación oxidativa y control respiratorio, absorción de calcio, translocación de nucleótidos de adenina, - sistemas transportadores, contenido y movimiento de iones, contenido de piridín nucleótidos, etc. Asimismo será interesante - verificar si efectivamente, como ha sido sugerido ya (Means y - Hall, 1968; Hollinger, 1971) el testículo carece de los sistemas reguladores de los niveles de ATP existentes en otros tejidos (Hollinger, 1971; Atkinson y Walton, 1967).

RESUMEN Y CONCLUSIONES

Fu  investigada la localización intracelular de la ATPasa ($\text{Ca}^{2+} - \text{Mg}^{2+}$) del testículo de rata, determinando la actividad enzimática en cada una de las fracciones subcelulares del testículo en diferentes condiciones fisiológicas, cuya composición morfológica se determinó por microscopía electrónica. Se definieron dos tipos de ATPasas, una mitocondrial y otra microsomal.

Como era de particular interés profundizar en el estudio del metabolismo energético del testículo en lo que se refiere a aspectos oxidativos, se trabaj  únicamente con la ATPasa mitocondrial.

Es sabido que en otros tejidos, agentes como el 2,4- dinitrofenol desacoplan la fosforilación oxidativa y estimulan a la ATPasa mitocondrial y que antibióticos como la oligomicina inhiben a la fosforilación oxidativa y a la ATPasa de la mitocondria. Por lo tanto, fué estudiado el efecto de estos agentes sobre la ATPasa mitocondrial tanto de testículo como de hígado, tomando a este último como referencia.

La ATPasa mitocondrial del testículo en todas las condiciones fisiológicas estudiadas (testículo adulto normal, adulto - criptorquídico, adulto de rata hipofisectomizada e inmaduro), manifestó un comportamiento aberrante, ya que fué insensible al 2,4- dinitrofenol hasta concentraciones de alrededor de 1×10^{-4} M y también a la oligomicina, hasta concentraciones de 1 $\mu\text{g/ml}$.

B I B L I O G R A F I A

1. Abla, A., Mrouch, A. y Durr, I.F. (1974) A divalent cation dependent ATPase in human spermatozoa. *J. Reprod. Fert.* 37 121.
2. Atkinson, D.E. y Walton, G.M. (1967) Adenosine triphosphate conservation in metabolic regulation. *J. Biol. Chem.* -- 242, 3289.
3. Avner, P.R. y Griffiths, D.E. (1970) Oligomycin resistant - mutants in yeast. *FEBS Lett.* 10, 202.
4. Bishop, D.W. (1969) Testicular enzymes as fingerprints in the study of spermatogenesis, en "Reproduction and sexual-behavior" p. 261, ed. Diamond, M. Indiana Univ. Press - -- Bloomington.
5. Bishop, P.M.F. (1954) "Recent Advances in Endocrinology" - p. 222 (7th). Churchill London.
6. Bonting, S.L., Simon, K.A. y Hawkins, N.M. (1961) Studies-on sodium-potassium-activated adenosine triphosphatase - -- I: Quantitative distribution in several tissues of the cat. *Arch. Biochem. Biophys.* 95, 416.
7. Blackshaw, A.W. y Elkington, J.S.H. (1970) Developmental - changes in lactate dehydrogenase isoenzymes in the testis-of the immature rat. *J. Reprod. Fert.* 22, 69.
8. Braddy, R.O. (1951) Biosynthesis of radioactive testosterone in vitro. *J. Biol. Chem.* 193, 145.
9. Brinck-Johnson, T. y Eik-Nes, K.B. (1957) Efecto of human chorionic gonadotrophin on the secretion of testosterone - and 4-androstene-3, 17-dione by the canine testis. *Endocrinol.* 61, 676.
10. Burgos, M.H. y Vitale-Calpe, R. (1967) Mechanism of sper-- miation in the toad. *Am. J. Anat.* 120, 227.
11. Burgos, M.H., Vitale-Calpe, R. y Aoki, A. (1970) Fine - -- structure of the testis and its functional significance. - en "The Testis", vol. 1, p. 551, eds. Johnson, A.D., Gomes W.R. y VanDemark, N.L., Academic Press, London.
12. Chance, B. y Williams, G.R. (1956) "The respiratory chain- and oxidative phosphorylation. *Advan. Enzymol.* 17, 65.
13. Clausen, J. (1969) Lactate dehydrogenase isoenzymes of - - sperm cells and testes. *Biochem. J.* 111. 207.

14. Clermont, Y. (1958) Contractile elements in the limiting - membrane of the seminiferous tubules of the rat. Exptl. -- Cell Res. 15, 138.
15. Clermont, Y. y Harvey, S.C. (1965) Duration of the cycle - of the seminiferous epithelium of normal hypophysectomized and hypophysectomized hormone treated albino rats. Endocrinology 76, 80.
16. Clermont, Y. y Morgentaler, H. (1955) Quantitative study - of spermatogenesis in the hypophysectomized rat. Endocrinology 57, 369.
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.
18. Courot, M., Hochereau-de Reviers, M.T. y Ortavant, R. (1970) Spermatogenesis, en "The Testis", vol. 1, p. 339, eds. - - Johnson, A.D., Gomez, W.R. y VanDemark, N.L., Academic - - Press, London.
19. Davis, J.R. y Morris, R.N. (1963) Effect of glucose on incorporation of L-lysine - U - ¹⁴C into testicular proteins. Am. J. Physiol. 205, 833.
20. Delhumeau-Ongay, G., Trejo-Bayona, R. y Lara-Vivas, L. - - (1973a) Changes of (Ca²⁺ - Mg²⁺) adenosine triphosphatase-activity in rat testis throughout maturation. J. Reprod. - Fert. 33, 513.
21. Delhumeau-Ongay, G., Trejo-Bayona, R., Alvarez-Buylla, R. - y Lara-Vivas, L. (1973b) Increase of (Ca²⁺ - Mg²⁺) adenosine triphosphatase activity in rat testis undergoing regression of the germinal epithelium. J. Reprod. Fert. 34, 149.
22. Dickens, F. y Simer, F. (1930) the metabolism of normal -- and tumour tissue. II The respiratory quotient and the relationship of respiration to glycolysis. Biochem. J. 24, - 1301.
23. Dickens, F. y Simer, F. (1931) The metabolism of normal -- and tumour tissue. IV The respiratory quotient in bicarbonate-media. Biochem. J. 25, 985.
24. Dowben, R.M. (1971) Cell Biology. Harper and Row Publishers New York. p. 213.
25. Ewing, L.L. y VanDemark, N.L. (1963) Effect of the temperature elevation in vivo on subsequent metabolic activity of rabbit testicular tissue in vitro. J. Reprod. Fert. 6, 9.

26. Featherstone, R.M., Nelson, W.O., Welden, F., Marberger, - E., Boccabella, A. y Boccabella, R. (1955) Pyryvate oxidation in testicular tissues during furadroxyl-induced spermatogenic arrest. *Endocrinology* 56, 727.
27. Field, J.B., Pastan, I., Herring, B. y Johnson, P. (1960)- Studies of pathways of glucose metabolism of endocrine - - tissues. *Endocrinology* 67, 801.
28. Firlit, C.F. y Davis, J.R. (1965) Morphogenesis of the residual body of the mouse testis. *Quart. J. Microscop. Sci.* 106, 93.
29. Free, M.J. (1970) Carbohydrate metabolism in the testis. - en "The Testis", vol. II, p. 125, eds. Johnson, A.D., Gomme, W.R. y VanDemark, N.L. Academic Press, London.
30. Free, M.J. y VanDemark, N.L. (1968) Gas tensions in spermat^{ic} and peripheral blood of rams with normal and heat treated testes. *Am. J. Physiol.* 214, 863.
31. Free, M.J. y VanDemark, N.L. (1969) Radio respirometric -- studies on glucose metabolism in testis tissue from rat, - rabbit and chicken. *Comp. Biochem. Physiol.* 30, 323.
32. Free, M.J., Massie, E.D. y VanDemark, N.L. (1969) Glucose-metabolism in the cryptorchid rat testis. *Biol. Reprod.* 1 354.
33. Fritz, I.B. (1973) Selected topics on the biochemistry of-spermatogenesis, en "Current topics in celular regulation" vol. 7, p. 129, eds., Horecker, B.L. y Stadtman, E.R., Academic Press, London.
34. Gemzell, C. y Roos, P. (1966) The physiology and chemistry of follicle-stimulating hormone, en "The pituitary gland", vol. 1 p. 492, eds., Harris, G.W. y Donovan B.T. Berkeley, Univ. California, Press.
35. Hall, P.F. y Eik-Nes, K.B. (1963) The influence of gonadotrophins in vivo upon the biosynthesis of androgen by homogenate of rat testis. *Biochem. Biophys, Acta* 71, 438.
36. Hall, P.F. y Eik-Nes, K.B. (1962) The action of gonadotrophic hormones upon rabbit testis in vitro. *Biochem. Biophys Acta* 63, 411.
37. Hall, P.F., Nishizawa, E.E. y Eik-Nes, K.B. (1963) Biosynthesis of testosterone by rabbit testis. Homogenate V - -- slices. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 114, 791.

38. Härkönen, M. y Kormanen, M. (1971) Energy metabolism of the normal and cryptorchid rat testis. *J.Reprod.Fert.* 25,29.
39. Hartree, E.F. (1972) Determination of protein. A modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Analytical Biochem.* 48, 422.
40. Hemker, H.C. (1964) Inhibition of adenosine triphosphatase and respiration of rat liver mitochondria by dinitrophenols. *Biochim.Biophys. Acta*, 81,1.
41. Hollinger, M.A. y Davis, J.R. (1968) Aerobic metabolism of uniformly labelled ¹⁴C glucose in tissue slices of rat testis. *J.Reprod.Fert.* 17,343.
42. Hollinger, M.A. (1971) Metabolism of ATP by testis mitochondria of 25 - day old rats. *J.Reprod.Fert.* 25,443.
43. Hooker, Ch. W. (1970) The intertubular tissue of the testis, en "The Testis", vol. 1, p. 483, eds., Johnson, A.D., Gomes, W.R. y VanDemark, N.L., Academic Press, London.
44. Hoskins, D.D. y Stephens, D.T. (1969) Regulatory properties of primate sperm phosphotruktokinase. *Biochim.Biophys. Acta*, 191,292.
45. Huijing, F. y Slater, E.C. (1961) The use of oligomycin as an inhibitor of oxidative phosphorylation. *J. Biochem. (Tokyo)*, 49,493.
46. Johnson, A.D. (1970) Testicular lipids, en "The Testis", vol. 2, p. 193, eds., Johnson, A.D., Gomes, W.R. y Van Demark, N.L., Academic Press, London.
47. Katzen, H.M. (1966) The multiple forms of mammalian hexokinase and their significance to the action of insulin. *Adv.Enz.Reg.* 5,335.
48. King, T.E. (1966). Reconstitution of the respiratory chain. *Adv. Enzymol.* 28,155.
49. Kolarov, J., Keizela, S., Krempasky, V. y Ujhazy, V. (1973) Some properties of coupled hepatoma mitochondria exhibiting uncoupler insensitive ATPase activity. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 55,1173.
50. Lacy, D. (1962) Certain aspects of testis structure and function. *Brit. Med. Bull*, 18,205.
51. Lacy, D. y Lofts, B. (1962) The use of ionizing and radiation and estrogen treatment on detection of hormone synthesis by the Sertoli cells. *_.Physiol. (London)*, 161,23.
52. Lacy, D., Lofts, B., Kinson, G., Hopkins, D. y Dott, H. (1965) Sertoli cells and steroid synthesis. *Gen. Comp. Endocrinol.* 5,693.

53. Lardy, H.A. y Ferguson, S.M. (1969) Oxidative phosphorylation in mitochondria. *Ann.Rev.Biochem.* 38,991.
54. Lardy, H.A., Johnson, D. y McMurray, W.C. (1958) Antibiotics as tools for metabolic studies. I. A survey of toxic antibiotics in respiratory, phosphorylative and glycolytic systems. *Arch.BiochemBiophys.* 78,587.
55. Lardy, H.A. y McMurray, W.C. (1959) The mode of action of oligomycin. *Federation Proc.* 18,269.
56. Lardy, H.A. y Wellman, H. (1953) The catalytic effect of 2,4- dinitrophenol on adenosine triphosphate hydrolysis by cell particles and soluble enzymes. *J.Biol.Chem.* 201,357.
57. 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.
58. Lehninger, A.L. (1964) *The mitochondrion: Molecular basis of structure and function.* W.A.Benjamin, Inc. New York.
59. Lehninger, A.L. (1970) *Biochemistry: The molecular basis of cell structure and function,* worth Publishers, Inc. N.Y.
60. Lehninger, A.L. (1973) *Bioenergetics: The molecular basis of biological energy transformations.* W.A. Benjamin, Inc. California.
61. Leiderman, B. y Mancini, R.E. (1968) Aerobic and anaerobic lactate production in the prepuberal and adult rat testis. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 128,818.
62. Lin, C.H. y Fritz, I.B. (1972) Studies on spermatogenesis in rats. IV. Rates of oxidation of palmitate and pyruvate by various testicular cell populations. *Can. J. Biochem.* 50,963.
63. Linford, E. (1968) The hexokinase of boar spermatozoa. *Biochem. J.* 110,45p.
64. MacLeod, J., Pazianos, A. y Roy, B.S. (1966) The restoration of human spermatogenesis and of reproductive tract with urinary gonadotropins following hypophysectomy. *Fert. Sterility* 17,7.
65. Machado de Domenech, E., Domenech, E., Aoki, A. y Blanco, A. (1972) Association of the testicular lactate dehydrogenase isozyme with a special type of mitochondria. *Biol. of Reproduction* 6,136.
66. Mancini, R.E., Nolzaco, J. y De la Balze, F.A. (1952) Histochemical study of normal adult testes. *Anat.Record.* 114,27.
67. Mancini, R.E., Seiguer, A.C. y Lloret, A.P. (1968) Effect of gonadotropins on the testis of hipophysectomized patients. *Gonadotropins*, p. 503, ed. Rosemberg, E.

68. Martonosi, A. (1972) Biochemical and clinical aspects of sarcoplasmic reticulum function, en "Current topics in membranes and transport", vol. 3, p. 83, eds. Bronner, F. y Kleinzeller, A., Academic Press, London.
69. Means, A.R. y Hall, P.F. (1967) Effect of FSH on protein biosynthesis in testes of the immature rats. *Endocrinology* 81,1151.
70. Means, A.R. y Hall, P.F. (1968) Protein biosynthesis in the testis II. Role of adenosine triphosphate (ATP) in stimulation by glucose. *Endocrinology* 83,86.
71. Mitchell, P. (1966) Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation. Glynn Res. Ltd. Bodmin, Cornwall.
72. Monn, E., Desautel, M. y Christiansen, R. O. (1972) Highly specific testicular adenosine 3', 5'-monophosphate phosphodiesterase associated with sexual maturation. *Endocrinology* 91, 716.
73. Morris, M.D. y Chaikoff, I.L. (1959). The origin of cholesterol in liver, small intestine, adrenal gland and testis of the rat: Dietary versus endogenous contributions. *J. Biol. Chem.* 234,1095.
74. Mounib, M.S. y Eisan, J.S. (1972) Mitochondrial and cytosolic enzymes in the testicular tissue of cod and rabbit. *Endocrinology* 91,1375.
75. Nelson, W.O. (1952) Interrelation of gonadotrophic and gonadal hormones in the regulation of testicular functions *Endocrinology* 4,271.
76. Pedersen, P.L., Eska, T., Morris, H.P. y Catterall, W.A. (1971). Deficiency of uncoupler-stimulated adenosine triphosphatase activity in tightly coupled hepatoma mitochondria. *Proc.Nat.Acad.Sci. U.S.A.* 68,1079.
77. Penefsky, H.S., Pullman, M.E., Datta, A. y Racker, E. (1960a) Partial resolution of enzymes catalyzing oxidative phosphorylation. I Purification and properties of soluble dinitrophenol-stimulated adenosine triphosphatase. *J.Biol.Chem.* 235,3322.
78. Penefsky, H.S., Pullman, M.E., Datta, A. y Racker, E. (1960b) Partial resolution of enzymes catalyzing oxidative phosphorylation II Participation of a soluble ATPase in oxidative phosphorylation. *J.Biol.Chem* 235,3330.
79. Pinchot, G.B. y Hormansky, M. (1962) Characterization of a high energy intermediate of oxidative phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 48,1970.

80. Racker, E. (1962) Studies of factors involved in oxidative phosphorylation. Proc. Natl. Sci. U.S. 48,1659.
81. Racker, E. (1963) A mitochondrial factor conferring oligomycin sensitivity on soluble mitochondrial ATPase. Biochem Biophys. Res. Commun. 10,435.
82. Racker, E. (1965) Mechanisms in bioenergetics. Academic Press, Inc. New York.
83. Scott, T.W. y Setchell, B.P. (1968) Lipid metabolism in the testis of the ram. Biochem. J. 107,273.
84. Schnaitman, C. y Greenawalt, J.W. (1968) Enzymatic properties of the inner and outer membranes of rat liver mitochondria. J. Cell. Biol. 38,158.
85. Schmidt, F.C. (1964) Linch-und elektronenmikroskopische unter su chungenam mens anlichen hoden und nebenhoden. Z. Zellforch Mikroskop. Anat. 63,707. c.f.Free,1970.
86. Setchell, B.P. (1970) Testicular blood supply, lymphatic drainage, and secretion of fluid, en "The Testis" Vol. 1 p. 101 (1970) eds., Johnson, A.D., Gomes, W.R. y VanDemark, N.L., Academic Press, London.
87. Slater, E.C. (1958). Oxidative phosphorylation. Rev.Pure Appl. Chem. (Aust.), 8,221.
88. Sosa, A., Altamirano, E., Hernández, P. y Rosado, A. (1972) Developmental pattern of rat testis hexokinase. Life Sciences II, Part II, 499.
89. Steinberger, E. y Duckett, G.E. (1965). The effect of estrogen or testosterone on iniciation and maintenance of spermatogenesis in the rat. Endocrinology 76,1184.
90. Steinberger, E. y Duckett, G.E. (1967) Hormonal control of spermatogenic J.Reprod.Fert.suppl. 2, 7587.
91. Steinberger, E. y Steinberger, A. (1969) The spermatogenic of the testes, en "The Gonads", p. 715, eds. McKerns, K.W. Appleton Century-Crofts, N.Y.
92. Steinberg, E. y Wagner, C. (1961). Observations on the endogenous respiration of rat testicular tissue. Endocrinology 69,305.
93. Tepperman, J., Tepperman, H.M. y Dick, H.J. (1949) A study of the metabolism of rat testis in vitro. Endocrinology 45,491.
94. Tepperman, H.M. y Tepperman, J. (1950) Glucose utilization in vitro by normal adult , immature and cryptorchid testis. Endocrinology 47,459.

95. Trejo Albarrán R. (1972) Posible correlación entre la actividad de la ATPasa dependiente de Ca^{2+} ó Mg^{2+} y la diferenciación celular en el testículo de la rata. Tesis profesional. I.P.N.
96. Tzagoloff, A., Meryl, S.P. y Sierra, M.F. (1973) Biosynthesis of mitochondrial enzymes. *Biochim. Biophys. Acta* (Br), 301,71.
97. VandeBerg, J.L., Cooper, D.W. y Close, P.J. (1973) Mammalian testis phosphoglycerate kinase. *Nature New Biol.* 243,48.
98. VanDemark, N.L. y Free, M.J. (1970) Temperature effects, en "The Testis", vol. 3, p. 233, ed., Johnson, A.D., Gomes, W.R. y Vandemark, N.L. Academic Press, London.
99. Vilar, O., Pérez del Cerro, M.I. y Mancini, R.E. (1962) The Sertoli cells as a bridge cell between the basal membrane and the germinal cells. *Exptl. Cell Res.* 27,158.
100. Waites, G.M.H. (1970) Temperature regulation and the testis, en "The Testis", vol. 1, p. 241, eds. Johnson, A.D., Gomes, W.R. y VanDemark, N.L., Acad. Press, London.
101. Zinkham, W.H. (1968) Lactate dehydrogenase isozymes of testis and sperm: Biological and Biochemical properties and genetic control. *Am. N.Y. Acad. Sci.* 151,598.