El gosipol inhibe a la LDH-C4 debido a la presencia del 4-isopropil salicilaldehído en su estructura molecular

L. RODRÍGUEZ-PÁEZ,* O. A., PÉREZ,
R. I. BAEZA* y R. C. WONG*

Departamento de Bioquímica
Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN
Prol. de Carpio y Plan de Ayala, Col. Santo Tomás
Apartado Postal 42-186, 11340 México, D.F.

RODRÍGUEZ-PÁEZ, L.; PÉREZ, O. A.; BAEZA, R. I. y WONG, R. C., 1998. El gosipol inhibe a la LDH-C4 debido a la presencia del 4-isopropil salicilaldehído en su estructura molecular. *An. Esc. nac. Cienc. biol.*, Méx., **44**:71–80.

RESUMEN: Basándonos en consideraciones teóricas sobre el diseño de inhibidores enzimáticos, así como en la propiedad de la LDH-C4 de actuar sobre otros α-cetoácidos como el α-cetoisocaproato, se diseñaron y se sintetizaron dos derivados del gosipol, el 4-isopropil salicilaldehído y el ácido 4-isopropil salicílico como posibles inhibidores de la LDH-C4 aislada y purificada de testículo de ratón. Los estudios cinéticos mostraron que tanto el 4-isopropil salicilaldehído como el ácido 4-isopropil salicílico, compuestos con una estructura química mucho más sencilla que la del gosipol, fueron inhibidores competitivos de la LDH-C4, con K_i de 7.4 y 4.5 mM, respectivamente; es decir, son capaces de entrar al sitio activo de esta isoenzima, competir con el sustrato original y producir inhibición. Estos resultados corroboran nuestra suposición inicial, de que el gosipol debe sus propiedades de inhibir a la LDH-C4 a la presencia del isopropil salicilaldehído como parte de su estructura molecular. Además, estos compuestos presentan especificidad hacia la LDH-C4, a diferencia del gosipol que no la presenta. Estos estudios sugieren que el gosipol se ancla en el sitio activo por uno de sus extremos conteniendo el 4-isopropil salicilaldehído y por el otro extremo impide la entrada de la coenzima, lo cual explicaría por qué el gosipol compite con la coenzima (NADH) por el mismo sitio de unión en el sitio activo de la LDH-C4 de testículo de ratón.

INTRODUCCIÓN

La lactato deshidrogenasa (LDH: L-lactate-NAD oxidoreductase EC 1.1.1.27) es una enzima que participa activamente en la regulación del metabolismo celular, ya que se requiere para la regeneración del NAD citoplasmático, indispensable para la oxidación anaeróbica de los carbohidratos (Everse y Kaplan, 1973). Se presenta en cinco formas isoenzimáticas en mamíferos, cada una de ellas consta de cuatro subunidades, formadas por la combinación al azar de dos diferentes cadenas polipeptídicas, conocidas como subunidades A y B (Markert, 1962) o M y H (Cahn *et al.*, 1962). La distribución relativa

*Becario DEDICT-COFAA y EDD.

de las cinco isoenzimas es específica para cada tejido. Existe una sexta isoenzima de la LDH presente en el testículo maduro y en los espermatozoides de muchas especies con fertilización interna, a la que se le designó como LDHx (Blanco y Zinkham, 1963). Los estudios posteriores han demostrado que esta isoenzima está formada por cuatro subunidades iguales, pero diferentes de las A y B, por lo que se le designó como polipéptido C (Zinkham *et al.*, 1964), por esta razón a la LDHx se le conoce como LDH-C4. Esta isoenzima proporciona del 80 al 100% de la actividad de la LDH en los espermatozoides. La existencia de esta forma molecular única de LDH en células espermatogénicas, sugiere que debe estar adaptada para realizar funciones muy especializadas. La información disponible a la fecha indica que la participación de la LDH-C4 en el metabolismo del espermatozoide podría ser: a) proporcionar la energía requerida para el movimiento flagelar del espermatozoide, necesario para la fertilización utilizando lactato del tracto reproductor femenino como sustrato; b) la amplia especificidad de sustratos de la LDH-C4 sugiere que esta isoenzima puede proporcionar sustratos para activar otras vías metabólicas; c) la resistencia a la desnaturalización térmica puede reflejar la estabilidad necesaria para ese tipo de célula, en donde los procesos sintéticos no están disponibles; d) la dependencia de la actividad de la LDH-C4 con la temperatura facilita el metabolismo del espermatozoide a 32°C en el escroto y a 37°C en el tracto reproductor femenino; e) La asociación de la LDH-C4 con las mitocondrias de los espermatozoides ha llevado a la propuesta de que esta isoenzima puede participar en el sistema que transfiere equivalentes reductores desde el citosol a la mitocondria permitiendo obtener energía por la oxidación de piruvato en condiciones relativamente anaeróbicas, reemplazando a la NADH deshidrogenasa mitocondrial (Blanco, 1991; Burgos *et al.*, 1995; Gallina *et al.*, 1994; Goldberg, 1977).

Debido a que la LDH-C4 es una enzima muy importante para el metabolismo energético del espermatozoide, esta isoenzima constituye un blanco ideal para desarrollar métodos seguros, efectivos y reversibles para regular la fertilidad en el macho (Goldberg, 1985; Gupta and Malhotra, 1994;.Gupta and Syal, 1997; Waites, G. M. H. 1993). Los avances más importantes en esta área se han obtenido con el desarrollo de una vacuna antifertilidad utilizando a la LDH-C4 como inmunógeno (Adoyo *et al.*, 1995; Dieckman and Herr, 1997; Gupta *et al.*, 1994; Herr, 1996).

El gosipol, que inicialmente fue extraído del aceite de algodón, es una molécula compleja que inhibe a la LDH-C4 (Den Boer and Grootegoed, 1988; Kim *et al.*, 1985; Lee *et al.*, 1981; Lin *et al.*, 1987; Tso and Lee, 1982; Whaley *et al.*, 1986; Wung-Wai and Chi-Sing, 1982) y como consecuencia, produce disminución de la glicólisis y de la movilidad de los espermatozoides, tanto en animales de laboratorio como en humanos (Porat, 1990; Stephens *et al.*, 1983; Vyas and Kolla, 1990), por lo que esta sustancia ha sido estudiada en relación con el control de la fertilidad (Lee y col., 1981, 1986; Morris y col., 1986; Turrens, 1986; Virji and Naz, 1995) y ha probado ser muy buen agente antifertilidad en hombres, sin embargo, debido a que es un compuesto muy tóxico y a que provoca daños irreversibles, su uso se ha restringido (Burgos *et al.*, 1986; Comhaire, 1994; Heywood, 1988; Lohiya *et al.*, 1990; Porat, 1990; 1986; Waites, 1993).

Por estudios previos realizados en nuestro laboratorio (Wong *et al.*, 1997) y en otros (Baker, 1967; Blanco, 1991), sobre la especificidad del sitio activo de la LDH-C4, suponemos que sólo parte de la molécula de gosipol podría ser la responsable de la inhibición de esta isoenzima, esta parte de la estructura sería el 4-isopropil salicilaldehído situado en ambos extremos de la molécula de gosipol (Fig. 1), por lo que en este trabajo

se sintetizó este compuesto y su posible producto metabólico, el ácido 4-isopropil salicílico, y se realizaron estudios cinéticos sobre la LDH-C4 de testículos de ratones para determinar si estos compuestos son capaces de inhibirla.

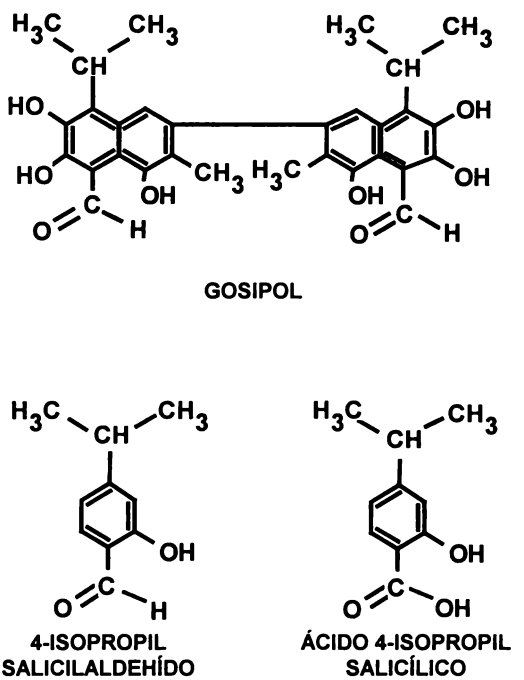

FIG. 1. Relación estructural entre el gosipol, el 4-isopropil salicilaldehído y el ácido 4-isopropilsalicílico.

MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIALES

Se utilizaron ratones macho de la cepa NIH provenientes del Departamento de Asistencia Técnica de la ENCB-IPN, piruvato de sodio, NADH e isopropil fenol fueron obtenidos de *Sigma Chemical Co.* Cloroformo, éter etílico, fosfato monobásico de sodio, fosfato dibásico de sodio y sulfato de amonio fueron obtenidos de *Baker*. Todos los demás reactivos utilizados fueron químicamente puros.

MÉTODOS

Determinación de la actividad de la lactato deshidrogenasa. La actividad de la LDH se determinó por la medición del cambio de absorbancia a 340 nm producido por la oxidación del NADH. La mezcla de reacción contenía en 3 ml, 0.115 mM de NADH,

mM de regulador de fosfatos, pH 7.4, 0.18 - 25 × 10^{-4} M de piruvato de sodio y la preparación enzimática diluida con regulador de fosfatos pH 7.4, de tal manera que proporcionara un cambio de absorbancia de 0.03 a 0.08 por minuto. La reacción enzimática se determinó por cinco minutos, y para la cuantificación de la actividad de la LDH se tomó el promedio del cambio de absorbancia por minuto.

Una unidad de LDH es la cantidad de enzima capaz de producir un cambio de absorbancia de 0.001 en un minuto a 340 nm, en tres mililitros de mezcla de reacción.

La determinación del tipo de inhibición se hizo midiendo la actividad de la LDH a diferentes concentraciones de sustrato con y sin el inhibidor y graficando de acuerdo con la ecuación de Lineweaver-Burk (Dixon and Webb, 1979).

Purificación de la LDH-C4. La purificación de la LDH-C4 de testículos de ratón se hizo de acuerdo al método descrito por Wong *et al.*, 1971.

Síntesis del 4-isopropil salicilaldehído. La síntesis de este compuesto se desarrolló con base en la reacción de Reimer-Tiemann (Vogel, 1978). Se hizo reaccionar el 3-isopropil fenol con cloroformo en solución de hidróxido de sodio para obtener el 4-isopropil salicilaldehído. El producto oleoso que se obtuvo fue ligeramente amarillento y estable al aire, el cual destiló a 91-92°C a 4 mm Hg. El compuesto fue caracterizado espectroscópicamente, siendo los espectros compatibles con la estructura del 4-isopropil salicilaldehído.

Síntesis del ácido 4-isopropil salicílico. La síntesis se llevó a cabo de acuerdo con la reacción de Cannizaro (Vogel, 1978), a partir del 4-isopropil salicilaldehído. El producto se obtuvo en forma de cristales incoloros, con un punto de fusión de 116°C, el cual fue caracterizado espectroscópicamente y los espectros fueron compatibles con la estructura del ácido 4-isopropil salicílico.

RESULTADOS

En la figura 2 se muestra el efecto de los dos compuestos sobre la actividad de la LDH-C4 aislada de testículos de ratón. Se muestra que el 4-isopropil salicilaldehído es capaz de inhibir a la LDH-C4 y a una concentración de 30 mM, la enzima se inhibió en un 75%. El ácido 4-isopropil salicílico también inhibió a la LDH-C4 y a una concentración de 30 mM, inhibó a la LDH-C4 en un 90%.

A continuación se procedió a caracterizar la inhibición que produjeron estos dos compuestos sobre la LDH-C4. En la figura 3 se muestra la determinación del tipo de inhibición que produce el 4-isopropil salicilaldehído de acuerdo al método de Lineweaver-Burk. Como puede observarse, esta sustancia produce una inhibición competitiva y la K_i de esta inhibición fue de 7.4 mM. En la figura 4 se muestra la determinación del tipo de inhibición que produce el ácido 4-isopropil salicílico. El tipo de inhibición producido por este compuesto es competitivo, con una K_i de 4.5 mM, como era de esperarse, ya que este compuesto fue capaz de inhibir a la LDH-C4 en mayor proporción que el 4-isopropil salicilaldehído.

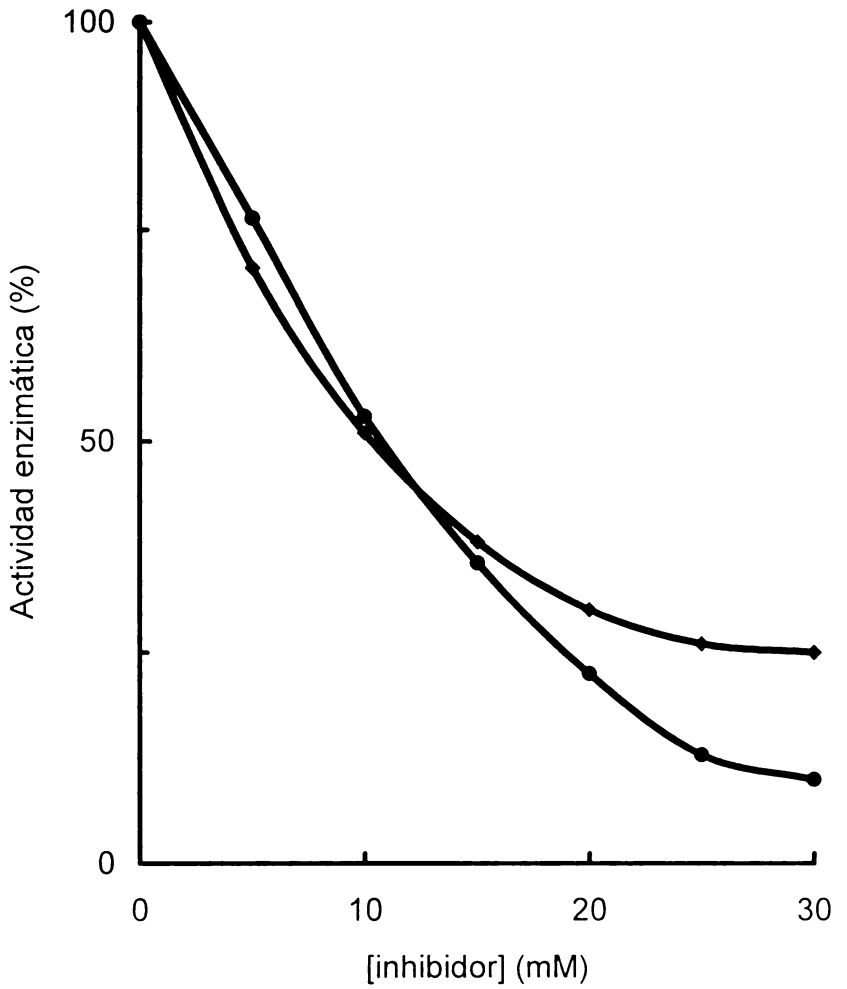

FIG. 2. Efecto del 4-isopropil salicilaldehído (◆) y del ácido 4-isopropil salicílico (●), sobre la actividad de la LDH-C4 de testículo de ratón. La actividad de la LDH-C4 se midió como se describe en materiales y métodos. Las velocidades de reacción se calcularon tomando la actividad máxima, sin inhibidor, como 100%.

DISCUSIÓN

Los estudios efectuados sobre agentes anticonceptivos no hormonales para hombres, han demostrado que el gosipol reduce la fertilidad en el hombre porque la LDH-C4 es particularmente sensible a la inhibición por este compuesto (Goldberg, 1985; Gupta *et al.*, 1994; Lin *et al.*, 1987).

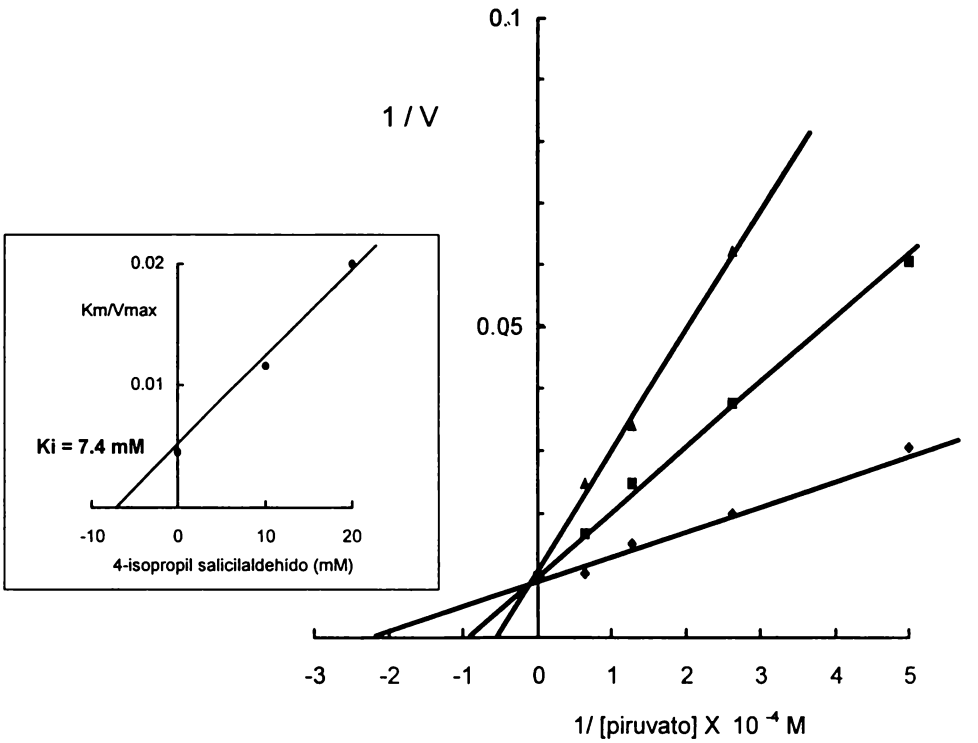

FIG. 3. Determinación del tipo de inhibición que produce el 4-isopropil salicilaldehído sobre la LDH-C4 de ratón por el método de Lineweaver-Burk. Los valores recíprocos de V se calcularon tomando la actividad máxima, sin inhibidor, como 100%. ◆, testigo; ■, adicionando 10 mM; ▲, 20 mM del inhibidor. En el inserto se muestra la determinación de la K_i.

Con base en estudios previos sobre la especificidad del sitio activo de la LDH-C4, supusimos que sólo una parte de la molécula del gosipol podría ser la responsable de la inhibición de la LDH-C4, esta parte de la estructura sería el 4-isopropil salicilaldehído, situado en ambos extremos de la molécula de gosipol (Fig. 1).

Una particularidad de la LDH-C4 es la de poder utilizar como sustratos otros α-cetoácidos o α-hidroxiácidos de cadenas hidrocarbonadas más largas que las del ácido pirúvico y el ácido láctico (Blanco *et al.*, 1976; Blanco, 1991; Wong *et al.*, 1971). Así, se sabe que la eficiencia catalítica de la LDH-C4 es prácticamente la misma para el piruvato que para α-cetoácidos de cadena hidrocarbonada lineal, de cuatro a seis átomos de carbono, y también para α-cetoácidos con cadena ramificada como el α-cetoisocaproato, α-cetoisovalerato y α-ceto-β-metilvalerato. Por estudios realizados en nuestro laboratorio (Wong *et al.*, 1997), encontramos que el ácido N-isopropil oxámico es un inhibidor selectivo de la LDH-C4, este compuesto tiene una porción que es el ácido oxámico, un conocido inhibidor competitivo de las isoenzimas de la LDH (Baker, 1967), que dirige al ácido N-isopropil oxámico al sitio activo de la LDH, y la cadena hidrocarbonada, el

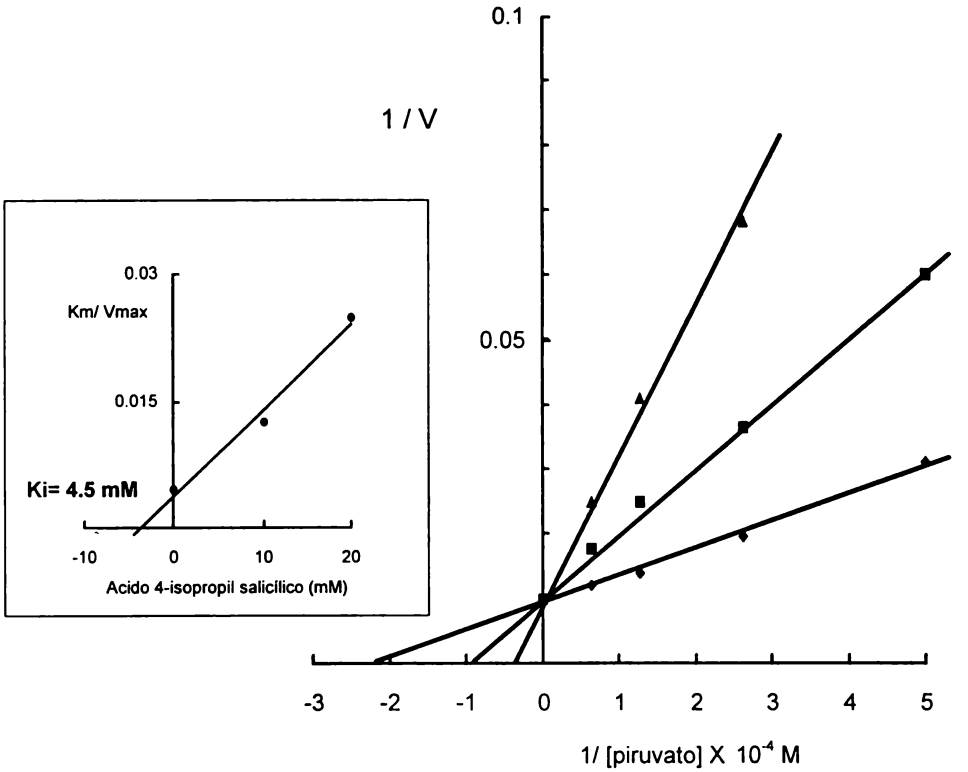

FIG. 4. Determinación del tipo de inhibición que produce el ácido 4-isopropil salicílico sobre la LDH-C4 de ratón por el método de Lineweaver-Burk. Los valores recíprocos de V se calcularon tomando la actividad máxima, sin inhibidor, como 100%. ◆, testigo; ■, adicionando 10 mM; ▲, 20 mM del inhibidor. En el inserto se muestra la determinación de la K_i.

grupo isopropilo, que le da selectividad por la LDH-C4, ya que sólo esta isoenzima acepta α-cetoácidos de este tipo en su sitio activo.

El 4-isopropil salicilaldehído, que forma parte de la molécula de gosipol, es otro compuesto que llena los requisitos para inhibir selectivamente a la LDH-C4. Para suponer esto, nos basamos en que previamente Baker (1967) encontró que el ácido salicílico es un inhibidor competitivo de las isoenzimas de la LDH, así que el salicilaldehído podría comportarse como un análogo estructural del ácido salicílico con afinidad por el sitio activo de estas isoenzimas y el grupo isopropilo del 4-isopropil salicilaldehído, le daría afinidad y selectividad por el sitio activo de la LDH-C4.

Los resultados mostraron que el 4-isopropil salicilaldehído es realmente un inhibidor competitivo de la LDH-C4 con una K_i de 7.4 mM, es decir, este compuesto entra al sitio activo de la LDH-C4 impidiendo la entrada del sustrato natural. En apoyo a estos resultados, tenemos el hecho de que el ácido α-ceto-5-metil caproico es también un buen sustrato de la LDH-C4 (Blanco *et al.*, 1991) y la comparación de las estructuras del 4-isopropil salicilaldehído con el ácido α-ceto-5-metil caproico, con modelos a escala,

indica que el grupo isopropilo en ambas moléculas se encuentra a la misma distancia del carboxilato. Este parecido estructural explicaría por qué el 4-isopropil salicilaldehído presenta afinidad por el sitio activo de la LDH-C4 al igual que el sustrato, el ácido α-ceto-5-metil caproico.

También se estudió el ácido 4-isopropil salicílico, análogo estructural y posible producto metabólico del 4-isopropil salicilaldehído, como otro candidato para inhibir a la LDH-C4, ya que presenta, prácticamente, las mismas características estructurales que el 4-isopropil salicilaldehído. Los resultados mostraron que este compuesto, también fue un inhibidor competitivo de la LDH-C4, con una K_i de 4.5 mM, valor ligeramente menor que el del 4-isopropil salicilaldehído.

Ya que el 4-isopropil salicilaldehído y el ácido 4-isopropil salicílico demostraron ser inhibidores competitivos de la LDH-C4, esto implica que el sitio de unión de estos inhibidores es el sitio activo. Estos experimentos, de hecho, demuestran que existe especificidad de estos inhibidores hacia la LDH-C4 en comparación con otras deshidrogenasas dependientes de NADH, ya que el gosipol al anclarse en el sitio activo por uno de los extremos conteniendo el 4-isopropil salicilaldehído, impide también la entrada de la coenzima debido al gran tamaño de la molécula del gosipol (Ikeda, 1990). Esto explicaría por qué, en la LDH-C4, el gosipol compite también con la coenzima (NADH) por el mismo sitio de unión. Lo anterior concuerda perfectamente con lo informado en la literatura en relación a que el sitio de unión del gosipol a la LDH-C4 incluye tanto el sitio de unión del sustrato como el sitio de unión de la coenzima (Tso and Lee, 1982; Lee, 1982). Sin embargo, no se descarta la posibilidad de que el gosipol también presente afinidad por el sitio de unión de la coenzima (NADH), ya que este sitio está muy conservado entre enzimas dependientes de nucleótidos de piridina (Lima *et al.*, 1994), lo cual explicaría por qué el gosipol inhibe también a otras enzimas dependientes de NADH (Ikeda, 1990). Estos hechos darían congruencia a la poca selectividad del gosipol, de la cual podrían derivar los efectos tóxicos de esta sustancia.

Conclusiones

De acuerdo a todo lo anterior, tenemos dos nuevos inhibidores de la LDH-C4 derivados del gosipol, el 4-isopropil salicilaldehído y el ácido 4-isopropil salicílico, con lo que corroboramos nuestra suposición inicial, de que el gosipol, debe sus propiedades de inhibir a la LDH-C4, a la presencia del isopropil salicilaldehído como parte de su estructura. Faltaría por determinar si estos compuestos, con una estructura química mucho más sencilla que el gosipol, también son capaces de producir infertilidad como el gosipol, estudios que ya hemos iniciado en ratones, como modelo animal.

Summary

Based on theoretical considerations in the design of enzymatic inhibitors, as well as in the LDH-C4 properties to act on other α-ketoacids like α-ketoisocaproate, we designed and synthesized two gossypol derivatives, the 4-isopropyl salicylaldehyde and the 4-isopropyl salicylic acid as possible inhibitors of LDH-C4 isolated and purified from mouse testes. The kinetic studies showed that both products, the 4-isopropyl

salicylaldehyde and the 4-isopropyl salicylic acid, substances with a simpler chemical structure than gossypol, were both competitive inhibitors of LDH-C4, with a K_i of 7.4 and 4.5 mM, respectively, so, they were able to reach the active site of this isozyme, to compete with the original substrate and producing inhibition. These results confirm our initial supposition, that gossypol inhibits LDH-C4 due to the presence of the isopropyl salicylaldehyde as a part of its chemical structure. In addition, these compounds showed specificity for LDH-C4, property not present in gossypol. These studies suggest that the gossypol molecule interact with the active site of mouse LDH-C4, by one of its ends containing the 4-isopropyl salicylaldehyde and the other end of gossypol prevents the attachment of the coenzyme, this explains why gossypol competes with the coenzyme (NADH) for the same union site in mouse testes LDH-C4 active site.

BIBLIOGRAFÍA

ADOYO, P. A., A. MOORE and H. D. MOORE, 1995. A strategy for identifying candidate sperm antigens for immunocontraception: isolation of human testis cDNA clones using polyclonal antisera directed against acrosomal membrane preparation. *Int. J. Androl.*, **18**:32-38.

BAKER, B. R., 1967. Design of active-site-directed irreversible enzyme inhibitors. John Wiley and Sons Inc. USA.

BLANCO, A., 1991. Functional significance of the testes and sperm-specific lactate dehydrogenase isozyme (LDH-C4). Acad. Nal. Cienc., *Córdoba Misc.*, **84**:3-31.

BLANCO, A. and W. H. ZINKHAM, 1963. Lactate dehydrogenases in human testes. *Science*, **139**:601-602.

BLANCO, A., C. BURGOS, N. M. GEREZ DE BURGOS and E. F. MONTAMAT, 1976. Properties of the testicular lactate dehydrogenase isozyme. *Biochem. J.*, **153**:165-172.

BURGOS, C., C. MALDONADO, N. M. GEREZ DE BURGOS, A. AOKI and A. BLANCO, 1995. Intracellular localization of the testicular and sperm-specific lactate dehydrogenase isozyme C_4 in mice. *Biol. Reprod.*, **53**:84-92.

COMHAIRE, F. H., 1994. Male contraception: hormonal, mechanical and other. *Hum. Reprod.*, **9**:22-27.

DEN BOER, P. J. and J. A. GROOTEGOED, 1988. Differential effects of (+)-and (-)-gossypol enantiomers on LDH-C4 activity of hamster spermatogenic epithelium *in vitro*. *J. Reprod. Fert.*, **83**:701-709.

DIEKMAN, A. B. and J. C. HERR, 1997. Sperm antigens and their use in the development of an immunocontraceptive. *Am. J. Reprod. Immunol.*, **37**:111-117.

DIXON, M. and C. E. WEBB, 1979. Enzyme inhibition and activation. In: *Enzymes*. 3rd ed. Longman Group Ltd. pp 332-374.

EVERSE, J. and N. O. KAPLAN, 1963. Lactate dehydrogenase. Structure and function. In: *Adv. Enzymol.* J. Wiley & Sons., **37**: pp 61-133.

GALLINA, F. G., N. M. GEREZ DE BURGOS, C. BURGOS, C. E. CORONEL and A. BLANCO, 1994. The lactate/pyruvate shuttle in spermatozoa: Operation *in vitro*. *Arch. Biochem. Biophys.*, **308**:515-519.

GOLDBERG, E., 1977. Isozymes in testes and spermatozoa. *Curr. Top. Biol. Med. Res.*, **1**:79-124.

_____, 1985. Reproductive implications of LDH-C4 and other testis-specific isozymes. *Exp. Clin. Immunogenet.*, **2**:120-124.

GUPTA, G. S. and N. SYAL, 1997. Immune response of chemically modified homologous LDH-C4 and their effect on fertility regulation in mice. *Am. J. Reprod. Immunol.*, **37**:206-211.

GUPTA, G. S. and R. MALHOTRA, 1994. Autoimmune-like activity of sperm specific LDH: a pathophysiological and electron microscopic study of atrophied testis and epididymis. *Indian. J. Biochem. Biophys.*, **3**:480-485.

GUPTA, G. S., R. MALHOTRA and S. SEHGAL, 1994. Regulation of fertility in female mice after immunization with human sperm specific LDH: role in conception and contraception. Indian. J. Exp. Biol., 32:14-19.

HERR, J. C., 1996. Update on the Center for Recombination Gamete Contraceptive Vaccinogens. *Am. J. Reprod. Immunol.*, **35**:184-189.

HEYWOOD, R., 1988. The toxicology of gossypol acetic acid and (-)-gossypol. *Contraception*, **37**:185-190.

IKEDA, M., 1990. Inhibition kinetics of NAD-linked enzymes by gossypol acetil acid. *Andrologia*, **22**:409-416.

KIM, I. C., D. P. WALLER and H. H. FONG, 1985. Inhibition of LDH-X by gossypol optical isomers. *J. Androl.*, **6**:344-347.

LEE, G. Y., S. Y. MOON, H. J. YUAN and A. F. CHEN, 1982. Enzyme inactivation and inhibition by gossypol. *Mol. Cell. Biochem.*, **47**:65-70.

LIMA, D. C., C. J. WANG and A. MONDRAGÓN, 1994. Three-dimensional structure of the 67 K N-terminal fragment of *E. coli* DNA topoisomerase I. *Nature.*, **367**:138-146.

LIN, Y. C., M. CHITCHAROENTHUM and Y. RIKIHISA, 1987. Effect of gossypol on spermatozoal lactate dehydrogenase-X (LDH-X) in male rats. *Contraception*, **36**:581-592.

LOHIYA, N. K., K. SHARMA, M. KUMAR and S. SHARMA, 1990. Limitations in developing gossypol acetic acid as a male contraceptive. *Contraception*, **41**:519-532.

MARKERT, C. L., 1962. En Procceding of the 13th Annual Conference on the Kidney, J. Metcoff, Ed., Northwestern University Press, Evanston, pp 54-63.

MORRIS, I. D., C. HIGGINS and S. A. MATLIN, 1986. Inhibition of testicular LDH-X from laboratory animals and man by gossypol and its isomers. *J. Reprod. Fert.*, **77**:607-612.

PORAT, O., 1990. Effects of gossypol on the motility of mammalian sperm. *Mol. Reprod. Dev.*, **25**:400-408.

TSO, W. W. and CH. S. LEE, 1982. Lactate dehydrogenase-X: an isozyme particularly sensitive to gossypol inhibition. *Int. J. Androl.*, **5**:205-209.

VOGEL, A., 1978. Texbook of practical organic chemistry. 4th ed. Longman Group Limited. London, New York. pp 761, 791.

VYAS, R. K. and N. R. KALLA, 1990. Effects of optical isomers of gossypol on mammalian spermatozoa: an *in vitro* study. *Acta Eur. Fertil.*, **21**:95-98.

WHALEY, K. J., D. T. STEPHENS, N. M. KLIMKOW and D. D. HOSKINS, 1986. Monkey lactate dehydrogenase-C4 as model for the interaction of enzymes with gossypol. *Contraception*, **33**:605-616.

WONG, R. C., L. RODRÍGUEZ-PÁEZ, B. NOGUEDA, A. PÉREZ and I. BAEZA, 1997. Selective inhibition of the sperm-specific lactate dehydrogenase isozyme-C4 by N-isopropyl oxamate. *Biochim. Biophys. Acta*, **1343**:16-22.

WONG, R. C., R. YÁÑEZ, D. M. BROWN, A. DICKEY, M. E. PARKS and R. W. MCKEE, 1971. Isolation and properties of lactate dehydrogenase isoenzyme X from Swiss mice. *Arch. Biochem. Biophys.*, **146**:454-460.

ZINKHAM, W. H., A. BLANCO and L. KUPCHYK, 1964. Lactate dehydrogenase in pigeon testes: genetic control by three loci. *Science*, **144**:1353-1354.

Recibido: marzo de 1998. Aceptado: abril de 1998.