

Tesis Doctoral

# Mecanismos moleculares involucrados en la regulación de la oxidación de ácidos grasos en células de Sertoli

Regueira, Mariana

2015-11-30

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Regueira, Mariana. (2015-11-30). Mecanismos moleculares involucrados en la regulación de la oxidación de ácidos grasos en células de Sertoli. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Regueira, Mariana. "Mecanismos moleculares involucrados en la regulación de la oxidación de ácidos grasos en células de Sertoli". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2015-11-30.

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires



**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES**  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**“Mecanismos moleculares involucrados en la  
regulación de la oxidación de ácidos grasos en  
células de Sertoli”**

**Tesis presentada para optar por el título de Doctor de la Universidad de  
Buenos Aires en el área de Ciencias Biológicas**

**Lic. Mariana Regueira**

**Director: Dra. Silvina Beatriz Meroni**

**Director asistente: Dra. María Fernanda Riera**

**Consejero de estudio: Dr. Omar Adrián Coso**

**Lugar de Trabajo: Centro de Investigaciones Endocrinológicas “Dr. César Bergadá” CONICET-FEI-División de Endocrinología Hospital de Niños Dr. Ricardo Gutiérrez**

**Ciudad Autónoma de Buenos Aires, 2015**

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero agradecer especialmente a Silvina por haberme dado la posibilidad de cumplir uno de mis objetivos, doctorarme. Agradecerle también por todo el apoyo y seguimiento de todos estos años. Fue una gran experiencia. GRACIAS!!!

Selva! No existen palabras que expresen lo muy agradecida que estoy. Gracias por el seguimiento, la comprensión, la dedicación. Lo das todo! Gracias por haberme abierto las puertas de tu laboratorio. Y recordá que, *“No hay día que pase en el laboratorio que no te extrañemos”*.

Fer, una amiga!!! Trabajar codo a codo con una amiga es lo mejor que me pudo haber pasado.

Eli, mi madre postiza! GRACIAS por el trabajo en equipo, por la predisposición, por el acompañamiento y sobre todo por las hermosas charlas compartidas.

Gracias a Noe, Merce y Dorita, compañeras de mañanas alegres! Gracias por la risa!

Nachi, el CEDIE nos presentó, la VIDA nos hizo amigas! Gracias por todos los días, tardes, noches, por las charlas en persona, al teléfono, por chat, por red social y de todas las maneras que dos amigas se pueden comunicar. GRACIAS POR ESTAR!!!

Mis papás José y Graciela, más que gracias es un MILES DE GRACIAS!!!! Gracias por el apoyo incondicional en cada momento de mi vida.

Mis hermanos Ignacio y Sebastián. Nacho, a pesar de la distancia nunca estas lejos! Gracias por compartir cada momento. Sebi, sos un ejemplo de lucha, de no bajar los brazos, de seguir siempre para adelante. Sos mi ejemplo!

Gracias a mis amigas/hermanas del alma, Marce y Jime!!! SIEMPRE CERCA, SIEMPRE PRESENTES!!!

Fede, mi universo todo! Gracias Amor por compartir cada día de mi vida, por ser mi amigo, mi compañero, mi confidente, mi futuro esposo. Gracias por amarme tanto!

A mi familia extendida, los Martucci. Rodeado de la familia uno nunca se siente solo, gracias por rodearme!

A mis compañeros de la Austral, Ana, Silvi, Cris, Aye, Horacio y Guillermo. Gracias por los miércoles de alegría!

A mis papás, José y Graciela  
CON TODO EL AMOR

Parte de los resultados incluidos en este trabajo de tesis doctoral han dado origen a presentaciones a congresos nacionales e internacionales y a las siguientes publicaciones:

1. Regueira M, Riera MF, Galardo MN, Pellizzari EH, Cigorraga SB, Meroni SB. Activation of PPAR  $\alpha$  and PPAR  $\beta/\delta$  regulates Sertoli cell metabolism. *Molecular and Cellular Endocrinology* 382(1):271-281.
2. Regueira M, Riera MF, Galardo MN, Pellizzari EH, Cigorraga SB, Meroni SB. FSH and bFGF regulate the expression of genes involved in Sertoli cell energetic metabolism. *General and Comparative Endocrinology* en prensa.

## **Mecanismos moleculares involucrados en la regulación de la oxidación de ácidos grasos en células de Sertoli**

La célula de Sertoli (CS), componente somático del tubo seminífero, provee el soporte estructural y nutricional para el desarrollo de las células germinales. La CS metaboliza glucosa a lactato, principal sustrato energético para las células germinales, por lo que se ha postulado que utiliza ácidos grasos (AG) como fuente energética propia. Los factores de transcripción de la familia de los PPARs son receptores activados por ligando que participan en la regulación del metabolismo de AG en diversos tejidos. El objetivo general del presente trabajo de tesis fue estudiar los mecanismos moleculares que intervienen en la regulación del metabolismo energético en el túbulo seminífero. Para ello se utilizó como modelo experimental el cultivo de CS de rata de 20 días de edad. Se observó que la activación farmacológica de PPAR  $\alpha$  y PPAR  $\beta/\delta$  produce un aumento en la oxidación de AG y en la expresión de genes vinculados con su transporte y metabolismo (FAT/CD36, CPT1, LCAD y MCAD). Además, se observó que sólo la activación de PPAR  $\beta/\delta$  regula de manera simultánea la oxidación de AG y la producción de lactato. Asimismo, se evaluaron posibles mecanismos fisiológicos que podrían conducir a la activación de los PPARs en el túbulo seminífero. Se observó que las células germinales apoptóticas (CGA) y el ácido palmítico, AG que podría provenir de la hidrólisis de las gotas de lípidos –generadas por la fagocitosis de CGA– o del exterior de la célula, regulan la expresión de genes vinculados con el transporte y metabolismo de AG y por otra parte, que en dicha regulación participa la activación del PPAR  $\beta/\delta$ . Por último, se evaluó la posible regulación hormonal de la oxidación de AG en CS y la participación del PPAR  $\beta/\delta$  en dicha regulación. Se demostró que existe una modulación diferencial del metabolismo de AG por FSH y bFGF en CS. Se observó que FSH –hormona anabólica de la CS– disminuye la oxidación de AG y aumenta la expresión génica sin participación de PPAR  $\beta/\delta$ , mientras que bFGF regula positivamente el catabolismo de AG y la producción de lactato de manera PPAR  $\beta/\delta$  dependiente. En su

conjunto, estos resultados revelan la existencia de una compleja regulación de los mecanismos moleculares que participan en la oxidación de ácidos grasos y la producción de lactato en CS que refleja el ajuste fino del metabolismo energético en el túbulo seminífero necesario para una adecuada espermatogénesis.

**Palabras clave:** Célula de Sertoli, PPARs, Metabolismo de ácidos grasos, Lactato, FSH, bFGF.

# **Molecular mechanisms involved in the regulation of fatty acid oxidation in Sertoli cells**

The purpose of this study was to evaluate the molecular mechanisms involved in the regulation of the energetic metabolism in the seminiferous tubule. To achieve this purpose Sertoli cell (SC) cultures obtained from 20-day-old rats were used. We observed that the pharmacological activation of PPAR  $\alpha$  and PPAR  $\beta/\delta$  increases fatty acid (FA) oxidation and the expression of genes involved in FA transport and metabolism. However, only activation of PPAR  $\beta/\delta$  increases SC lactate production as a result of an increase in pyruvate availability. Next, we evaluated possible physiological mechanisms implicated in PPARs activation in the seminiferous tubule. SC were cocultured with apoptotic germ cells or treated with palmitic acid. We observed that both treatments increase the expression of genes that are involved in FA transport and metabolism with the participation of PPAR  $\beta/\delta$  activation. Finally, we evaluated the possible hormonal regulation of FA metabolism in SC. We observed that FSH –the SC trophic hormone– decreases FA oxidation and increases gene expression and lactate production in a PPAR  $\beta/\delta$  independent manner. On the other hand, we observed that bFGF –a growth factor secreted by germ cells– increases FA oxidation, CPT1 expression and lactate production in a PPAR  $\beta/\delta$  dependent manner. Altogether, these results suggest that in SC a fine-tuning of FA metabolism and lactate production occurs in order to ensure the energetic requirements of SC and germ cells simultaneously.

**Key words:** Sertoli cell, PPARs, Fatty Acid Metabolism, Lactate, FSH, bFGF.



## ABREVIATURAS

2-DOG	2-desoxi-D-glucosa
ABP	proteína ligadora de andrógenos
Ác	ácido
ACBP	proteína de unión de acil-CoA
ADN	ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN copia
AG	ácidos grasos
AMH	hormona anti mülleriana
AMPc	3',5' adenosina monofosfato cíclico
ARN	ácido ribonucleico
ARNm	ácido ribonucleico mensajero
ATGL	lipasa de triglicéridos de adipocitos
ATP	5'adenosina trifosfato
bFGF	factor de crecimiento fibroblástico básico
BSA	albúmina de suero bovino
CGA	células germinales apoptóticas
CoA	coenzima A
cPGI <sub>2</sub>	carbaprostaciclina
CPT	carnitina palmitoil transferasa
DCA	dicloroacetato
dCTP	desoxicitidina trifosfato
dNTPs	desoxiribonucleótidos trifosfato
EDTA	ácido etilen diamino tetra acético
EGF	factor de crecimiento epidérmico
EGTA	ácido etilen glicol tetra acético
FABP	proteína de unión de ácidos grasos
FABPc	proteína de unión de ácidos grasos citoplasmática
FABPpm	proteína de unión a ácidos grasos de la membrana plasmática
FAD	Flavin adenin dinucleótido oxidada
FADH <sub>2</sub>	Flavin adenin dinucleótido reducida
FAK	quinasa de adhesión focal
FATP	proteínas de transporte de ácidos grasos
FAT/CD36	translocasa de ácidos grasos CD36
FFK	6-fosfofructo-quinasa
FGFR	receptor de bFGF
FSH	hormona folículo estimulante
FSHR	receptor de FSH
GHRH	hormona liberadora de la hormona de crecimiento
GLUT	transportador de glucosa
GSK	GSK3787
γ-GTP	Gamma glutamil transpeptidasa
GW	GW0742
HBSS	solución salina balanceada de Hanks
HDAC	histona deacetilasa
Hepes	ácido sulfónico del N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etano
HIF	factor de transcripción inducible por hipoxia
HPRT1	Hipoxantina fosforibosil-transferasa 1
HRE	elemento de respuesta a hipoxia
IGF	factor de crecimiento similar insulina
IL	interleuquina
kb	kilobases
KO	<i>knock-out</i>
LBD	dominio de unión a ligando
LCAD	deshidrogenasa de ácidos grasos de cadena larga
LDH	lactato deshidrogenasa
LDL	lipoproteína de baja densidad
LH	hormona luteinizante
MCAD	deshidrogenasa de ácidos grasos de cadena media

MCT	transportador de monocarboxilatos
MOPS	(3-N-Morfolino) ácido propanesulfónico
MTS	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio
NAD <sup>+</sup>	nicotinamida adenina dinucleótido oxidada
NADH	nicotinamida adenina dinucleótido reducida
N-CoR	co-represor de receptores nucleares
NGF	factor de crecimiento neural
PACAP	péptido activador de la adenilato ciclasa hipofisaria
PBS	solución reguladora salina de fosfato
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PDC	complejo piruvato deshidrogenasa
PDGF	factor de crecimiento derivado de plaquetas
PKD	piruvato deshidrogenasa quinasa
PDP	piruvato deshidrogenasa fosfatasa
PGC1	coactivador 1 del PPAR $\gamma$
PGI <sub>2</sub>	prostaciclina
PGJ <sub>2</sub>	prostaglandina J 2
PI3K	fosfatidilinositol 3 quinasa
PMS	metosulfato de fenazina
PPAR	receptores activados por proliferadores de peroxisomas
PPRE	elemento de respuesta a PPAR
PVDF	difluoruro de polivinilideno
RIP140	proteína de interacción con el receptor 140
RT-PCR	reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa
RT-qPCR	reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
RXR	receptor de ácido retinoico
SCAD	deshidrogenasa de ácidos grasos de cadena corta
SDS	dodecilsulfato sódico
SMRT	silenciador del receptor de ácido retinoico y hormona tiroidea
SPARC	proteína secretada ácida rica en cisteínas
SRC	co-activador de la familia del receptor de esteroides
TBS	solución reguladora Tris salina
TBS-T	TBS con Tween
TGF	factor de crecimiento transformante
TNF	factor de necrosis tumoral
VLCAD	deshidrogenasa de ácidos grasos de cadena muy larga
WY	WY14643

## UNIDADES

cm <sup>2</sup>	centímetros cuadrados
°C	grados centígrados
Ci	Curie
dpm	desintegraciones por minuto
g	gramos
h	horas
l	litro
M	molar
mg	miligramos
ml	mililitros
mM	milimolar
mmol	milimol
mUI	miliunidades internacionales
μCi	microCurie
μg	microgramos
μl	microlitros
ng	nanogramos
nm	nanometros
nM	nanomolar
pmol	picomoles
P/V	peso en volumen
UI	unidades internacionales
V	voltios
V/V	volumen en volumen
xg	veces de aceleración de la gravedad

<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>CITOLOGÍA DEL TESTÍCULO.....</b>	<b>1</b>
<b>CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES DE LA CÉLULA DE SERTOLI.....</b>	<b>3</b>
<b>CARACTERÍSTICAS FUNCIONALES DE LA CÉLULA DE SERTOLI.....</b>	<b>4</b>
<b>1) Soporte estructural.....</b>	<b>5</b>
<b>2) Barrera hemato-testicular.....</b>	<b>5</b>
<b>3) Posicionamiento de las células germinales.....</b>	<b>6</b>
<b>4) Actividad fagocítica.....</b>	<b>8</b>
<b>5) Función secretoria.....</b>	<b>9</b>
<b>6) Suministro de lactato a las células germinales.....</b>	<b>11</b>
<i>6.a) Entrada de glucosa a la célula mediada por transportadores de glucosa.....</i>	<i>13</i>
<i>6.b) Actividad de la enzima lactato deshidrogenasa.....</i>	<i>14</i>
<i>6.c) Regulación del complejo piruvato deshidrogenasa.....</i>	<i>15</i>
<i>6.d) Expresión de los transportadores de monocarboxilatos.....</i>	<i>15</i>
<b>REGULACIÓN HORMONAL Y PARACRINA DE LA CÉLULA DE SERTOLI.....</b>	<b>16</b>
<b>1) Regulación por FSH y andrógenos.....</b>	<b>17</b>
<b>2) Regulación paracrina/autocrina.....</b>	<b>21</b>
<b>METABOLISMO ENERGÉTICO DE LA CÉLULA DE SERTOLI.....</b>	<b>23</b>
<b>OXIDACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS.....</b>	<b>24</b>
<b>1) Transporte de ácidos grasos a través de la membrana plasmática.....</b>	<b>25</b>
<b>2) Activación de ácidos grasos.....</b>	<b>26</b>
<b>3) Oxidación de ácidos grasos en la mitocondria.....</b>	<b>26</b>
<b>REGULACIÓN DE LA OXIDACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS POR RECEPTORES ACTIVADOS POR PROLIFERADORES DE PEROXISOMAS.....</b>	<b>30</b>
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>37</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>38</b>

<b>MATERIALES</b> .....	38
<b>MÉTODOS</b> .....	38
1) Aislamiento y cultivo de células de Sertoli.....	38
2) Aislamiento de células germinales y preparación de células germinales apoptóticas.....	40
3) Cocultivos de células de Sertoli con células germinales apoptóticas .....	42
4) Extracción de ARN total y síntesis de ADN copia .....	43
5) Determinación de los niveles de ARNm por PCR cuantitativa (RT-qPCR).....	43
6) Determinación de los niveles de ARNm por Northern Blot .....	46
7) Determinación de los niveles de PDC fosforilado.....	47
8) Ensayo de oxidación de ácidos grasos.....	49
9) Ensayo de incorporación de 2-deoxi-glucosa .....	50
10) Determinación de los niveles de lactato.....	50
11) Determinación de la actividad de lactato deshidrogenasa.....	51
12) Determinación de la viabilidad celular.....	51
13) Determinación de ADN y proteínas.....	52
14) Análisis estadístico.....	52
<b>DISEÑO EXPERIMENTAL</b> .....	53
1) Estudio de la regulación del metabolismo de ácidos grasos y de la expresión de genes relacionados.....	53
1.a) Oxidación de ácidos grasos.....	53
1.b) Expresión de genes relacionados con el transporte y metabolismo de ácidos grasos.....	53
2) Estudio de la participación de los PPARs en la regulación de la producción de lactato y de los mecanismos moleculares involucrados.....	54
2.a) Producción de lactato.....	54
2.b) Mecanismos moleculares involucrados en la producción de lactato.....	55

2.b.1) Incorporación de glucosa y expresión de GLUT1 .....	55
2.b.2) Actividad de LDH y expresión de LDH A .....	55
2.b.3) Expresión de MCT4.....	56
2.b.4) Regulación del complejo piruvato deshidrogenasa.....	56
i. Niveles de PDC fosforilado.....	56
ii. Expresión de PDKs y PDPs.....	57
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>58</b>
<b>I. PARTICIPACIÓN DE LOS PPARs EN EL METABOLISMO DE ÁCIDOS GRASOS Y EN LA PRODUCCIÓN DE LACTATO EN LA CÉLULA DE SERTOLI.....</b>	<b>58</b>
<b>1) Regulación de la oxidación de ácidos grasos por activación de PPAR <math>\alpha</math> y PPAR <math>\beta/\delta</math>.....</b>	<b>59</b>
<b>2) Regulación de la expresión de genes relacionados con el transporte y metabolismo de ácidos grasos por activación de PPAR <math>\alpha</math> .....</b>	<b>60</b>
2.a) Regulación de la expresión de FAT/CD36.....	60
2.b) Regulación de la expresión de CPT1.....	60
2.c) Regulación de la expresión de LCAD y MCAD.....	62
<b>3) Regulación de la expresión de genes relacionados con el transporte y metabolismo de ácidos grasos por activación de PPAR <math>\beta/\delta</math>.....</b>	<b>63</b>
3.a) Regulación de la expresión de FAT/CD36.....	63
3.b) Regulación de la expresión de CPT1.....	64
3.c) Regulación de la expresión de LCAD y MCAD.....	65
<b>4) Regulación de la producción de lactato por activación de PPAR <math>\alpha</math> y PPAR <math>\beta/\delta</math> .....</b>	<b>67</b>
<b>5) Regulación de mecanismos moleculares relacionados con la producción de lactato por activación de PPAR <math>\alpha</math> y PPAR <math>\beta/\delta</math>.....</b>	<b>68</b>
5.a) Regulación de la entrada de glucosa a la célula.....	68
5.b) Regulación de la conversión de piruvato a lactato catalizada por LDH.....	70
5.c) Regulación de la expresión de MCT4.....	70

5.d) Regulación del complejo PDC.....	72
i. Regulación de los niveles de PDC fosforilado.....	72
ii. Participación de las PDKs en la producción de lactato.....	73
iii. Regulación de la expresión de PKDs.....	75
iv. Regulación de la expresión de PDPs.....	77
<b>II. ANÁLISIS DE LOS POSIBLES MECANISMOS FISIOLÓGICOS QUE CONDUCEN A LA ACTIVACIÓN DE LOS PPARs EN LA CÉLULA DE SERTOLI .....</b>	<b>80</b>
<b>1) Regulación de la expresión de genes relacionados con el transporte y metabolismo de ácidos grasos por CGA.....</b>	<b>81</b>
1.a) Regulación de la expresión de FAT/CD36.....	81
1.b) Regulación de la expresión de CPT1.....	82
1.c) Regulación de la expresión de LCAD y MCAD.....	82
<b>2) Participación de PPAR <math>\beta/\delta</math> en la regulación de la expresión de genes relacionados con el transporte y metabolismo de ácidos grasos por CGA.....</b>	<b>83</b>
2.a) Participación de PPAR $\beta/\delta$ en la expresión de FAT/CD36.....	84
2.b) Participación de PPAR $\beta/\delta$ en la expresión de CPT1.....	84
2.c) Participación de PPAR $\beta/\delta$ en la expresión de LCAD.....	84
<b>3) Regulación de la oxidación de ácidos grasos y de la expresión de genes relacionados con su transporte y metabolismo por ácido palmítico.....</b>	<b>86</b>
3.a) Regulación de la oxidación de ácidos grasos.....	86
3.b) Regulación de la expresión de FAT/CD36.....	87
3.c) Regulación de la expresión de CPT1.....	87
3.d) Regulación de la expresión de LCAD y MCAD.....	88
<b>4) Participación del PPAR <math>\beta/\delta</math> en la regulación de la oxidación de ácidos grasos y de la expresión de genes relacionados con su transporte y metabolismo por ácido palmítico.....</b>	<b>89</b>
4.a) Participación de PPAR $\beta/\delta$ en la oxidación de ácidos grasos.....	89

4.b) Participación de PPAR $\beta/\delta$ en la expresión de FAT/CD36.....	90
4.c) Participación de PPAR $\beta/\delta$ en la expresión de CPT1.....	90
4.d) Participación de PPAR $\beta/\delta$ en la expresión de LCAD.....	90
<b>5) Regulación de la producción de lactato por CGA y ácido palmítico. Participación de PPAR <math>\beta/\delta</math>.....</b>	<b>92</b>
<b>III. REGULACIÓN HORMONAL DE LA OXIDACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS. POSIBLE PARTICIPACIÓN DE PPAR <math>\beta/\delta</math> EN DICHA REGULACIÓN Y EN LA PRODUCCIÓN DE LACTATO.....</b>	<b>95</b>
1) Regulación de la oxidación de ácidos grasos por FSH y bFGF.....	95
2) Regulación de la expresión de genes relacionados con el transporte y metabolismo de ácidos grasos por FSH y bFGF.....	96
2.a) Regulación de la expresión de FAT/CD36, CPT1, LCAD y MCAD por FSH.....	96
2.b) Regulación de la expresión de FAT/CD36, CPT1, LCAD y MCAD por bFGF.....	97
3) Participación de PPAR $\beta/\delta$ en la regulación del metabolismo de ácidos grasos y en la producción de lactato por FSH.....	99
3.a) Participación de PPAR $\beta/\delta$ en la oxidación de ácidos grasos y en la expresión de FAT/CD36 y CPT1.....	99
3.b) Participación de PPAR $\beta/\delta$ en la producción de lactato.....	101
4) Participación de PPAR $\beta/\delta$ en la regulación del metabolismo de ácidos grasos y en la producción de lactato por bFGF.....	102
4.a) Participación de PPAR $\beta/\delta$ en la oxidación de ácidos grasos y en la expresión de CPT1.....	102
4.b) Participación de PPAR $\beta/\delta$ en la producción de lactato.....	104
4.c) Regulación de los niveles de PDC fosforilado. Participación de PPAR $\beta/\delta$ .....	104
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>107</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>133</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>135</b>



## INTRODUCCIÓN

La palabra testículo tiene su origen del vocablo latino ‘testis’ que significa testigo. Si bien su derivación no es clara, se presume que se debe al hecho que bajo la ley de la antigua Roma, sólo los hombres adultos estaban autorizados a atestiguar.

Desde épocas ancestrales se sabe que los testículos están relacionados con el desarrollo sexual y el poder reproductivo del macho. Sin embargo, varios siglos pasaron hasta que se describieron los túbulos seminíferos en el testículo y los espermatozoides en el semen. Más aún, fue recién en el siglo XIX que se demostró que los espermatozoides eran el producto de divisiones y diferenciaciones celulares ocurridas en el túbulo seminífero (von Kölliker, 1841). Años más tarde, el fisiólogo-histólogo italiano Enrico Sertoli describió la célula de Sertoli como “*cellula ramificata*” y vaticinó para esta célula un rol fundamental para el normal desarrollo del complejo proceso de multiplicación y diferenciación celular que ocurre en el túbulo seminífero conocido como espermatogénesis (Sertoli, 1865).

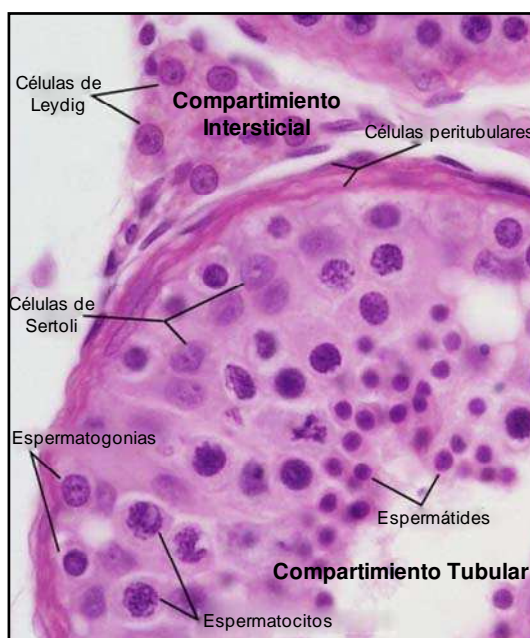
Los aspectos más estudiados de la célula de Sertoli han sido recogidos en numerosos libros entre los que se encuentran “*The Sertoli Cell*” (Russell y Griswold, 1993) y “*Sertoli Cell Biology*” (Skinner y Griswold, 2004) que poseen dimensiones bíblicas. En esta introducción se resumirán muy brevemente alguna de las características más destacadas de dicha célula.

## CITOLOGÍA DEL TESTÍCULO

El análisis histológico del testículo de mamíferos muestra que el mismo está organizado en dos compartimientos, el intersticial y el tubular. El compartimiento intersticial está constituido principalmente por células de Leydig, encargadas de la producción de andrógenos, conjuntamente con otros tipos celulares como fibroblastos, macrófagos, linfocitos y mastocitos. Todas las células presentes en el intersticio se encuentran embebidas en una matriz conectiva laxa en la cual pueden observarse además, vasos

sanguíneos de varios calibres, nervios y vasos linfáticos (Fawcett y col., 1973). Por otro lado, en el compartimiento tubular se encuentran las células de Sertoli y un gran número de células germinales tales como espermatogonias, espermatoцитos y espermátides en distintos estadios de maduración (figura 1).

El compartimiento tubular es un sector avascularizado del testículo que está rodeado por una capa de células mioideas denominadas peritubulares. Continuando hacia el interior del túbulo seminífero puede observarse la membrana basal, especialización de la matriz extracelular presente en tejidos epiteliales, y las células de Sertoli apoyadas sobre ésta en contacto directo con las células germinales en desarrollo. Con el advenimiento de la microscopia electrónica se describieron estructuras características de membrana que permiten la unión entre células de Sertoli y células germinales y entre células de Sertoli vecinas. Entre estas últimas, se destacan las uniones estrechas o *tight junctions* que representan el principal componente de la barrera hemato-testicular (Dym y Fawcett, 1970), barrera de permeabilidad selectiva que aísla a las células germinales en desarrollo de la circulación sistémica y cuya su función se explicará más adelante en esta introducción.



**Figura 1.** Imagen histológica testicular donde puede observarse el compartimiento tubular y el compartimiento intersticial. El compartimiento tubular se encuentra rodeado por una capa de células mioideas denominadas peritubulares. En el interior del mismo se observan células de Sertoli, espermatogonias, espermatoцитos y espermátides. En el compartimiento intersticial se observa una población de células de Leydig.  
Tomado de: [http://embryology.med.unsw.edu.au/Medicine/BGDlabXYXX\\_Histology.htm](http://embryology.med.unsw.edu.au/Medicine/BGDlabXYXX_Histology.htm)

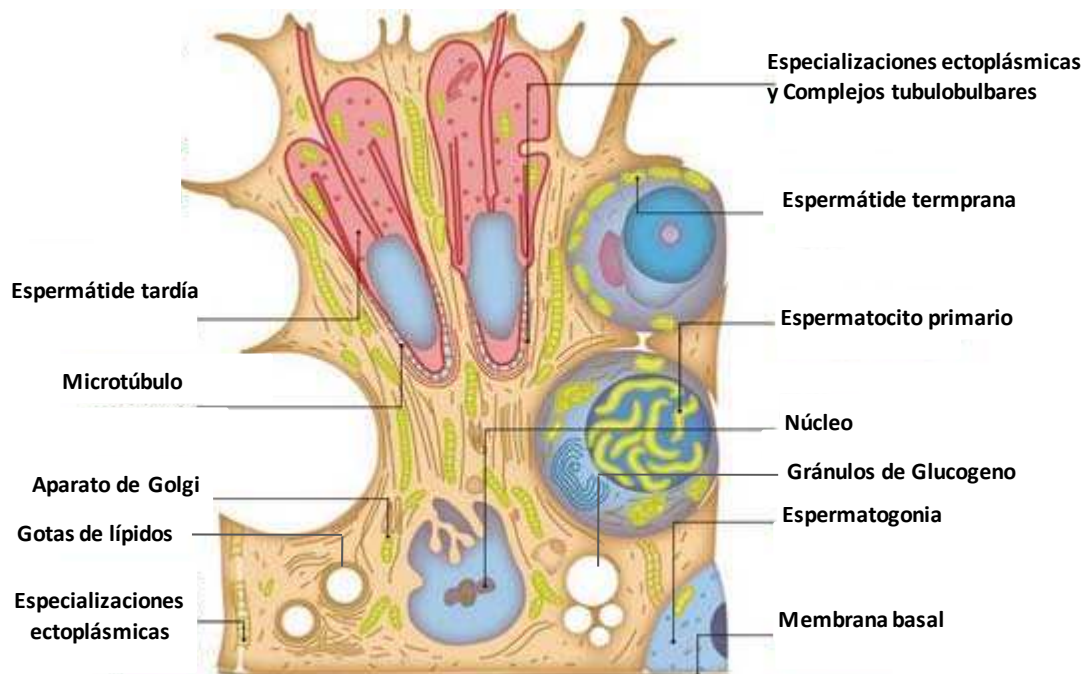
La barrera hemato-testicular es la que divide al túbulo seminífero en dos compartimientos: a) el compartimiento basal conteniendo espermatogonias y espermatocitos meióticos hasta el estadio preleptoténico y b) el comportamiento adluminal, conteniendo espermatocitos desde el estadio leptoténico y espermatídes en distintos estadios de maduración.

### **CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES DE LA CÉLULA DE SERTOLI**

La célula de Sertoli es una célula con una arquitectura columnar, cuyo citoplasma se extiende desde la membrana basal hasta la luz tubular. Presenta numerosos procesos laterales y apicales que se desarrollan entre las células germinales, dándole un aspecto arbóreo y conformando un epitelio cilíndrico simple. Una característica de la célula de Sertoli a destacar es la distribución desigual de las organelas en su citoplasma. Este hecho probablemente demuestre un funcionamiento sectorizado que está relacionado con las necesidades fisiológicas de las distintas células germinales con las que contacta. Al respecto, se han podido identificar distintas asociaciones celulares características que definen los catorce estadios del ciclo espermático en los roedores (I a XIV) (Leblond y Clermont, 1952). Adicionalmente, se ha observado que la célula de Sertoli sufre marcados cambios morfológicos dependiendo del estadio del ciclo en que se encuentre (Parvinen, 1982).

Continuando con la descripción de la distribución y características generales de las organelas en la célula de Sertoli, cabe destacar la presencia de un núcleo de gran tamaño con una localización en la base celular. Además se puede destacar la presencia de indentaciones, una distribución homogénea de la eucromatina, muy poca heterocromatina y uno o dos nucléolos prominentes. En el citoplasma pueden observarse gránulos de glucógeno, gran número de gotas lipídicas, mitocondrias polimórficas, un aparato endosomal-lisosomal importante, un sistema desarrollado de cisternas del retículo endoplásmico y un aparato de Golgi de localización peri y supranuclear, que le confiere una

alta capacidad de procesar y secretar proteínas. La ausencia de gránulos de secreción sugiere que las proteínas no son almacenadas dentro de la célula, sino secretadas inmediatamente luego de su síntesis (Russell, 1993). Es destacable la presencia de un citoesqueleto prominente y elaborado, responsable del sostén y arquitectura particular del epitelio seminífero. Asimismo, es importante mencionar la existencia de especializaciones ectoplásmicas y complejos tubulobulbares asociados al citoesqueleto, que también participan en la función de sostén. En la figura 2 se muestra un esquema de la citoarquitectura de una célula de Sertoli en íntima relación con distintas células germinales y donde se señalan algunas de las entidades subcelulares mencionadas anteriormente.



**Figura 2.** El esquema ilustra la ultraestructura de una célula de Sertoli. Se destacan: Aparato de Golgi, Microtúbulos, Núcleo, Membrana basal, Gotas de lípidos, Gránulos de glucógeno, Especializaciones ectoplásmicas y Complejos tubulobulbares. Se pueden observar también células germinales en íntimo contacto con la célula de Sertoli como: Espermátide temprana, Espermátide tardía, Espermatocono primario y Espermatogonia.

Tomado de: <http://www.icarito.cl/herramientas/despliegue/laminas/2010/02/376-700006-3-celula-de-sertoli.shtml>.

## CARACTERÍSTICAS FUNCIONALES DE LA CÉLULA DE SERTOLI

Las funciones principales de las células de Sertoli están relacionadas con su capacidad de mantener vivas y facilitar el desarrollo de las células germinales. Para ello las células de Sertoli contribuyen: 1) al soporte estructural; 2) al aislamiento de la circulación

sistémica, mediante la formación de la barrera hemato-testicular; 3) al posicionamiento adecuado de las células germinales; 4) a la integridad del túbulo seminífero mediante la actividad fagocítica; 5) a la provisión de un microentorno adecuado para su desarrollo mediante una intensa actividad secretoria y 6) a la provisión de nutrientes como lactato.

### **1) Soporte estructural**

Como se mencionó con anterioridad, una característica particular de la célula de Sertoli es el citoesqueleto prominente, responsable de la arquitectura particular del epitelio seminífero. Los filamentos de actina, los filamentos intermedios y los microtúbulos que lo componen tienen una distribución peculiar que cambia con los distintos estadios del ciclo del epitelio seminífero. Numerosos estudios morfológicos demostraron que el citoesqueleto es responsable: a) del mantenimiento de la forma celular, b) de la ubicación y transporte de las organelas en el citoplasma, c) de la formación y estabilización de los contactos célula-célula y célula-matriz extracelular, d) del posicionamiento y movimiento de las distintas células germinales y e) de la liberación de las espermátides maduras, proceso llamado espermiación.

### **2) Barrera hemato-testicular**

El concepto de barrera hemato-testicular fue establecido originalmente a principios del siglo pasado. Experimentos utilizando colorantes que se inyectaban en las venas yugulares de ratones, mostraron que todos los órganos aparecían marcados menos el cerebro y los tubos seminíferos del testículo (Ribbert, 1904; Bouffard, 1906; Goldmann, 1909). Estos resultados sugerían la existencia de una barrera selectiva que separaba los distintos compartimientos. Muchos años más tarde el trabajo de Setchell y Waites (1975) en el que colectaron cuidadosamente fluidos de distintos compartimientos del testículo y los compararon con el plasma demostró claras diferencias en la composición de los mismos. Al mismo tiempo y mediante estudios de microscopía electrónica se caracterizó la

ultraestructura de la barrera hemato-testicular (Dym y Fawcett, 1970; Fawcett y col., 1970; Dym y Cavicchia, 1977; Russell y Peterson, 1985). Se atribuyó a las uniones estrechas que se organizan entre células de Sertoli vecinas el rol principal en la formación de la barrera hemato-testicular. Hoy se sabe que dicha barrera está compuesta por un conjunto de uniones especializadas que incluyen no sólo a las uniones estrechas sino también a las especializaciones ectoplásmicas basales, uniones tipo desmosomas y uniones GAP (Cheng y Mruk, 2002; Mruk y Cheng, 2008; Setchell, 2008; Vogl y col., 2008).

La barrera hemato-testicular es una estructura que se establece recién en el comienzo de la pubertad, a los 15 días de edad en la rata y entre los 12 y 14 años en el varón (Dym y Fawcett, 1970; Russell, 1993). Una vez formada la barrera hemato-testicular, las células germinales presentes en el compartimiento adluminal quedan aisladas de la circulación sistémica y dependen de la célula de Sertoli para su normal desarrollo. Como se mencionó, la composición de iones, aminoácidos, proteínas, hidratos de carbono, lípidos y vitaminas del fluido tubular difiere de la composición plasmática y constituye el medio adecuado para el desarrollo de la espermatogénesis. Es precisamente la célula de Sertoli la responsable de dicha composición del fluido tubular. Cabe mencionar que la barrera hemato-testicular crea también una barrera inmunológica, ya que previene la entrada de inmunoglobulinas y linfocitos al compartimiento adluminal asegurando que el sistema inmune no reconozca antígenos presentes en las células germinales haploides.

Una característica particular de la barrera hemato-testicular es su naturaleza dinámica, ya que debe remodelarse periódicamente permitiendo la transposición de las células germinales del compartimiento basal al adluminal en el momento que se produce el pasaje de espermatocito preleptoténico a leptoténico.

### **3) Posicionamiento de las células germinales**

Las células germinales carecen de la arquitectura característica de células que migran como por ejemplo los fibroblastos, por lo que el movimiento de las mismas desde la

base del túbulo hasta la luz tubular, que acompaña el proceso de generación de los espermatozoides, es activamente controlado por las células de Sertoli. Cabe destacar que dicho movimiento se pone de manifiesto en tres fenómenos diferentes: 1) la transposición, que comprende el pasaje de un espermatocito preleptoténico/leptoténico desde el compartimiento basal al compartimiento adluminal, 2) la migración de las espermátides a través del epitelio seminífero y 3) la espermiación, que implica la liberación de espermatozoides a la luz tubular.

La dinámica, apertura y cierre, de la barrera hemato-testicular está estrictamente regulada tal que permite la transposición del espermatocito leptoténico recientemente formado al compartimiento adluminal. En este proceso de transposición existe una profunda remodelación del túbulo seminífero que involucra a proteínas del citoesqueleto, proteínas de unión, proteasas e inhibidores de proteasas y donde participarían en forma coordinada un gran número de señales de transducción (Cheng y Mruk, 2012).

Con respecto a la migración hacia la luz tubular de las espermátides a medida que maduran, se conoce que es un mecanismo finamente sincronizado y se ha observado que participan en la misma las tirosina quinasas FAK, c-YES y c-Src (Xiao y col., 2014).

En cuanto a la espermiación, numerosos estudios demuestran un rol fundamental de las especializaciones ectoplásmicas y de los complejos tubulobulbares en este proceso. En el testículo de rata, las especializaciones ectoplásmicas pueden observarse en la unión entre espermátides elongadas y células de Sertoli y las mismas desaparecen cuando ocurre la espermiación. Por otro lado, los complejos tubulobulbares se observan en las uniones entre células de Sertoli y espermátides elongadas recién cuando estas últimas están a punto de ser liberadas. Se ha postulado que tanto las especializaciones ectoplásmicas como los complejos tubulobulbares impiden la liberación prematura de las espermátides a la luz tubular (Qian y col., 2014).

#### 4) Actividad fagocítica

La fagocitosis es un tipo de endocitosis en la cual las células rodean con su membrana plasmática a partículas introduciéndolas a su interior. Se trata de un proceso controlado y regulado en el que se produce un reconocimiento del elemento a fagocitar, la posterior formación de endosomas, la fusión con lisosomas primarios y formación de lisosoma secundario, donde ocurrirá la degradación de su contenido. Algunas macromoléculas pueden ser reutilizadas por la célula y otras eliminadas como desechos.

Las células de Sertoli poseen una actividad fagocítica muy importante, semejante a la presente en los macrófagos –célula del sistema inmune especializada en dicho proceso. La función fagocítica de la célula de Sertoli es esencial para el mantenimiento de la integridad del epitelio seminífero, ya que juega un rol esencial en la eliminación de los cuerpos residuales y de las células germinales apoptóticas (Kerr y de Krester, 1974; Shiratsuchi y col., 1999). Los cuerpos residuales son porciones citoplasmáticas que se remueven de las espermatídes elongadas en el momento en que se produce la liberación de los espermatozoides a la luz tubular. Curiosamente, los cuerpos residuales comparten con las células germinales apoptóticas la exposición en la cara externa de su membrana del fosfolípido fosfatidilserina, lo que podría constituir un mecanismo común de reconocimiento para ambos (Blanco-Rodriguez y Martinez-Garcia, 1999).

Cabe destacar que la familia de receptores *scavenger* –entre los cuales se encuentra el FAT/CD36– participa en la fagocitosis de células germinales apoptóticas (Kawasaki y col., 2002) y cuerpos residuales en la célula de Sertoli (Gillot y col., 2005). De hecho, se ha postulado que el aumento de gotas lipídicas que se observa en el túbulo seminífero luego del proceso de espermiación proviene de los productos de digestión de la fagocitosis y además, que dichas gotas lipídicas proveen sustratos energéticos -como los ácidos grasos- para la producción de ATP en células de Sertoli (Kerr y col., 1984; Sasso-Cerri y col., 2001; Xiong y col., 2009).



## 5) Función secretoria

Considerando que el microentorno que propicia el desarrollo de la espermatogénesis es generado por la célula de Sertoli, no es sorprendente que esta célula secrete una gran cantidad de sustancias tales como iones, nutrientes y una amplia variedad de proteínas tanto al compartimiento adluminal como al basal. Cabe mencionar que algunas de las proteínas producidas por las células de Sertoli son idénticas o similares a las proteínas presentes en el plasma, mientras que otras son específicas del testículo (Wright y col., 1981). Cada una de estas proteínas cumple funciones muy diversas y, entre otras, se han descrito proteínas de transporte, proteasas, inhibidores de proteasas, glicoproteínas de la matriz extracelular, hormonas y factores de crecimiento (Griswold, 1988).

Con respecto a las proteínas de transporte, la proteína ligadora de andrógenos (ABP), fue una de las primeras en ser identificada (Sanborn y col., 1975). La secreción de ABP se produce tanto hacia la zona apical como hacia la zona basal del túbulo. Se ha demostrado que en cultivos de células de Sertoli obtenidos de ratas en distintos estadios de maduración la secreción de ABP varía, alcanzando valores máximos en células de rata adultas (Sanborn y col., 1986). Esta proteína se detecta en el epidídimo luego que se ha formado la barrera hemato-testicular y ha aparecido la luz tubular. Además, debido a que su secreción es bidireccional se la detecta también en suero, aunque los niveles son mucho menores que los intratesticulares (Gunsalus y col., 1980). Se ha sugerido que la función de ABP en el testículo estaría relacionada con su capacidad de regular los niveles de andrógeno libre. Por otra parte, la alta capacidad de ABP para transportar andrógenos en la luz tubular y su pasaje a la luz epididimaria hace que esta proteína sea esencial para el aporte de andrógenos al epitelio epididimario.

La transferrina es otra de las proteínas de transporte producida por la célula de Sertoli. Esta proteína, con capacidad de unir hierro, tiene características similares a la transferrina presente en el suero. En el túbulo seminífero existe un fenómeno particular de transporte transepitelial de hierro que involucra a las células de Sertoli. La célula de Sertoli incorpora por su zona basal a la transferrina sérica mediante receptores específicos. Una

vez en el interior de la célula, la proteína es degradada y el hierro se une a la transferrina sintetizada *de novo* que es ahora secretada al compartimento adluminal (Skinner y Griswold, 1980). La transferrina se incorpora a las células germinales y el hierro es utilizado para la síntesis de diversas hemoproteínas.

Si bien la ABP y la transferrina fueron las proteínas de transporte de la célula de Sertoli más ampliamente estudiadas, esta célula secreta muchas otras proteínas (Wright y col., 1981). Entre aquellas encargadas de transportar iones se encuentran la ceruloplasmina y la proteína secretada ácida rica en cisteína (SPARC). La ceruloplasmina es una proteína que puede transportar cobre en suero aunque también funciona como una oxidasa multifuncional (Skinner y Griswold, 1983). La SPARC es una proteína capaz de transportar calcio y es también conocida como osteonectina, en razón de haber sido aislada de hueso (Termine y col., 1981). En la célula de Sertoli se observa una fuerte variación en su expresión dependiendo del complemento de células germinales presentes, o sea con los estadios de la espermatogénesis (Vernon y Sage, 1989).

Por otro lado, la célula de Sertoli secreta proteínas con actividad de proteasas y de inhibidores de proteasas. Dentro del conjunto de proteasas secretadas se encuentran los activadores del plasminógeno tipo urokinasa y tipo tisular (Lacroix y col., 1977; Hettle y col., 1986), la proteína ciclica 2/catepsina L (Wright y Luzarraga, 1986), las catepsinas B, C, D y S (Mathur y col., 1997) y la metaloproteasa 2 (Sang y col., 1990; Ailenberg y col., 1991). Entre los inhibidores de proteasas encontramos la  $\alpha$ 2-macroglobulina (Cheng y col., 1990), los inhibidores de metaloproteasas tipo 1 y 2 (Slongo y col., 2002; Mruk y col., 2003) y la cistatina C (Tsuruta y col., 1993). La secreción de este tipo de proteínas ha sido relacionada con procesos de reestructuración o remodelación del túbulo seminífero durante los procesos de transposición, migración y espermiación antes mencionados.

Por otro lado, cabe mencionar que las células de Sertoli en cooperación con las células peritubulares secretan los componentes de la membrana basal, especialización de la matriz extracelular que se encuentra entre ambos tipos celulares. Mientras que las células de Sertoli sintetizan colágeno tipo IV, laminina y heparán sulfato, las células peritubulares

producen fundamentalmente fibronectina y colágeno tipo I y tipo IV (Skinner y Fritz, 1985; Borland y col., 1986; Davis y col., 1990; Richardson y col., 1995).

Si bien la mayoría de las proteínas secretadas por la célula de Sertoli tienen efecto dentro de la gónada existen otras, tales como la hormona anti mülleriana (AMH) y las inhibinas, que son secretadas a la circulación sistémica y que actúan como mediadores endocrinos. La AMH se expresa en la vida fetal y provoca la regresión de los conductos de Müller en los fetos masculinos. La expresión de AMH es máxima durante la vida fetal y neonatal y se mantiene elevada durante la infancia. Al llegar la pubertad la expresión de AMH disminuye marcadamente, coincidiendo con la aparición de células germinales meióticas y de los receptores de andrógenos en células de Sertoli. Los niveles periféricos de AMH en la infancia y pubertad temprana del hombre constituyen un buen marcador de la presencia de la gónada y al mismo tiempo del estado de maduración de las células de Sertoli (Josso y col., 2001; Rey y col., 2003). Por otro lado, las inhibinas son glicoproteínas diméricas cuya función endocrina es regular la expresión de la subunidad  $\beta$  de la hormona folículo estimulante (FSH) en la hipófisis. La inhibina B (compuesta por las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ B) constituye el único dímero de relevancia fisiológica en el varón (Illingworth y col., 1996; Anawalt y col., 1996). La inhibina B ha sido propuesta, por algunos autores, como marcador periférico de la funcionalidad de la célula de Sertoli y de la espermatogénesis en el hombre (Sharpe y col., 1999; Ballescá y col., 2000; Brugo-Olmedo y col., 2001; de Kretser y col., 2004). Si bien estas proteínas fueron conocidas originalmente por su función endocrina, hoy se sabe que también pueden ejercer funciones paracrinas/autocrinas (Risbridger y Skinner, 1992).

## **6) Suministro de lactato a las células germinales**

Además de las numerosas funciones mencionadas, se considera particularmente importante la función nutricional que las células de Sertoli ejercen sobre las células germinales. Esta función se realiza mediante la secreción al compartimiento adluminal de

sustancias que son fundamentales para la supervivencia de las células germinales que se localizan más allá de la barrera hemato-testicular. Entre ellas se encuentra el lactato que ha sido una de las sustancias más ampliamente analizadas en cuanto a su capacidad para mantener los niveles energéticos en espermatoцитos y espermátides.

Robinson y Fritz (1981) analizaron la metabolización de glucosa marcada con  $^{14}\text{C}$  determinando la presencia de la marca radioactiva en compuestos tales como  $\text{CO}_2$ , aniones, lípidos y glucógeno en cultivos de células de Sertoli de rata de 20 días de edad. Observaron que la mayor proporción de la marca estaba presente en los aniones, particularmente en el lactato, mientras que sólo una pequeña cantidad de  $^{14}\text{C}$  aparecía en  $\text{CO}_2$  y en menor proporción aún en glucógeno y lípidos. Años más tarde, Grootegeed y colaboradores (1986a), estudiaron la metabolización del piruvato en la célula de Sertoli y observaron que sólo un bajo porcentaje del metabolito era oxidado a  $\text{CO}_2$ , mientras que la mayor parte era convertido a lactato. Teniendo en cuenta estos estudios, se concluyó que en la célula de Sertoli la glucosa es mayoritariamente metabolizada a lactato y que solamente una pequeña parte es oxidada a través del ciclo de Krebs.

En forma simultánea a los estudios mencionados con anterioridad, Jutte y colaboradores (1981), utilizando espermatoцитos paquiténicos y espermátides redondas en cultivo, demostraron que tanto la incorporación de uridina tritiada a ARN como la de leucina tritiada a proteínas aumentan cuando las células germinales son incubadas con lactato y no así cuando lo son con glucosa. Asimismo, observaron que la ausencia de lactato en el medio de cultivo produce una disminución de la viabilidad de las células germinales. Por otro lado, observaron que cuando los espermatoцитos meióticos son cocultivados con células de Sertoli la incorporación de uridina al ARN no requiere la presencia de lactato pero sí de glucosa, lo que sugiere que el azúcar es metabolizado a lactato en este último tipo celular (Jutte y col., 1982).

Los resultados obtenidos en estos primeros estudios condujeron a varios grupos de trabajo a evaluar la utilización de distintos sustratos energéticos para mantener los niveles de ATP intracelular en espermatoцитos y espermátides redondas en cultivo. Se demostró que

el lactato y el piruvato son los principales sustratos energéticos utilizados por las mencionadas células germinales. Al respecto, se observó que en ausencia de lactato o piruvato disminuye el contenido de ATP intracelular mientras que esta disminución es revertida cuando las células son incubadas en presencia de los mismos (Mita y Hall, 1982; Nakamura y col., 1984, 1986; Grootegoed y col., 1986b).

A partir del conjunto de todos estos resultados se postuló una cooperación metabólica entre las células de Sertoli y las células germinales. Las células de Sertoli son las encargadas de proveer lactato que es utilizado como sustrato energético por los espermatocitos meióticos y las espermátides (Boussouar y Benahmed, 2004). Una cooperación metabólica similar, en la que también participa el lactato, se ha descrito entre astrocitos y neuronas. Los astrocitos jugarían un papel comparable al que desempeñan las células de Sertoli en el túbulo seminífero (Pellerin y Magistretti, 1994).

El camino metabólico que lleva a la producción de lactato a partir de glucosa y su exportación de la célula involucra la regulación de un gran número de procesos entre los que se encuentran: a) la incorporación de glucosa a la célula mediada por transportadores de glucosa (GLUTs), b) la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH), que cataliza la conversión de piruvato a lactato, c) la regulación del complejo piruvato deshidrogenasa (PDC) y d) la exportación del lactato a través de transportadores de monocarboxilatos (MCTs).

A continuación se realizará una breve descripción de cada uno de los procesos mencionados y de los mecanismos involucrados en los mismos.

#### *6.a) Entrada de glucosa a la célula mediada por transportadores de glucosa*

El proceso de incorporación de glucosa es un mecanismo de transporte facilitado a través de glicoproteínas integrales de membrana pertenecientes a la familia de los transportadores de glucosa. Dicha familia está conformada por catorce miembros, del GLUT1 al GLUT14 (Gorovits y Charron, 2003; Wu y Freeze, 2002; Mueckler y Thorens, 2013), con alta homología entre ellos. El GLUT1 es un transportador ubicuo de alta afinidad,

por lo que se cree que es el principal encargado del transporte de glucosa en el organismo. El GLUT3 es también un transportador de alta afinidad pero que se expresa fundamentalmente en cerebro, placenta y testículo. En nuestro laboratorio se demostró previamente que, en la célula de Sertoli se expresan el GLUT1 y el GLUT3, y que la expresión del transportador GLUT1 se regula por hormonas en forma semejante a la entrada de glucosa a la célula y a la producción de lactato sugiriendo un papel fisiológico para este transportador (Galardo y col., 2008).

#### *6.b) Actividad de la enzima lactato deshidrogenasa*

La LDH es la enzima que cataliza la interconversión de piruvato a lactato. La enzima utiliza como coenzima  $\beta$ -NADH/ $\beta$ -NAD<sup>+</sup> que cede o acepta los equivalentes de reducción. Existen cinco isoenzimas de expresión somática (LDH 1-LDH 5) y una isoenzima de expresión germinal (LDH X). Las isoenzimas somáticas son productos de asociación de las subunidades A y B con el fin de formar homo- o heterotetrámeros. Las combinaciones de estas subunidades dan origen a la LDH 1 (B4), LDH 2 (B3A1), LDH 3 (B2A2), LDH 4 (B1A3) y LDH 5 (A4), que presentan distintas propiedades cinéticas. En cuanto a las características de las distintas isoenzimas cabe mencionar que la LDH 1 (B4), conocida como isoenzima cardíaca, es inhibida por altas concentraciones de piruvato, mientras que la isoenzima LDH 5 (A4), conocida como isoenzima muscular, no se inhibe en las mencionadas condiciones (Cahn y col., 1962; Pesce y col., 1964). En términos generales se ha observado que, aquellas isoenzimas que poseen mayor proporción de la subunidad A poseen características cinéticas que favorecen la reducción del piruvato a lactato y que están presentes en mayor proporción en células con una glucólisis muy activa tal como la célula de Sertoli. En células de Sertoli aisladas de ratas de dos y cuatro semanas de edad, se observó que las cinco isoenzimas (LDH 1-5) se encuentran presentes (Santemma y col., 1987). Estudios de nuestro laboratorio demostraron que la actividad de LDH y la expresión de la subunidad A, se encuentran reguladas hormonalmente y estos fenómenos estarían vinculados con la regulación de la producción de lactato por la célula de Sertoli (Riera y col., 2001).

### *6.c) Regulación del complejo piruvato deshidrogenasa*

El aumento en la disponibilidad de piruvato, sustrato de la enzima LDH, constituye otro mecanismo que podría estar involucrado en la regulación de la producción de lactato. El complejo enzimático mitocondrial piruvato deshidrogenasa (PDC), cataliza la descarboxilación oxidativa del piruvato convirtiéndolo en acetil-CoA. El mencionado complejo está conformado por tres enzimas, la piruvato deshidrogenasa (E1, también conocida como piruvato decarboxilasa), la dihidrolipoil transacetilasa (E2) y la dihidrolipoil deshidrogenasa (E3). La actividad del complejo PDC es regulada negativamente por fosforilación de E1. El estado de fosforilación de PDC es regulado por una familia de cuatro quinasas, piruvato deshidrogenasa quinasas (PDK1-4) (Korotchkina y Patel, 2001) y por dos fosfatasas, piruvato deshidrogenasa fosfatasas (PDP1-2) (Karpova y col., 2003). Recientemente en nuestro laboratorio hemos observado que la célula de Sertoli expresa las cuatro isoformas de PDKs y las dos isoformas de PDPs, y que los niveles de PDC fosforilado se regulan hormonalmente en forma tal que se correlaciona con un aumento de la producción de lactato (Regueira y col., 2015).

### *6.d) Expresión de los transportadores de monocarboxilatos*

El transporte del lactato a través de la membrana plasmática, mediado por una familia de transportadores de monocarboxilatos, es un proceso de co-transporte con  $H^+$ . La familia de MCTs está conformada por catorce miembros que presentan alta homología (Merezhinskaya y Fishbein, 2009). Estos transportadores median el flujo hacia dentro o fuera de la célula de diversas sustancias entre las que podemos mencionar: monocarboxilatos alifáticos, aminoácidos aromáticos y hormonas tiroideas. El MCT1 es un transportador de baja afinidad que se expresa en la mayoría de los tejidos (Bröer y col., 1997, 1998). El MCT2 es un transportador de alta afinidad por el lactato que se encuentra expresado en neuronas (Bröer y col., 1997) y en células germinales (Boussouar y col., 2003). Se ha propuesto que es a través de este transportador que las células germinales

incorporan este hidroxiaácido para cubrir sus necesidades energéticas. El MCT4 es un transportador de baja afinidad para el lactato. Posee una gran expresión en células glucolíticas por lo que se le ha asignado un papel en el transporte de lactato hacia el exterior celular (Dimmer y col., 2000). En la célula de Sertoli se demostró que se encuentran presentes el MCT1 y el MCT4. Además se demostró que este último transportador es regulado hormonalmente y se piensa que es el responsable de transportar el lactato hacia el compartimiento adluminal (Galardo y col., 2007; Galardo, 2009).

## REGULACIÓN HORMONAL Y PARACRINA DE LA CÉLULA DE SERTOLI

Las gonadotrofinas hipofisarias hormona luteinizante (LH) y FSH son las principales hormonas que regulan la funcionalidad de la célula de Sertoli. La acción de FSH se ejerce de forma directa mientras que la de LH se ejerce de forma indirecta a través de los andrógenos secretados por la célula de Leydig. Por otro lado, además de la regulación gonadotrófica, se ha observado que la funcionalidad de la célula de Sertoli cambia sustancialmente por la interacción con las células germinales que la rodean. Como ya se mencionó, las células germinales no están distribuidas al azar a lo largo del túbulo seminífero sino que están estrictamente ordenadas en asociaciones características que definen en la rata catorce estadios de la espermatogénesis. El desarrollo de la técnica de transiluminación de tubos seminíferos, que permite el aislamiento de segmentos de túbulos en estadios específicos del ciclo espermatogénico, hizo posible obtener las primeras evidencias de comunicación intercelular en el túbulo seminífero. Con esta última técnica se demostraron variaciones no sólo en la morfología sino también en la funcionalidad de la célula de Sertoli que pudieron ser correlacionadas con el complemento de células germinales con que dicha célula se encuentra asociada (Parvinen, 1982). Otro avance importante en el conocimiento de la fisiología de la célula de Sertoli se hizo posible gracias al desarrollo de las técnicas de aislamiento y cultivo de este tipo celular, permitiendo la realización de estudios *in vitro*. Se analizaron de esta forma múltiples aspectos del



funcionamiento celular que no habían podido ser evaluados mediante estudios *in vivo*. Particularmente, se avanzó en la identificación de factores necesarios para el crecimiento y diferenciación de la célula de Sertoli. El modelo experimental más usado, aún en la actualidad, es el cultivo de células de Sertoli aisladas a partir de testículos de ratas de 18 a 21 días de edad. Estas células ya han formado *in vivo* las uniones estrechas, no tienen capacidad mitótica, se encuentran en proceso de diferenciación terminal y se las considera capaces de sostener una espermatogénesis completa. Cabe destacar que muchas de las propiedades atribuidas a la célula de Sertoli *in vivo*, tales como la formación de las uniones estrechas, la cesación de la replicación celular durante la maduración sexual y la actividad secretoria y fagocítica han podido ser observadas *in vitro*. Por otro lado, prácticamente todas las funciones que han sido atribuidas a la célula de Sertoli en base a experimentos *in vitro* han sido observados también *in vivo* validando el modelo experimental (Steinberger y Jakubowiak, 1993).

### 1) Regulación por FSH y andrógenos

Los primeros indicios de la regulación por FSH de la funcionalidad de la célula de Sertoli fueron obtenidos luego de la administración *in vivo* de FSH a ratas inmaduras hipofisectomizadas. Se observó que, en estas condiciones experimentales, FSH produce hipertrofia de las células de Sertoli e incrementa la secreción del fluido tubular (Murphy, 1965a, 1965b). Poco tiempo más tarde se demostró que FSH estimula la síntesis de ARN y proteínas en el testículo en los animales de 10 días de edad (Means y Hall, 1967; Means, 1970, 1971). A esta edad sólo están presentes en el túbulo seminífero células de Sertoli y espermatogonias lo que llevó a postular que la acción de FSH se ejercía sobre uno o ambos tipos celulares. Experimentos posteriores de Means y Huckins (1974) revelaron que específicamente las células de Sertoli eran el blanco de acción de FSH. Dichos autores, trabajando con animales que poseían solamente células de Sertoli en los túbulos seminíferos, ya que los gonocitos habían sido destruidos durante la vida fetal por radiación,

demonstraron que FSH producía en estos animales los mismos eventos bioquímicos que los observados en los animales inmaduros. También se observó que FSH altamente purificada y marcada con un isótopo radiactivo se unía a las células de Sertoli (Orth y Christensen, 1977).

Las acciones biológicas de FSH son complejas y varían de acuerdo al estado de diferenciación en que se encuentren las células de Sertoli y el estadio del ciclo espermatogénico en que se encuentren las mencionadas células. Durante el período fetal, neonatal y prepuberal, FSH estimula la proliferación de estas células. Este proceso de proliferación es sumamente importante ya que determinará el número de células de Sertoli que estarán presentes en la vida adulta. Considerando que cada célula de Sertoli puede sostener el desarrollo de un número limitado de células germinales, la eficiencia del período proliferativo determinará la capacidad espermatogénica de un individuo adulto. En la rata, el índice mitótico es máximo en fetos de 20-21 días, disminuyendo progresivamente hasta que luego de la segunda semana post-natal cesa la proliferación de las células de Sertoli (Orth, 1982, 1984).

Asimismo, la FSH juega un papel muy importante en la regulación del proceso de diferenciación terminal de la célula de Sertoli que ocurre simultáneamente con el cese de la proliferación. Dicho proceso de diferenciación terminal coincide también temporalmente con el inicio de la primera división meiótica e involucra la adquisición por la célula de Sertoli de las capacidades necesarias para mantener el desarrollo de la espermatogénesis. FSH regula la mayoría de las funciones de la célula de Sertoli. En cultivos de células de Sertoli se ha observado que FSH regula la expresión de diversas proteínas; entre otras se pueden mencionar: ABP (Fritz y col., 1976; Louis y Fritz, 1979), transferrina (Skinner y Griswold, 1982), activador del plasminógeno (Lacroix y Fritz, 1982), factores de transcripción (c-fos, c-jun) (Hall y col., 1988), inhibina (Toebosch y col., 1989), AMH (Koruda y col., 1990), factores de crecimiento (Naville y col., 1990; Mullaney y Skinner, 1992; Gnessi y col., 1995), GLUT1, LDH A y MCT4 (Riera y col. 2001, Galardo, 2009). Además, se ha demostrado que FSH no solamente regula la síntesis proteica, sino que también modula la síntesis de metabolitos y

macromoléculas tales como: piruvato y lactato (Jutte y col., 1983), triglicéridos y fosfolípidos (Guma y col., 1997).

Las acciones biológicas de la FSH comienzan luego de la interacción de la hormona con su receptor específico. Cabe mencionar que en el testículo dicho receptor está solamente presente en la célula de Sertoli (Simoni y col., 1997). El mismo pertenece a la superfamilia de los receptores acoplados a proteína G. En el animal adulto, aun cuando se observan altos niveles de expresión del receptor de FSH, existe una disminución aparente de la respuesta a la hormona cuando se evalúan los niveles de AMPc intracelulares (Steinberger y col., 1978). Posteriormente, se observó que esta disminución en los niveles de AMPc se debía a un aumento en la actividad de fosfodiesterasas específicas (Means y col., 1980). El conjunto de estas observaciones hizo pensar que la FSH no era necesaria en la vida adulta. Sin embargo, estudios realizados en animales hipofisectomizados demostraron que si bien la función espermatogénica puede ser mantenida cualitativamente con dosis farmacológicas de testosterona, la FSH es necesaria para una espermatogénesis cuantitativamente normal (Marshall y col., 1986. Santulli y col., 1990). Estos últimos resultados, así como la disminución en la espermatogénesis observada en los trabajos realizados con animales *knock-out* del receptor de FSH (FSHRKO) y de la subunidad  $\beta$  de FSH (FSH $\beta$ KO) demuestran la importancia de esta hormona en el control de la función testicular en el adulto (Sairam y Krishnamurthy, 2001).

Los andrógenos juegan un papel central en el desarrollo y mantenimiento de la espermatogénesis. Las primeras evidencias de dicho rol provienen de estudios realizados en animales adultos hipofisectomizados. En estos estudios se observó que la administración de testosterona a los mencionados animales es capaz de mantener la espermatogénesis cuando el tratamiento se inicia inmediatamente luego de la hipofisectomía (Awoniyi y col., 1990).

En cuanto al receptor de andrógenos, estudios realizados sobre cortes de testículo utilizando técnicas de inmunohistoquímica y de hibridización *in situ* demostraron que el receptor de andrógenos se expresa en células de Sertoli, células de Leydig y células

peritubulares en el animal adulto (Sar y col., 1990; Shan y col., 1995, 1997). La mayoría de los estudios indican que el receptor de andrógenos no está presente en células germinales (Grootegoed y col., 1977; Bremner y col., 1994) y por lo tanto, se considera que la acción de los andrógenos sobre la espermatogénesis es indirecta y que la misma se realiza a través de la célula de Sertoli.

La expresión del receptor de andrógenos en células de Sertoli varía durante el desarrollo sexual. En la rata, comienza a detectarse a partir de los 15 días de edad y su expresión aumenta con la edad llegando a sus máximos valores en el animal adulto (Buzek y col., 1987; Buzek y Sanborn, 1988). La FSH presenta un efecto cooperativo con los andrógenos ya que aumenta la expresión de sus receptores (Verhoeven y Cailleau, 1988). La expresión del receptor de andrógenos en células de Sertoli varía con los distintos estadios de la espermatogénesis. Estas observaciones sugieren que dicho receptor de andrógenos no sólo es regulado por FSH sino también por mecanismos de regulación paracrina relacionados con el complemento de células germinales que es particular de cada estadio (Isomaa y col., 1985; Bremner y col., 1994). Por otro lado, también sugieren un requerimiento androgénico distinto en los diferentes estadios de la espermatogénesis.

Cabe mencionar que ha sido muy difícil observar efectos directos de los andrógenos sobre las funciones de las células de Sertoli en estudios *in vitro*. Este hecho probablemente sea debido a que la mayoría de los estudios han sido realizados en células de Sertoli de rata de 18 a 20 días de edad, momento de la vida en que la expresión del receptor de andrógenos es muy baja. Estudios más recientes muestran que la testosterona desempeña una función importante en la formación de la barrera hemato-testicular. En este sentido, existen estudios que muestran que la testosterona aumenta los niveles de claudina 11, proteína fundamental en la formación de la barrera hemato-testicular. Adicionalmente, se ha observado un aumento en la resistencia eléctrica transepitelial, marcadora de formación de una barrera de permeabilidad, y también en la localización de claudina 11 y ocludina en los contactos célula-célula en respuesta a testosterona (Kaitu'u-Lino y col., 2007).

El estudio realizado con animales *knock-out* selectivo del receptor de andrógenos en células de Sertoli ha permitido analizar el papel de los andrógenos en el desarrollo y mantenimiento de la espermatogénesis. En estos animales se observó un arresto en la meiosis, confirmando que las acciones de los andrógenos en células de Sertoli constituyen un requerimiento absoluto para la espermatogénesis (De Gendt y col., 2004).

## 2) Regulación paracrina/autocrina

Diversos péptidos que se producen localmente en el testículo regulan la funcionalidad de la célula de Sertoli. Entre ellos cabe mencionar: 1) neuropéptidos tales como GHRH, péptido activador de la adenilato ciclasa hipofisaria (PACAP), sustancia P y  $\beta$  endorfinas, 2) péptidos vasoactivos tales como endotelina-1 y factor natriurético atrial, 3) factores de crecimiento tales como factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento transformante  $\alpha$  y  $\beta$  (TGF  $\alpha$  y  $\beta$ ), factor de crecimiento neuronal (NGF), factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF), factor crecimiento insulino similar tipo 1 (IGF1) y 4) citoquinas tales como interleuquinas 1 y 6 (IL-1, IL-6) y factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) (Gnessi y col., 1997). Además de factores peptídicos se observó que la funcionalidad de la célula de Sertoli también puede ser regulada por mediadores de distinta naturaleza química tales como nucleótidos/nucleósidos (Conti y col., 1988; Meroni y col., 1998; Galardo y col., 2010), prostaglandinas (Frungeri y col., 2015), vitamina D (Zanatta y col., 2011), ácido retinoico (Livera y col., 2002), endocannabinoides (Grimaldi y col., 2013) y ácido araquidónico (Meroni y col., 2003).

Del conjunto de péptidos de producción local, el bFGF tal vez sea uno de los más representativos en la comunicación germinal-Sertoli. Al respecto, se ha demostrado altos niveles de expresión de bFGF en las células germinales y presencia de sus receptores en la célula de Sertoli. En los siguientes párrafos se describirá brevemente lo que se conocía hasta el momento del inicio del presente trabajo de tesis con respecto a las acciones biológicas que produce el bFGF sobre la célula de Sertoli.

El factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF o FGF-2) pertenece a una familia de al menos 22 polipéptidos (FGF-1 a 22), cuya característica en común es su capacidad de unir heparina. El bFGF fue caracterizado inicialmente por su capacidad para estimular la división celular en fibroblastos, sin embargo, se demostró posteriormente que este péptido modula una amplia variedad de procesos biológicos que no están relacionados con la proliferación celular (Dailey y col., 2005). Por otro lado, se han clonado cuatro genes que codifican para receptores de alta afinidad de bFGF con expresión variable en distintos tejidos (FGFR-1 a FGFR-4) (Johnson y Williams, 1993).

En el testículo, la presencia de bFGF fue detectada en células germinales por técnicas inmunohistoquímicas (Mayerhofer y col., 1991) y poco tiempo más tarde, el mencionado péptido fue purificado a partir de medios condicionados de células germinales (Han y col., 1993). También se demostró la expresión del péptido en células de Sertoli y en células peritubulares en cultivo (Mullaney y Skinner, 1992). En cuanto a la presencia de receptores para el péptido se detectó ARNm para FGFR-1 en células de Sertoli obtenidas a partir de animales de 20 días de edad (Le Magueresse-Battistoni y col., 1994), mientras que la expresión de FGFR-4 sólo pudo ser demostrada en células de Sertoli de animales adultos (Cancilla y Risbridger, 1998).

Diversos estudios han analizado las respuestas biológicas a bFGF en la célula de Sertoli. Al respecto, se ha observado que este péptido regula la secreción de transferrina (Han y col., 1993; Riera y col., 2003), la actividad de la enzima  $\gamma$ -GTP (Scheteingart y col., 1999), la producción de estradiol, glutatión y lactato (Riera y col., 2002; Gualtieri y col., 2009) y la expresión de *c-fos* (Smith y col., 1989). En cuanto a la producción de lactato, hemos demostrado que el bFGF regula varios mecanismos tales como, la entrada de glucosa a la célula, la expresión del transportador de glucosa GLUT1, la expresión de LDH A y la actividad de la enzima LDH (Riera y col., 2002; Galardo y col., 2008). Más recientemente hemos demostrado que el bFGF incrementa los niveles de fosforilación de PDC, aumentando la disponibilidad de piruvato que puede ser convertido a lactato (Regueira y col., 2015).

## METABOLISMO ENERGÉTICO DE LA CÉLULA DE SERTOLI

Las células de Sertoli poseen una gran actividad metabólica que es necesaria para cubrir las demandas de las células germinales así como también las que le son propias. Como se mencionó anteriormente, se han presentado evidencias que indican que la glucosa está destinada fundamentalmente a la producción de lactato. Además, se ha demostrado que la célula de Sertoli aislada se adapta a condiciones extremas de privación de glucosa con mantenimiento de su viabilidad y de la producción de lactato (Riera y col., 2009). Estas observaciones sugieren el uso de una fuente energética distinta de la glucosa para sostener su propio metabolismo. Surge por lo tanto la pregunta *¿qué sustratos utiliza la célula de Sertoli para cubrir sus propias demandas energéticas?*

Algunas evidencias en la literatura apoyan precisamente la idea que la célula de Sertoli utiliza una fuente energética distinta a la combustión de hidratos de carbono. Al respecto, Jutte y colaboradores (1985), utilizando palmitato radioactivo, demostraron que la célula de Sertoli puede oxidar ácidos grasos a  $\text{CO}_2$  y cuerpos cetónicos por lo que estos autores sugirieron que los ácidos grasos constituyen una fuente energética para sostener su metabolismo.

Como ya se mencionó, la actividad fagocítica de la célula de Sertoli es fundamental para mantener la integridad del túbulo seminífero. Al respecto, se ha demostrado que la célula de Sertoli, no sólo fagocita células germinales apoptóticas sino que también fagocita los cuerpos residuales que se liberan en la espermiación. Wang y colaboradores (2006) demostraron, en células de Sertoli en cultivo, una correlación entre la formación de gotas lipídicas y la fagocitosis de células germinales apoptóticas. Estos autores sugirieron que el reciclado del contenido lipídico, proveniente de los cuerpos residuales y de las células germinales apoptóticas, sería la manera más simple de solventar la demanda de ácidos grasos de la célula de Sertoli. Más recientemente, Xiong y colaboradores (2009) analizaron los niveles de ATP en células de Sertoli en distintas condiciones experimentales. Dichos autores observaron que el cocultivo de células de Sertoli con células germinales apoptóticas,

además de aumentar el número de gotas de lípidos, aumenta los niveles de ATP en las células de Sertoli. Adicionalmente, observaron en estos mismos cocultivos que la inhibición de la oxidación de ácidos grasos, pero no así la de la glucólisis, reduce marcadamente los niveles de ATP. Los autores concluyeron que sus resultados eran consistentes con la siguiente hipótesis: *“los ácidos grasos –provenientes de la lipólisis de las gotas de lípidos que resultan de la fagocitosis de las células germinales apoptóticas y de cuerpos residuales– constituyen el principal sustrato energético para las células de Sertoli”*.

Se ha tratado de resumir en los párrafos precedentes las evidencias que existen con respecto al metabolismo energético en el túbulo seminífero. Puede observarse que hasta el momento del presente estudio poco se sabía con respecto a los mecanismos moleculares que participan en la oxidación de ácidos grasos y su regulación hormonal en células de Sertoli.

## **OXIDACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS**

Los ácidos grasos son fundamentales para diversos procesos celulares y como es conocido constituyen la principal fuente energética para algunos tejidos. También pueden ser almacenados como lípidos simples (triacilglicéridos) o incorporados en lípidos complejos que pueden jugar un rol estructural como principal componente de las membranas biológicas o formar parte de cascadas de señales de transducción específicas (Meldrum y col., 1991). Asimismo, los ácidos grasos fuera de la célula pueden desencadenar respuestas biológicas a través de la unión a receptores en la membrana plasmática (Hara y col., 2014) o alternativamente dentro de la célula pueden actuar modificando la transcripción génica al unirse a factores de transcripción ligando dependientes (Neels y Grimaldi, 2014). Por otro lado, un exceso de ácidos grasos dentro de la célula puede ejercer efectos nocivos y provocar un severo daño celular, fundamentalmente debido a sus propiedades hidrofóbicas (Corpeleijn y col., 2008; Katz y Messineo, 1981; Wang y col., 2009). Es por esta razón que el metabolismo de los ácidos grasos debe ser finamente regulado con el objeto de mantener los niveles intracelulares adecuados. Tal metabolismo incluye la incorporación de los ácidos



grasos a lípidos más complejos o su degradación con la consiguiente obtención de energía para la célula. En los siguientes párrafos se resumen muy brevemente las tres etapas esenciales para la utilización de los ácidos grasos como fuente de energía.

### 1) Transporte de ácidos grasos a través de la membrana plasmática

Los ácidos grasos son almacenados como lípidos neutros en el tejido adiposo, son liberados por la acción de lipasas y viajan en la circulación sanguínea unidos a albúmina. Si bien debido a su hidrofobicidad estos ácidos grasos pueden ingresar a la célula por difusión simple a través de la membrana plasmática, hoy se sabe que la mayor parte del ingreso de los ácidos grasos al interior celular es mediado por un transporte facilitado sin gasto de energía. Se han descrito hasta el momento tres tipos de proteínas de membrana que facilitan la entrada de los mismos: 1) la proteína de unión a ácidos grasos de la membrana plasmática (FABPpm), proteína periférica de membrana de distribución ubicua (Stremmel y col., 1985; Roepstorff y col., 2004; Dutta-Roy, 2009), 2) la familia de proteínas de transporte de ácidos grasos (FATP1-6), proteínas transmembrana que poseen en su porción citoplasmática actividad enzimática de acil-CoA sintasa y que presenta una distribución tejido específica (Glatz y col., 2010) y 3) la proteína transmembrana CD36, proteína translocasa de ácidos grasos (FAT/CD36).

En particular FAT/CD36 es una glicoproteína de 88 kDa, perteneciente a la familia de receptores *scavengers* de clase B que, además de transportar ácidos grasos, posee múltiples funciones entre las cuales se encuentran su capacidad de unir lipoproteínas de baja densidad (LDL) y fosfolípidos aniónicos, así como su capacidad de facilitar la fagocitosis de células apoptóticas y de cuerpos residuales (Kazantzis y Stahl, 2012; Silverstein y Febbraio, 2009; Glatz y col., 2010; Degrace-Passilly y Besnard, 2012). Se postula que el mecanismo por el cual el FAT/CD36 facilita la entrada de los ácidos grasos a la célula involucra un secuestro de los mismos en la membrana plasmática, desde donde posteriormente hacen su entrada a la célula por difusión simple. Como se mencionó previamente, se ha demostrado la presencia de FAT/CD36 en la célula de Sertoli y se ha

postulado su participación en la fagocitosis de células germinales apoptóticas y de cuerpos residuales (Kawasaki y col., 2002; Gillot y col., 2005).

## **2) Activación de ácidos grasos**

La activación de los ácidos grasos es el primer paso de todas las vías metabólicas en las que estos participan y se lleva a cabo por la esterificación de los mismos con la coenzima A (CoA) formando el acil-CoA correspondiente. Al respecto, la porción citoplasmática de la proteína transmembrana FAT/CD36 actúa como proteína de anclaje de las proteínas de unión de ácidos grasos citoplasmática (FABPc), encargadas del transporte intracelular del ácido graso, y de enzimas como las acil-CoA sintasas de cadena larga encargadas de la activación del ácido graso (Glatz y col., 2010). El acil-CoA resultante se une a las proteínas que unen acil-CoAs (ACBP) o a las FABPc, proteínas que además de unir ácidos grasos, también tienen capacidad de unir el ácido graso activado (Storch y Corsico, 2008). En el caso de las FATPs, la actividad acil-CoA sintasa de este transportador convierte al ácido graso directamente en su acil-CoA correspondiente. La acción facilitadora de las FATPs en la entrada de ácidos grasos se la conoce como “acilación vectorial” es decir, el transporte de ácidos grasos a través de la membrana está acoplado a la esterificación. Este proceso permite a la célula un medio eficiente para el rápido metabolismo de los ácidos grasos que se captan y contribuye a disminuir la concentración intracelular de ácidos grasos libres lo cual favorece su transporte (Kazantzis y Stahl, 2012).

## **3) Oxidación de ácidos grasos en la mitocondria**

La oxidación de los ácidos grasos puede realizarse por medio de distintos caminos catabólicos entre los que se encuentran la  $\beta$ -oxidación en el peroxisoma y en la mitocondria y la  $\omega$ -oxidación en el retículo endoplasmático. La  $\beta$ -oxidación es un proceso por el cual se remueven fragmentos de dos carbonos desde el extremo carboxílico de la cadena carbonada del acil-CoA, formando acetil-CoA, NADH y FADH<sub>2</sub>. Los ácidos grasos de cadena

muy larga (más de 22 carbonos) se metabolizan inicialmente por  $\beta$ -oxidación en el peroxisoma donde se obtienen acil-CoAs más cortos que son transportados hacia la mitocondria para continuar su oxidación. Para que ocurra la  $\beta$ -oxidación mitocondrial, el acil-CoA debe ingresar a la matriz mitocondrial donde se encuentran todas las enzimas responsables de este proceso catabólico. La membrana interna mitocondrial es impermeable a los acil-CoA de cadena larga, por lo que existe un mecanismo de translocación específico. El proceso se lleva a cabo por la acción coordinada de tres enzimas: las carnitina palmitoil transferasas I y II (CPT1 y CPT2) y la translocasa. En primer lugar, la CPT1 cataliza la transferencia del grupo acilo del acil-CoA a la carnitina, generando por un lado CoA libre en el citoplasma y por el otro acilcarnitina en el espacio intermembrana. En segundo lugar, la acilcarnitina es transportada desde el espacio intermembrana a la matriz mitocondrial por el intercambiador acilcarnitina-carnitina denominado translocasa. En tercer lugar, la CPT2 cataliza la reacción de transferencia del grupo acilo desde la carnitina a la CoA, regenerando carnitina libre y el acil-CoA libre en la matriz mitocondrial. Cabe mencionar que este transporte del acil-CoA desde el citoplasma a la matriz mitocondrial constituye el paso limitante de la  $\beta$ -oxidación. Entre los componentes responsables de la translocación de los acil-CoA, la enzima CPT1 es aquella que posee la regulación más exquisita. Presenta por un lado regulación alostérica negativa por malonil-CoA –intermediario de la biosíntesis de ácidos grasos– y además regulación de su expresión en casos de alta demanda metabólica (Brandt y col., 1998).

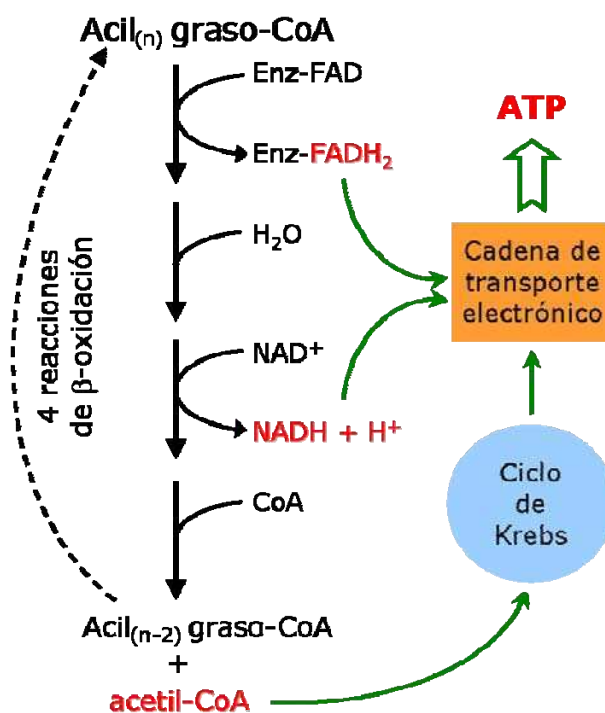
Una vez dentro de la matriz mitocondrial el acil-CoA sufre el proceso de  $\beta$ -oxidación. Dicho proceso está compuesto por una repetición de cuatro etapas sucesivas catalizadas por enzimas específicas y luego de las cuales se obtiene una molécula de  $\text{FADH}_2$ , una de NADH, una de acetil-CoA y una de acil-CoA con dos carbonos menos que la original. Por ejemplo, en el caso de ácidos grasos saturados de cadena par, este proceso de cuatro etapas se repetirá  $(n/2)-1$  veces (siendo  $n$  el número de carbonos del acil-CoA inicial). A continuación, se hace una breve descripción de las cuatro etapas involucradas en la  $\beta$ -oxidación mitocondrial:

- *Oxidación del acil-CoA.* La primera etapa es catalizada por las acil-CoA deshidrogenasas, una serie de flavoproteínas con especificidad de longitud de cadena. Estas enzimas catalizan la reacción de  $\alpha$ - $\beta$ -deshidrogenización del acil-CoA específico (Ghisla y Thorpe, 2004), utilizando como aceptor de electrones el FAD y donde se obtiene como productos un trans- $\Delta^2$ -enoil-CoA y una molécula de FADH<sub>2</sub>. Existen cuatro acil-CoA deshidrogenasas que se clasifican de acuerdo a la longitud de la cadena del ácido graso que utilizan como sustrato: la acil-CoA deshidrogenasa de cadena muy larga (VLCAD), la acil-CoA deshidrogenasa de cadena larga (LCAD), la acil-CoA deshidrogenasa de cadena media (MCAD) y la acil-CoA deshidrogenasa de cadena corta (SCAD) (Ghisla y Thorpe, 2004). Se ha descrito que estas enzimas son reguladas transcripcionalmente en situaciones metabólicas en las cuales se necesita una mayor capacidad oxidativa (Wang y col., 2003).
- *Hidratación del trans- $\Delta^2$ -enoil-CoA.* La segunda etapa es catalizada por la enoil-CoA hidratasa y promueve la incorporación de una molécula de agua entre el carbono  $\alpha$  y el carbono  $\beta$  del trans- $\Delta^2$ -enoil-CoA dando como producto el L-3-hidroxiacil-CoA.
- *Oxidación del L-3-hidroxiacil-CoA.* La tercera etapa es catalizada por L-3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa, utiliza el NAD<sup>+</sup> como aceptor de electrones y en ella se lleva a cabo la oxidación del grupo hidroxilo del carbono  $\beta$  del L-3-hidroxiacil-CoA para obtener como productos 3-cetoacil-CoA y una molécula de NADH.
- *Tiólisis.* La cuarta y última etapa de la  $\beta$ -oxidación es catalizada por la enzima  $\beta$ -cetotiolasa. En esta etapa se escinde el 3-cetoacil-CoA en una molécula de acetil-CoA y una molécula de acil-CoA con dos átomos de carbono menos que la inicial.

Estas cuatro etapas se repetirán sucesivamente con los acil-CoA resultantes hasta obtener todos los acetil-CoA que la molécula de acil-CoA inicial permita.

Las moléculas de acetil-CoA ingresan al ciclo de Krebs, generando equivalentes de reducción (NADH y  $\text{FADH}_2$ ), los cuales, junto con los obtenidos en la  $\beta$ -oxidación, serán reoxidados en la cadena de transporte de electrones. Este proceso de reoxidación genera energía libre que es utilizada para transportar protones desde la matriz mitocondrial al espacio intermembrana. Por este mecanismo se genera un gradiente electroquímico de protones que cuando se disipa por el retorno de los mismos a la matriz mitocondrial genera una gran cantidad de energía libre que es utilizada para la síntesis de ATP. Este último proceso es catalizado por el complejo ATP sintasa que produce ATP cuando los protones fluyen a través del mismo.

La figura 3 muestra un esquema de las cuatro etapas de la  $\beta$ -oxidación mitocondrial y su acople con el ciclo de Krebs y la cadena de transporte de electrones que da como resultado la generación de ATP.



**Figura 3.** Esquema de las cuatro etapas sucesivas de la  $\beta$ -oxidación mitocondrial, acoplada al ciclo de Krebs y la cadena de transporte de electrones para la generación de ATP. Tomado de: <http://biomodel.uah.es/model2/lip/acgr-b-oxidacion.htm>.

El siguiente párrafo resume lo que se conoce hasta el momento con respecto a la expresión de las enzimas involucradas en la oxidación mitocondrial de ácidos grasos en el testículo. Adam y colaboradores (1998) demostraron la presencia de las dos isoformas de CPT1 (M y L) en testículo, siendo la isoforma L la que se expresa en células de Sertoli. Cabe mencionar que esta isoforma presenta propiedades cinéticas que favorecen la oxidación de ácidos grasos –es menos sensible a la inhibición por malonil-CoA– y predomina en células que utilizan ácidos grasos como fuente de energía. Por otro lado, Fukasawa y colaboradores (2010) analizaron en testículo de rata adulta, mediante la técnica de inmunofluorescencia, la presencia y localización de las enzimas involucradas en la oxidación mitocondrial de ácidos grasos en el tejido intersticial y en el epitelio seminífero. Estos autores observaron la presencia de la batería completa de enzimas de la  $\beta$ -oxidación mitocondrial en las células de Sertoli y asimismo que la mayoría de estas enzimas están ausentes o presentes en muy baja cantidad en células germinales. Basados en sus observaciones y en los antecedentes de la literatura, los autores postularon que probablemente la oxidación de ácidos grasos mitocondrial es un camino metabólico importante en las células de Sertoli.

## **REGULACIÓN DE LA OXIDACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS POR RECEPTORES ACTIVADOS POR PROLIFERADORES DE PEROXISOMAS**

La regulación del metabolismo de ácidos grasos es fundamental para asegurar un correcto balance energético. Entre los factores de transcripción que regulan la expresión de genes relacionados con el metabolismo de ácidos grasos se encuentran los receptores activados por proliferadores de peroxisomas (*peroxisome proliferator activated receptors*, PPARs). Se trata de receptores ligando dependiente que pertenecen a la superfamilia de receptores nucleares. Dentro de esta superfamilia se encuentran, además de los PPARs, los receptores de hormonas esteroideas, de hormonas tiroideas, entre otros. Todos los receptores nucleares presentan dominios característicos: 1) la región amino terminal, llamada dominio A/B, que contiene clásicamente una función de transactivación

independiente de ligando (AF-1) y que en el caso de los PPARs dicha función es débil o casi inexistente, 2) la región central o región C, que es la región implicada en la unión a secuencias específicas en el ADN denominadas elementos de respuesta que en el caso de los PPARs se denomina elemento de respuesta a PPARs (PPRE) y 3) la región carboxilo terminal, que contiene el dominio de unión a ligando (*ligand binding domain*, LBD), el dominio de heterodimerización y el dominio de transactivación dependiente de ligando (AF-2). En particular en los PPARs, estudios de cristalografía de rayos X demostraron que el LBD es más grande y más hidrofóbico que en el resto de los receptores nucleares, lo cual explicaría la capacidad de unir una gran cantidad de ligandos hidrofóbicos naturales y sintéticos. Por otro lado, se ha observado que el dominio de heterodimerización de PPARs es específico para el receptor de ácido retinoico X (RXR) (Dowell y col., 1999; Uppenberg y col., 1998; Xu y col., 1999).

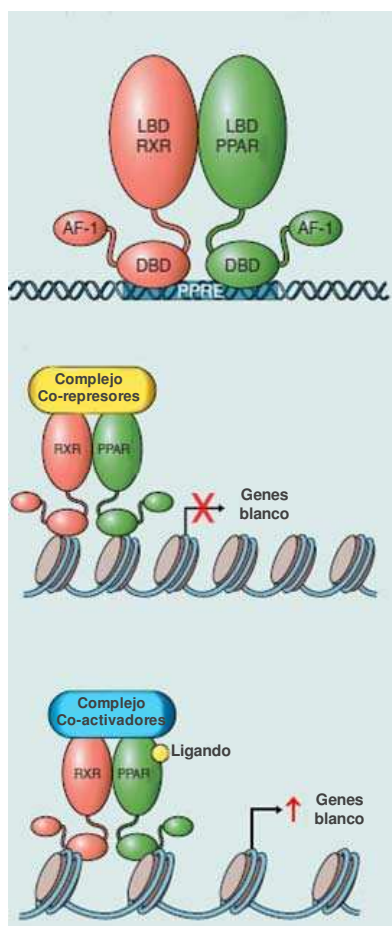
Si bien los PPARs fueron inicialmente relacionados con la proliferación de peroxisomas y de allí su nombre, se descubrió más tarde que juegan un papel esencial tanto en el catabolismo como en el anabolismo de ácidos grasos. Existen tres isoformas de PPARs, PPAR  $\alpha$  (NR1C1), PPAR  $\beta/\delta$  (NR1C2) y PPAR  $\gamma$  (NR1C3) que se encuentran codificadas por tres genes distintos, localizados en cromosomas diferentes (Neels y Grimaldi, 2014).

Aunque los ligandos endógenos de cada una de las isoformas de PPARs no se conocen totalmente, se acepta que los ácidos grasos saturados e insaturados y ciertas moléculas derivadas de ácidos grasos son capaces de activar a los PPARs (Forman y col., 1997; Xu y col., 1999). Existe una gran cantidad de ligandos que son comunes a todas las isoformas, sin embargo, algunos ligandos son específicos para cada PPAR. En particular, el leucotrieno B<sub>4</sub>, la oleiletanolamina y la glicerofosfatidilcolina son ligandos específicos del PPAR  $\alpha$  (Devchand y col., 1996; Fu y col., 2003; Chakravarthy y col., 2009), derivados del ácido araquidónico como el 15-hidroxi-eicosatetraenoico y productos de lipoperoxidación como el 4-hidroxinonenal, el 4-hidroxiperoxinonenal y el 4-hidroxiperoxinonenal hidroxidodeca-(2E, 6Z)-dienal, como así también la prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) derivada de la

reacción catalizada por la ciclo-oxigenasa 2, son ligandos específicos del PPAR  $\beta/\delta$  (Lim y col., 1999; Coleman y col., 2007; Naruhn y col., 2010; Riahi y col., 2010), mientras que la prostaglandina  $J_2$  (PG $J_2$ ) es un potente activador del PPAR  $\gamma$  (Fajas y col., 2001).

En ausencia de ligando el heterodímero PPAR:RXR se encuentra unido al ADN interaccionando con co-represores de la transcripción, tales como el silenciador del receptor de ácido retinoico y hormona tiroidea (SMRT), el co-represor de receptores nucleares (N-CoR) y la proteína de interacción con el receptor 140 (RIP140), entre otros. Estos co-represores reclutan enzimas con actividad histonas deacetilasas (HDAC) que inhiben el ensamblaje de la maquinaria de transcripción (Krogdram y col., 2002; Guan y col., 2005; Seth y col., 2007). En presencia de ligando, el heterodímero PPAR:RXR sufre un cambio conformacional provocando la liberación de los co-represores y el reclutamiento de co-activadores, tales como el co-activador de la familia del receptor de esteroides (SRC 1-3) y el co-activador  $1\alpha$  del PPAR  $\gamma$  (PGC $1\alpha$ ), entre otros. Estos co-activadores permiten el reclutamiento de la maquinaria de transcripción (Wang y col., 2003; Lim y col., 2004; Guan y col., 2005). Con respecto al acceso de los ligandos a su receptor nuclear, se sabe que los ácidos grasos y/o derivados del metabolismo celular se unen y son transportados por las FABPs al núcleo (Helledie y col., 2000; McIntosh y col., 2009; Storey y col., 2012). Adicionalmente, se ha demostrado que ciertas isoformas de FABPs translocan al núcleo e interaccionan de manera específica con alguna de las isoformas de PPARs y de esta manera promueven su transactivación mediante una entrega específica del ligando *in situ* (Tan y col., 2002; Huang y col., 2004; Adida y Spener, 2006). La figura 4 muestra un esquema general de la regulación transcripcional por PPARs en ausencia y presencia de ligando.





**Figura 4.** Esquema general del mecanismo de acción de los PPARs en ausencia y presencia de ligando. Se puede observar: el dominio de transactivación (AF-1), el dominio de unión al ADN (DBD), el dominio de unión a ligando (LBD), la heterodimerización con RXR y la interacción con co-represores o co-activadores en ausencia y presencia de ligando, respectivamente. Tomado y modificado de: Neels y Grimaldi (2014).

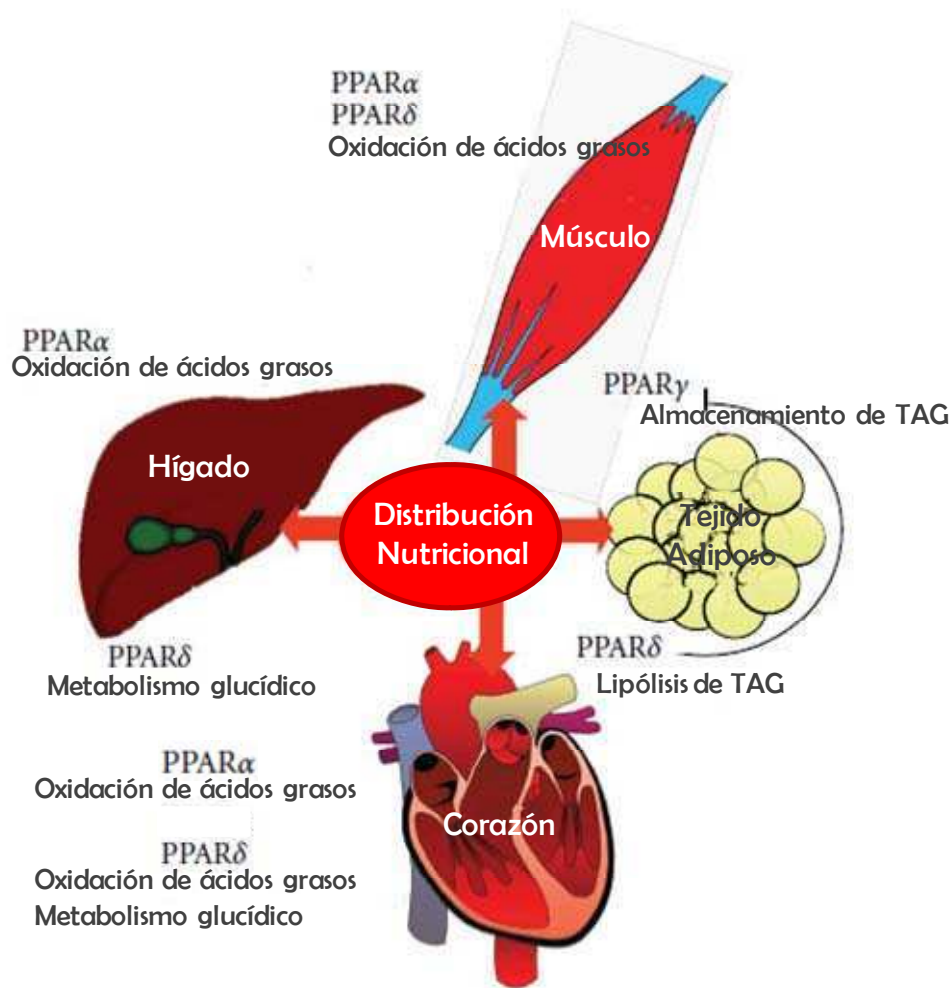
Las tres isoformas de PPARs presentan una distribución tejido específica, lo que hace predecir funciones definidas para cada una de ellas. El PPAR  $\gamma$ , se expresa predominantemente en tejido adiposo y en sistema inmune. Existen dos variantes, el PPAR  $\gamma 1$  y el PPAR  $\gamma 2$  las cuales se originan a partir de dos sitios distintos de iniciación de la transcripción del mismo gen (Fajas y col., 1997). Se lo considera el factor de transcripción que dirige y regula la diferenciación de adipocitos, la síntesis de lípidos y es en general el PPAR que ha sido relacionado con los procesos anabólicos (He y col., 2003).

El PPAR  $\alpha$ , expresado mayoritariamente en hígado, músculo esquelético y cardíaco, es capaz de regular genes relacionados con la oxidación de ácidos grasos tales como CPT1, LCAD y MCAD en dichos tejidos (Gulick y col., 1994; Mandard y col., 2004). Por lo

tanto, se lo considera uno de los factores de transcripción relacionados con procesos catabólicos.

Por último el PPAR  $\beta/\delta$  es de expresión ubicua y es considerado el PPAR más versátil de los tres en cuanto a su función. Los primeros estudios sobre el PPAR  $\beta/\delta$  mostraron la capacidad del receptor para regular la utilización de ácidos grasos como fuente de energía (Muoio y col., 2002). Al respecto, se ha observado que en una línea celular de mioblastos y en cultivos primarios de músculo esquelético, la activación del PPAR  $\beta/\delta$  con agonistas específicos aumenta la expresión de genes relacionados con el transporte y metabolismo de ácidos grasos tales como FAT/CD36, FABP, acil-CoA sintasa, CPT1, MCAD (Neels y Grimaldi, 2014). Por otro lado, Tanaka y colaboradores (2003) demostraron que en ratones tratados con un agonista farmacológico de PPAR  $\beta/\delta$  aumenta la oxidación de ácido palmítico en el músculo esquelético, mientras que la misma no se modifica en el hígado. Estudios más recientes, ubican al PPAR  $\beta/\delta$  en el eje de la regulación metabólica, ya que regula distintos caminos dependiendo del tejido y del estado metabólico del organismo. Por ejemplo, se observó que la activación del PPAR  $\beta/\delta$  tiene la capacidad de disminuir la hiperglucemia promoviendo un aumento en la actividad de la vía de las pentosas. Dicho aumento genera un aumento del flujo glucolítico y estimula la síntesis *de novo* de ácidos grasos en hígado que serán utilizados como fuente de energía por el tejido muscular (Lee y col., 2006). Por otro lado, en ratones que sobre-expresan PPAR  $\beta/\delta$  o en ratones salvajes tratados con agonista de PPAR  $\beta/\delta$  se observó una regulación positiva de la oxidación de ácidos grasos y simultáneamente un aumento en el flujo glucolítico en músculo cardíaco (Burkart y col., 2007).

La figura 5, muestra un esquema que resume las acciones metabólicas de las tres isoformas PPARs en distintos tejidos: músculo esquelético, músculo cardíaco, tejido adiposo e hígado (Moreno y col., 2010).



**Figura 5.** Resumen de las acciones metabólicas de los PPARs en los distintos tejidos: hígado, músculo, tejido adiposo y corazón. Tomado y modificado de Moreno y colaboradores (2010).

En el testículo, se ha observado una marcada expresión de PPAR  $\beta/\delta$  cuando se la compara con la expresión de PPAR  $\alpha$  que es sumamente débil. La expresión de ambos PPARs parece estar mayoritariamente localizada en la célula de Sertoli (Braissant y col., 1996). Thomas y colaboradores (2011), demostraron la existencia de un patrón de expresión de los tres PPARs en las células de Sertoli que varía con la edad de la rata. En este trabajo se sugiere un importante rol fisiológico de estos factores de transcripción para el normal desarrollo de la espermatogénesis.

En resumen, los estudios existentes acerca del metabolismo energético de la célula de Sertoli indican que la glucólisis estaría mayoritariamente reservada a la producción de lactato para el mantenimiento de las células germinales, mientras que la oxidación de ácidos

grasos estaría principalmente destinada a la obtención de ATP para cubrir las propias demandas energéticas de la célula de Sertoli.

De todo lo expuesto se desprende que el estudio de los mecanismos moleculares que participan en la producción de lactato y en la oxidación de ácidos grasos, así como su regulación hormonal, contribuirá al entendimiento de la regulación del metabolismo energético de la célula de Sertoli, fundamental para un normal desarrollo de la espermatogénesis.

## OBJETIVOS

La célula de Sertoli es la encargada de nutrir a las células germinales en desarrollo e indudablemente debe adecuarse a los requerimientos energéticos del epitelio germinal mientras que satisface sus propias necesidades energéticas. Sin lugar a dudas la producción de lactato y la oxidación de ácidos grasos están asociadas respectivamente a las necesidades energéticas antes mencionadas y puede suponerse una regulación coordinada de ambos procesos.

El objetivo general del presente trabajo de tesis fue estudiar los mecanismos moleculares que intervienen en la regulación del metabolismo energético del túbulo seminífero.

Los objetivos específicos fueron los siguientes:

- I. Evaluar la participación de receptores nucleares de la familia de los PPARs, tanto en el metabolismo de ácidos grasos como en la producción de lactato en la célula de Sertoli.
- II. Evaluar posibles mecanismos fisiológicos que podrían conducir a la activación de los PPARs en el túbulo seminífero.
- III. Determinar si existe regulación hormonal de la oxidación de ácidos grasos y evaluar la participación de los PPARs en dicha regulación y en la producción de lactato.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### MATERIALES

Los activadores farmacológicos de PPARs, WY14643 y GW0742, el antagonista de PPAR  $\beta/\delta$ , GSK3787, y el ácido palmítico libre de albúmina de suero bovino (BSA) fueron provistos por Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, EE.UU.). El bFGF humano recombinante fue provisto por Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). La FSH ovina (NIH-oFSH-S-16) se obtuvo del National Hormone and Pituitary Program, NIADDK (Bethesda, MA, EE.UU.). El anticuerpo anti-Phospho-Piruvate Dehidrogenase-E1 $\alpha$  (Ser293) (P-PDC) fue adquirido de Novus Biologicals (Littleton, CO, EE.UU.) y el anticuerpo anti-Akt total (T-Akt) fue adquirido de Cell Signaling Technology, Inc. (Denver, MA, EE.UU.). Los cebadores para la determinación de ARNm por PCR cuantitativa fueron adquiridos de Eurofines MWG Operon (Huntsville, AL, EE.UU.). La sonda para la detección de ARNm de la subunidad A de LDH (LDH A) fue gentilmente cedida por el Dr. Jugman (Northwestern University Medical School, Chicago, IL, EE.UU.). Los compuestos radiactivos [2,6- $^3\text{H}$ ]-2-deoxi-D-glucosa (2-DOG), desoxi-5' citidina trifosfato marcada con  $^{32}\text{P}$  en el grupo fosfato  $\alpha$  ( $\alpha$ - $^{32}\text{P}$  dCTP) y [9,10- $^3\text{H}(\text{N})$ ]-ácido palmítico fueron provisto por New England Nuclear Co. (Boston, MA, EE.UU.). Los medios de cultivo y todos los demás reactivos fueron adquiridos de Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, EE.UU.). Los animales fueron provistos por el bioterio del Instituto de Biología y Medicina Experimental (Buenos Aires, Argentina). Los animales fueron manipulados de acuerdo a las recomendaciones del Instituto Nacional de la Salud de Estados Unidos (NIH).

### MÉTODOS

#### 1) Aislamiento y cultivo de células de Sertoli

Las células de Sertoli fueron aisladas de testículos de ratas Sprague-Dawley de 20 días de edad. Los animales fueron sacrificados por asfixia con  $\text{CO}_2$ . Los testículos fueron

extraídos en condiciones de esterilidad. Todo el procedimiento posterior fue realizado bajo flujo laminar, en solución salina balanceada de Hank's (HBSS, pH 7,4). Para el aislamiento de células de Sertoli se utilizó la técnica descrita por Meroni y colaboradores (2002). Los testículos fueron decapsulados y sometidos a un tratamiento enzimático con colagenasa 1 mg/ml en presencia de inhibidor de tripsina de soja 0,006% P/V en HBSS por 5 minutos a temperatura ambiente para liberar las células intersticiales. La acción de la colagenasa fue detenida por dilución con 4 volúmenes de HBSS. Los túbulos seminíferos obtenidos por sedimentación fueron lavados dos veces con HBSS, colocados en una placa de Petri y cortados con una hoja filosa. Los túbulos seminíferos cortados finamente fueron tratados con una solución de glicina 1 M - EDTA 2 mM en PBS (buffer fosfato 0,1 M pH 7,4, NaCl 8 g/l, KCl 0,2 g/l) en presencia de 0,03 mg/ml de deoxirribonucleasa por 10 minutos, tratamiento que permite eliminar las células peritubulares. Dicho tratamiento fue detenido por dilución con 10 volúmenes de HBSS. Los fragmentos de túbulos seminíferos obtenidos luego de una sedimentación por 30 minutos fueron tratados nuevamente con colagenasa e inhibidor de tripsina de soja en las mismas concentraciones utilizadas anteriormente. La acción de la colagenasa se detuvo por dilución y los agregados de células de Sertoli fueron recuperados por centrifugación a 200xg durante 3 minutos y lavados dos veces con HBSS. Los agregados de células de Sertoli fueron purificados por sedimentación durante 10 minutos. Los agregados de células de Sertoli fueron resuspendidos en medio químicamente definido compuesto por una mezcla 1:1 de solución nutritiva de Ham F12 y medio de Eagle modificado por Dulbecco (F12:DMEM) suplementado con Hepes 20 mM, bicarbonato de sodio 1,2 mg/ml, transferrina 10 µg/ml, vitamina E 5 µg/ml, hidrocortisona 4 ng/ml, penicilina 100 UI/ml, anfotericina B 2,5 µg/ml (medio completo) e insulina 5 µg/ml. Los agregados de células de Sertoli fueron filtrados por malla fina (Sefar Nylon Mesh Lab Pak, 50 Microns Square Opening) y se recolectaron por centrifugación a 200xg durante 3 minutos. Finalmente los agregados de células de Sertoli fueron resuspendidos en medio completo con insulina y sembrados en placas de cultivo de 6, 24 y 96 pozos a una densidad de 5 µg ADN/cm<sup>2</sup>. Las células fueron cultivadas en estufa humidificada a 34 °C en atmósfera de CO<sub>2</sub>

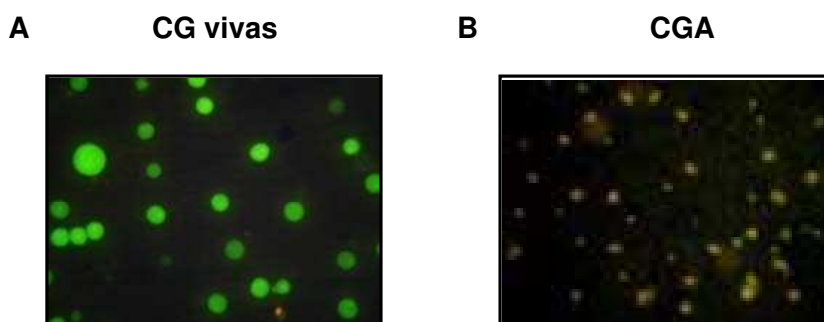
5%:aire 95%. Las células se dejaron adherir por 48 horas en las condiciones descritas y luego se reemplazó el medio por medio completo.

## **2) Aislamiento de células germinales y preparación de células germinales apoptóticas**

Las células germinales fueron aisladas a partir de testículos de ratas Sprague-Dawley de 30 días de edad, de acuerdo a la técnica previamente descrita por Schteingart y colaboradores (1989). Los animales fueron sacrificados por asfixia con CO<sub>2</sub>. Los testículos fueron extraídos en condiciones de esterilidad. Todo el procedimiento posterior fue realizado bajo flujo laminar, en solución salina balanceada de Hank's (HBSS, pH 7,4). Los testículos fueron decapsulados y sometidos a un tratamiento enzimático con colagenasa 1 mg/ml en presencia de inhibidor de tripsina de soja 0,006% P/V en HBSS por 5 minutos a temperatura ambiente. La acción de la colagenasa fue detenida por dilución con 4 volúmenes de HBSS. Los túbulos seminíferos obtenidos por sedimentación fueron lavados dos veces con HBSS, colocados en una placa de Petri y cortados con una hoja filosa. Posteriormente los túbulos seminíferos cortados finamente fueron sometidos a un tratamiento con colagenasa 0,5 mg/ml, inhibidor de tripsina de soja 0,003% P/V y desoxirribonucleasa 0,003% P/V en HBSS por 15 minutos. La acción de la colagenasa fue detenida por dilución y los agregados grandes de células de Sertoli fueron eliminados por sedimentación por 5 minutos. El sobrenadante resultante, conteniendo las células germinales y agregados muy pequeños de células de Sertoli, fue depositado sobre un volumen adecuado de solución de BSA 2% P/V en HSSB para obtener una concentración final de BSA 0,2% P/V. Los agregados muy pequeños de células de Sertoli fueron eliminados por sedimentación por 10 minutos. Las células germinales presentes en el sobrenadante fueron colectadas por centrifugación a 400xg por 3 minutos a 4°C y lavadas dos veces con HBSS conteniendo BSA 0,2% P/V y desoxirribonucleasa 0.003% P/V. Las células germinales colectadas por centrifugación fueron resuspendidas en un volumen adecuado de medio F12:DMEM y sembradas sobre un gradiente de densidad discontinuo de Percoll de 4 capas (20%, 25%, 32%, 37%). El



gradiente fue centrifugado a 800xg por 30 minutos a 4°C. Las células presentes en las interfaces 32-37% y 25-32% fueron recolectadas y lavadas con medio F12:DMEM para remover el Percoll. Las células germinales colectadas por centrifugación fueron resuspendidas en un volumen adecuado de medio completo con insulina y sembradas a una densidad de  $4 \times 10^5$  células/cm<sup>2</sup> en frascos de cultivo e incubadas en estufa humidificada por 18 horas a 34°C en atmósfera CO<sub>2</sub> 5%:aire 95%. Durante este período de incubación las escasas células de Sertoli contaminantes se adhieren al plástico mientras que las células germinales permanecen en suspensión. Las células germinales fueron colectadas por remoción suave del medio y posterior centrifugación a 400xg por 5 minutos a 4°C. Las células germinales purificadas fueron resuspendidas en un volumen adecuado de medio completo y sembradas en placas de 6 pozos a una densidad de  $5 \times 10^5$ /cm<sup>2</sup> e incubadas en estufa humidificada a 34°C en atmósfera CO<sub>2</sub> 5%:aire 95% durante 48 horas, período en el cual se produce la apoptosis espontánea de las mismas (Xiong y col., 2009). Finalizado el período de incubación las células germinales apoptóticas (CGA) fueron recogidas por centrifugación a 400xg por 5 minutos y resuspendidas en un volumen adecuado de medio completo. Como control de viabilidad de las células germinales obtenidas, se realizó un análisis de las mismas antes y después de la apoptosis espontánea mediante la tinción con Naranja de Acridina/Bromuro de Etidio 4 µg/ml (1:1). El naranja de acridina se intercala entre las bases de ADN de las células viables dando un color verde, mientras que el bromuro de etidio se intercala entre las bases de ADN en las células no viables dando un color amarillo/naranja. La figura 1 muestra una microfotografía de células germinales antes (figura 1A) y después (figura 1B) de la apoptosis espontánea.

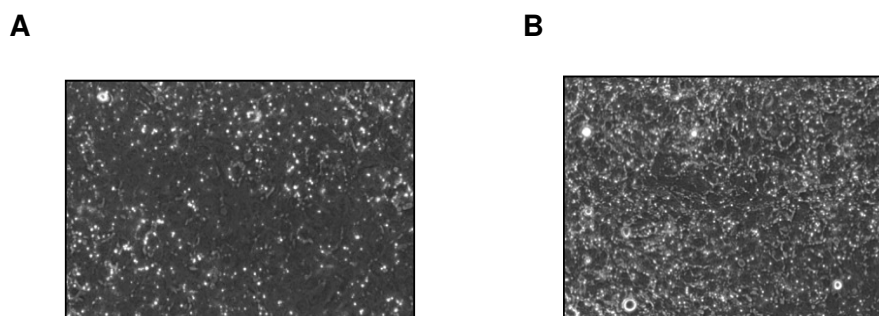


**Figura 1. Apoptosis espontánea de células germinales en cultivo**

Se realizó la tinción de naranja de acridina y bromuro de etidio. **(A)** células germinales (CG vivas) inmediatamente luego de ser aisladas y purificadas **(B)** células germinales luego de 48 horas de cultivo, período en el cual realizan la apoptosis espontánea (CGA), (X100).

### 3) Cocultivos de células de Sertoli con células germinales apoptóticas

Para realizar cocultivos de células de Sertoli con CGA se utilizaron monocapas de células de Sertoli luego de 48 horas de cultivo sobre las cuales fueron depositadas las CGA en una relación  $1 \times 10^6$ CGA/ $1 \times 10^6$ células de Sertoli (1:1). Los cocultivos fueron incubados en estufa humidificada a 34°C en atmosfera de CO<sub>2</sub> 5%:aire 95% por 24 ó 48 horas. Finalizado el período de cocultivo, las CGA fueron removidas por aspiración y todas las monocapas de células de Sertoli fueron tratadas por 2 minutos con buffer Tris 20 mM, pH 7,4 (tratamiento hipotónico) y posteriormente lavadas con medio de cultivo (Scheingart y col., 1989). A continuación, se realizó una evaluación microscópica de las mismas. La figura 2 muestra una monocapa de células de Sertoli en condiciones basales (figura 2A) y una monocapa de células de Sertoli cocultivada con CGA (figura 2B) –ambas monocapas recibieron tratamiento hipotónico. Se puede observar que el tratamiento hipotónico permite la obtención de una monocapa de células de Sertoli libres de CGA. Las monocapas de células de Sertoli libres de CGA fueron utilizadas para realizar los estudios correspondientes.



**Figura 2. Microfotografías en contraste de fase de la monocapa de células de Sertoli antes y después del cocultivo con CGA**

**(A)** Microfotografía de la monocapa de células de Sertoli tomada al día 5 de cultivo en condiciones basales. **(B)** microfotografía de la monocapa de células de Sertoli tomada al día 5 de cultivo luego de 48 horas de cocultivo con CGA (X100).

#### 4) Extracción de ARN total y síntesis de ADN copia

El ARN total fue extraído de las monocapas de células de Sertoli cultivadas en placas de 6 pozos utilizando Tri-Reagent (Sigma-Aldrich) de acuerdo a las especificaciones del proveedor. La cantidad de ARN obtenido en cada muestra fue determinado espectrofotométricamente a 260 nm y luego utilizado para la técnica de Northern blot o la síntesis de ADN copia (ADNc).

El ADNc fue sintetizado a partir de 2 µg de ARN total utilizando 125 ng de cebadores aleatorios *random primers*, 0,5 mM de la mezcla de dNTPs y la enzima transcriptasa reversa MMLV (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.) en un volumen final de 20 µl. Luego de la retrotranscripción, las muestras fueron diluidas hasta un volumen final de 40 µl.

#### 5) Determinación de los niveles de ARNm por PCR cuantitativa (RT-qPCR)

La RT-qPCR fue realizada utilizando el equipo *Step One Real Time PCR System* (Applied Biosystems, Warrington, RU). La mezcla de reacción fue preparada usando 12,5 µl de SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), 400 nM de los cebadores sentido y antisentido específicos, 4 µl de la dilución de ADNc de cada muestra en un volumen final de reacción de 25 µl. El programa de amplificación utilizado fue: desnaturalización inicial a 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de desnaturalización a 95°C por 15 segundos seguidos de una

hibridización y extensión a 60°C por 1 minuto. La fluorescencia fue medida al final de cada ciclo. Luego de la amplificación, la especificidad del producto de PCR obtenido fue determinada mediante una curva de fusión. Los datos fueron normalizados con  $\beta$ -actina o hipoxantina fosforibosiltransferasa 1 (HPRT1). En todos los ensayos se realizaron curvas estándar para confirmar una adecuada pendiente y eficiencia de amplificación, utilizando una muestra control. Se utilizó el método de curva estándar relativa para obtener los resultados que fueron expresados como veces de estímulo respecto del basal.

Los cebadores sentido y antisentido específicos de cada gen fueron diseñados utilizando el programa Vector NTI; se verificó que los pares de cebadores no formaran dímeros o estructuras secundarias y se evitaron las secuencias con una alta tasa de repetición de bases C y G en el extremo 3'. Asimismo, se tuvo en cuenta que los fragmentos amplificados tuvieran un tamaño entre 75 y 150 pares de bases, que estuviesen formados por regiones de más de un exón y que no formasen estructuras secundarias. Una vez seleccionados los pares de cebadores se verificó su especificidad utilizando el programa NCBI-PrimerBLAST y la amplificación de un único producto a través de la técnica de RT-PCR. En la Tabla 1 se muestran las secuencias de los cebadores diseñadas para cada gen analizado.

Tabla1. Cebadores específicos utilizados en RT-qPCR

	Cebadores
<b>FAT/CD36</b>	sentido: 5'-ACCAGGCCACATAGAAAGCA-3'
	antisentido: 5'-CACCAATAACGGCTCCAGTAA-3'
<b>LCAD</b>	sentido: 5'-AAAGGTCTGGGAGTGATTGG-3'
	antisentido: 5'-CCATTCTCCACCAAAAAGAGG-3'
<b>MCAD</b>	sentido: 5'-CGAGCACAACACACAAAACC-3'
	antisentido: 5'-TTCCTCTCTGGCAAACCTCC-3'
<b>GLUT1</b>	sentido 5'-GGAGTGTCGGTTTAGGTTGC-3'
	antisentido 5'-GCTGTGAAACGGAGAATGGA-3'
<b>MCT4</b>	sentido 5'-TGTGGTGAACCGCTTTGG-3'
	antisentido 5'-CAGACCCAAGCCAGTGATG-3'
<b>PDK1</b>	sentido 5'-TCCAGGGAGACCTAAAGCTG-3'
	antisentido 5'-CGTGGTTGGTTCTGTAATGC-3'
<b>PDK2</b>	sentido 5'-GACCCAGTCTCCAACCAGAAC-3'
	antisentido 5'-GGGATCAATGCTGCCAATGTG-3'
<b>PDK3</b>	sentido 5'-GTCGCCGCTCTCTATCAAAC-3'
	antisentido 5'-AGCCAGTCGCACAGGAAG-3'
<b>PDK4</b>	sentido 5'-CGAAGATGCCTTTGAGTGTG-3'
	antisentido 5'-TGGTGAAGGTGTGAAGGAAC-3'
<b>PDP1</b>	sentido 5'-ACAGGAGAATGTGTGTGTGTCC-3'
	antisentido 5'-TGGCATCAGAGAACAGTGGTAG-3'
<b>PDP2</b>	sentido 5'-AGAGGATTCGCCAGTGTC-3'
	antisentido 5'-AAGTGGAGGTGGAGTGTTC-3'
<b>β-ACTINA</b>	sentido: 5'-TGGCACCACACTTTCTACAAT-3'
	antisentido 5'-GGTACGACCAGAGGCATACA-3'
<b>HPRT1</b>	sentido 5'-AGTTCTTTGCTGACCTGCTG-3'
	antisentido 5'-TTTATGTCCCCCGTTGACTG-3'

Secuencias de cebadores sentido y antisentido específicos para cada gen utilizados en la técnica de RT-qPCR.

## 6) Determinación de los niveles de ARNm por Northern Blot

Para la separación de los ARN por electroforesis, se sembraron 10 µg de ARN total en geles de agarosa 1%-formaldehído 10% P/V. La corrida electroforética se realizó en buffer MOPS (MOPS 250 mM, acetato de sodio 10 mM, EDTA 50 mM, pH 7,0) por 4 horas a 80 Volts. Una vez finalizada la corrida, los ARN fueron transferidos por capilaridad con buffer 10x SSC (NaCl 1,5 M, citrato de Sodio 0,15 M, pH 7,4) a membranas de nylon (Hybond-N, Amersham Pharmacia Biotech, Buenos Aires, Argentina) durante toda la noche y fijados por luz ultravioleta (Stratalinker, Startagene Cloning Systems, La Jolla, CA, EE.UU.).

Las sondas de ADNc fueron marcadas con [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]deoxi-CTP (New England Nuclear Co) utilizando un kit comercial *Random-primed labeling kit* (Prime-a-Gene Labeling System, Promega Corporation, Madison, EE.UU.). Las sondas de ADNc utilizadas fueron las siguientes: para CPT1 (isoforma L), una sonda de 785b previamente obtenida mediante la técnica de RT-PCR con cebadores específicos (sentido: 5'-CACGAAGCCCTCAAACAGAT-3' y antisentido: 5'-AATGTGCGACGATACAGCAG-3'), para LDH A, un inserto del 3'UTR 0,4 kb de rata, Pst I-Bgl II (cedido por el Dr. Jungmann, Chicago, IL, EE.UU.) y para el 18S, un oligonucleótido de secuencia específica. La membranas fueron previamente prehibridizadas por 3 horas a 42°C en solución de hibridización (formamida desionizada 50% V/V, NaCl 0,75 M, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM pH 7.5, EDTA 1 mM, solución de Denhart 5x, dextran sulfato 10% P/V, SDS 0,5% P/V y ADN de esperma de salmón 100 µg/ml). La hibridización de la sonda se realizó toda la noche en la misma solución de hibridización a 42°C. Finalmente, las membranas fueron lavadas utilizando soluciones con astringencia diferencial dependiendo de la sonda. Los protocolos de lavado utilizados fueron los siguientes:

Para la sonda de CPT1:

-2 lavados por 10 minutos a temperatura ambiente con 2x SSC-SDS 0,1% P/V

-2 lavados por 15 minutos a 55°C con 1x SSC-SDS 0,1% P/V

-1 lavado por 5 minutos a temperatura ambiente con 2x SSC

Para la sonda de LDH A:

-2 lavados por 20 minutos a temperatura ambiente con 2x SSC-SDS 0,5% P/V

-2 lavados por 30 minutos a 65°C con 1x SSC-SDS 0,1% P/V

-1 lavado por 5 minutos a temperatura ambiente con 2x SSC

Para la sonda de 18S:

-2 lavados por 15 minutos a temperatura ambiente con 2x SSC-SDS 0,5% P/V

-2 lavados por 15 minutos a 65°C con 1x SSC-SDS 0,1% P/V

-1 lavado por 30 minutos a 55°C con 0,1x SSC-SDS 0,1% P/V

-1 lavado por 5 minutos a temperatura ambiente con 2x SSC

Posteriormente, cada membrana fue expuesta a películas radiográficas Amersham Hyperfilm™ ECL (Ge Healthcare Limited, Buckinghamshire, RU) a -70°C durante períodos variables de tiempo según la sonda (CPT1: 5 días; LDH A: 1 día; 18S: 1 hora).

Las autorradiografías obtenidas fueron escaneadas y la intensidad de las bandas fue estimada por densitometría utilizando el programa NIH Image (Scion Corporation, Frederick, MD, EE.UU.). Los niveles de 18S fueron utilizados como control de siembra de las distintas calles. Se calculó la relación entre los niveles de los ARNm y el 18S para cada condición experimental y los resultados fueron expresados como veces de estímulo con respecto al basal.

### **7) Determinación de los niveles de PDC fosforilado**

Las monocapas celulares cultivadas en placas de 6 pozos fueron lavadas con PBS (buffer fosfato 0,1 M, pH 7,4) y posteriormente levantadas por acción mecánica con 200 µl de buffer de lisis [PBS conteniendo fluoruro de fenilmetil sulfonilo 2 mM, cóctel de inhibidores de proteasas (Sigma-Aldrich) 1% V/V, NaF 1 mM, EGTA 1mM, EDTA 1 mM y ácido okadaico 50 nM] sobre baño de hielo. Las suspensiones celulares fueron homogenizadas por ultrasonido (Ultrasonic Cell Disruptor & Homogenizer SONIFIER™ 150, Branson Ultrasonics corporation, Danbury, CT, EE.UU.) y almacenadas a -70°C hasta su utilización.

Para la separación de proteínas por electroforesis, los extractos celulares fueron diluidos en una proporción 3:1 con buffer 4x Laemmli (Tris-HCl 0,25 M pH 6,8, SDS 8% P/V, glicerol 40% V/V, 2 $\beta$ -mercaptoetanol 8% V/V, azul de bromofenol 0,008% P/V), incubados por 5 minutos a 100°C y luego colocados inmediatamente en hielo. Las muestras fueron sembradas en un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes. El gel concentrador superior está formado por acrilamida/bisacrilamida 4,3% y el gel separador inferior está formado por acrilamida/bisacrilamida 10%. La electroforesis fue llevada a cabo en buffer de corrida (Tris 0,025 M, glicina 0,192 M, SDS 0,1% P/V, pH 8,3) en una celda Mini Protean 3 (Bio-Rad, Hercules, CA, EE.UU.) durante 30 minutos a 100 V seguidos de 30 minutos a 200 V. Finalizada la corrida electroforética los geles de poliacrilamida fueron equilibrados durante 10 minutos en buffer de transferencia (Tris 0,025 M, glicina 0,192 M, metanol 20% V/V, pH 8,3) y posteriormente electrotransferidos a membranas de difluoruro de polivinilideno (PVDF) a 100 V durante 1 hora en una celda Mini Protean 3 (Bio-Rad). Para la detección de las proteínas, las membranas fueron incubadas por 1 hora a temperatura ambiente con solución de bloqueo [buffer TBS (Tris 20 mM, NaCl 140 mM, pH 7,4) Tween-20 0,1% P/V, leche en polvo descremada 5% P/V]. Posteriormente, fueron lavadas 3 veces por 5 minutos cada vez con TBS, Tween-20 0,1% P/V (TBS-T) e incubadas durante toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario en una dilución 1/1000 en TBS-T, BSA 5% P/V. Los anticuerpos utilizados fueron: Phospho-Piruvate Dehidrogenase-E1 $\alpha$  (Ser293) (P-PDC) Novus Biologicals (Littleton, CO, EE.UU) y Total-Akt (T-Akt) Cell Signaling Technology (Boston, MA, EE.UU.).

Finalizada la incubación con el primer anticuerpo, las membranas fueron lavadas 3 veces por 5 minutos cada vez con TBS-T y posteriormente incubadas con el anticuerpo secundario anti-Inmunoglobulina de conejo conjugado con peroxidasa (Cell Signaling Technology, Boston, MA, EE.UU.) en una dilución 1/2000 en TBS-T con leche descremada 5% P/V por 1 hora a temperatura ambiente. Al finalizar la incubación, las membranas fueron lavadas 3 veces por 5 minutos cada vez con TBS-T y fueron reveladas por quimioluminiscencia utilizando los reactivos comerciales de Cell Signaling Technology



(Boston, MA, EE.UU.). Las autorradiografías fueron escaneadas y la intensidad de las bandas fue estimada por densitometría utilizando el programa NIH Image (Scion Corporation, Frederick, MD, EE.UU.). Los niveles de T-Akt fueron utilizados como control de carga proteica en las distintas calles. Los resultados fueron expresados como veces de estímulo de la relación P-PDC/T-Akt con respecto al basal.

### **8) Ensayo de oxidación de ácidos grasos**

La oxidación de ácidos grasos fue evaluada determinando la liberación de  $^3\text{H}_2\text{O}$  al medio de cultivo a partir de palmitato marcado isotópicamente con [ $^3\text{H}$ ]. Las monocapas de células de Sertoli cultivadas en placas de 24 pozos fueron incubadas en estufa a  $34^\circ\text{C}$  humidificada en atmósfera de  $5\%\text{CO}_2:95\%\text{aire}$  durante 4 horas en medio completo (500  $\mu\text{l}$ ) conteniendo 1% P/V BSA libre de ácidos grasos, 2  $\mu\text{Ci/ml}$  de  $[9,10(n)\text{-}^3\text{H}]$  ácido palmítico, 10  $\mu\text{M}$  ácido palmítico y 0,25 mM L-carnitina. La radioactividad inespecífica se obtuvo incubando la misma mezcla de reacción en un pozo sin células. Al finalizar la incubación, el medio fue recogido y desproteinizado mediante el agregado de un volumen igual de ácido tricloroacético 10% P/V durante 30 minutos en baño de hielo. Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas a 13000xg durante 5 minutos a  $4^\circ\text{C}$ . Los sobrenadantes fueron recuperados y tratados con cinco volúmenes de una mezcla de Metanol:Cloroformo (2:1) y con dos volúmenes de una solución de KCl 2M:HCl 2M. Luego de una agitación vigorosa por 1 minuto las fases fueron separadas por centrifugación a 3000xg por 5 minutos a  $4^\circ\text{C}$ . La fase acuosa fue recuperada y una alícuota adecuada de la misma fue depositada en un vial conteniendo Optiphase Hisafe 3 (Perking Elmer, Inc. Waltham, MA, EE.UU.). Se determinó la radioactividad en un contador de centelleo líquido (Wallac Rack-beta 1214; Pharmacia, Uppsala, Suecia). Los resultados fueron expresados como picomoles ácido palmítico oxidado/hora/ $\mu\text{g}$  de ADN (pmol AG ox/h/  $\mu\text{g}$  ADN).

### 9) Ensayo de incorporación de 2-deoxi-glucosa

El ensayo de incorporación de 2-deoxi-glucosa (2-DOG) a la célula fue realizado sobre monocapas de células de Sertoli cultivadas en placas de 24 pozos. Para ello, las monocapas celulares fueron lavadas dos veces con PBS conteniendo  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  (PBS  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ : PBS,  $\text{CaCl}_2$  1 mM y  $\text{MgCl}_2$  1mM). Posteriormente, fueron incubadas con 1  $\mu\text{Ci/ml}$  [2,6- $^3\text{H}$ ]-2-deoxi-D-glucosa (25,7 Ci/mmol) en PBS  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  por 30 minutos a 34°C en estufa humidificada en atmósfera de 5% $\text{CO}_2$ :95%aire. La incorporación inespecífica se determinó en incubaciones realizadas en las mismas condiciones en presencia de 2-deoxi-D-glucosa no marcada en exceso ( $\times 10000$ ). Finalizada la incubación, las monocapas celulares fueron lavadas 2 veces con PSB  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  frío y lisadas con una solución de deoxicolato de sodio 0,4% P/V en hidróxido de sodio 0,5 M. Los lisados celulares se depositaron sobre un vial conteniendo Optiphase Hisafe 3 (Perking Elmer, Inc.) y la radioactividad fue determinada en un contador de centelleo líquido (Wallac Rack-beta 1214). Los resultados fueron expresados como dpm/ $\mu\text{g}$  de ADN.

### 10) Determinación de los niveles de lactato

La cuantificación de lactato fue evaluada en el medio de cultivo proveniente de monocapas de células de Sertoli cultivadas en placas de 24 pozos. La determinación fue realizada utilizando un kit comercial (Sigma-Aldrich) cuya técnica se basa en la oxidación de lactato a piruvato por la enzima LDH usando  $\beta\text{-NAD}^+$  como coenzima. Brevemente, 200  $\mu\text{l}$  de medio de cultivo fueron desproteinizados mediante el agregado de 400  $\mu\text{l}$  de ácido perclórico 8% P/V por 5 minutos en baño de hielo y centrifugados a 1600xg por 10 minutos a 4°C. Una alícuota (55  $\mu\text{l}$ ) del sobrenadante recuperado fue depositada sobre 280  $\mu\text{l}$  de solución de reacción compuesta por 2,8 mM de  $\beta\text{-NAD}^+$  y 20 UI/ml de LDH en buffer glicina e hidracina (pH 9,2). Las muestras fueron incubadas por 15 minutos a 37°C en baño con agitación. Al finalizar la incubación el NADH producido fue evaluado por espectrofotometría a 340 nm. Los resultados fueron expresados como  $\mu\text{g}$  de lactato/ $\mu\text{g}$  ADN.

### **11) Determinación de la actividad de lactato deshidrogenasa**

La actividad de LDH fue evaluada en monocapas de células de Sertoli cultivadas en placas de 24 pozos. Se determinó utilizando un kit comercial que se basa en un método espectrofotométrico que usa piruvato como sustrato de la enzima y NADH como coenzima. La velocidad de desaparición del NADH se evaluó por disminución de la absorbancia a 340 nm. Las monocapas celulares fueron lavadas con solución fisiológica (NaCl 0,9% P/V) y homogeneizadas por ultrasonido (Ultrasonic Cell Disruptor & Homogenizer SONIFIER™ 150). El homogeneizado fue centrifugado a 15.800xg por 10 minutos a 4°C y una alícuota adecuada del sobrenadante obtenido fue utilizada para determinar la actividad de LDH. Los resultados fueron expresados como mUI/μg ADN.

### **12) Determinación de la viabilidad celular**

La viabilidad celular fue evaluada en monocapas de células de Sertoli cultivadas en placas de 96 pozos utilizando un kit comercial (CellTiter 96 Aqueous non-Radiative Cell Proliferation Assay, Promega, Madison, WI, EE.UU.). El método se basa en la reducción de un compuesto de tetrazolio [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio, sal interna; MTS] en presencia de un agente acoplante de electrones (metosulfato de fenazina; PMS) a una sal soluble de MTS-formazán por acción de las deshidrogenasas mitocondriales. La cantidad de MTS-formazán formado es directamente proporcional al número de células viables. Las monocapas de células de Sertoli fueron incubadas en presencia de la mezcla de reactivos según el protocolo del proveedor durante 2 horas a 34°C en estufa humidificada en atmósfera de 5%CO<sub>2</sub>:95%aire. Finalizado el período de incubación el nivel de MTS-formazán producido fue determinado a 490 nm en un lector de placas MultiSkan EX (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, EE.UU.).

### **13) Determinación de ADN y proteínas**

El contenido de ADN fue determinado según la técnica fluorométrica descrita por Labarca y Paigen (1980). La determinación de proteínas se realizó según la técnica descrita por Lowry y colaboradores (1951) utilizando una curva estándar de BSA.

### **14) Análisis estadístico**

El estudio estadístico de los resultados fue realizado por análisis de varianza de una vía (ANOVA), seguido por test de Tukey-Kramer para la comparación de múltiples grupos. Las probabilidades  $<0.05$  fueron consideradas estadísticamente significativas. Los datos experimentales fueron analizados utilizando el programa estadístico GraphPad InStat versión 3.00 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, EE.UU.).

## DISEÑO EXPERIMENTAL

### 1) Estudio de la regulación del metabolismo de ácidos grasos y de la expresión de genes relacionados

#### 1.a) Oxidación de ácidos grasos

Para evaluar la oxidación de ácidos grasos, las monocapas de células de Sertoli fueron mantenidas en condiciones basales o tratadas con WY14643 (WY, 10  $\mu$ M) —activador farmacológico de PPAR  $\alpha$ —, GW0742 (GW, 5  $\mu$ M) —activador farmacológico de PPAR  $\beta/\delta$ —, FSH (100 ng/ml) o bFGF (30ng/ml). Para evaluar la acción del ácido palmítico, las células fueron mantenidas en condiciones controles (1% BSA) o tratadas con ácido palmítico (500  $\mu$ M-1% BSA). En todos los casos las incubaciones se realizaron por 24 y 48 horas. Para evaluar la participación de PPAR  $\beta/\delta$  en las regulaciones observadas, se realizaron cultivos paralelos de monocapas de células de Sertoli que fueron incubadas con FSH (100 ng/ml), bFGF (30 ng/ml) o ácido palmítico (500  $\mu$ M-1% BSA) por 48 horas en ausencia y presencia de GSK3787 —antagonista de PPAR  $\beta/\delta$ — (GSK, 20  $\mu$ M).

#### 1.b) Expresión de genes relacionados con el transporte y metabolismo de ácidos grasos

Las monocapas de células de Sertoli fueron mantenidas en condiciones basales o tratadas con WY14643 (WY, 1 y 10  $\mu$ M) —activador farmacológico de PPAR  $\alpha$ — o de GW0742 (GW, 1 y 5  $\mu$ M) —activador farmacológico de PPAR  $\beta/\delta$ —, FSH (100 ng/ml) o bFGF (30ng/ml). Para evaluar la acción del ácido palmítico, las células fueron mantenidas en condiciones controles (1% BSA) o tratadas con ácido palmítico (500  $\mu$ M-1% BSA). En todos los casos las incubaciones se realizaron por 24 y 48 horas. Al finalizar el período de incubación las monocapas celulares fueron procesadas como se describió anteriormente para analizar la expresión de FAT/CD36, CPT1, LCAD y MCAD. Cultivos paralelos fueron realizados para evaluar la participación de PPAR  $\beta/\delta$  en las regulaciones observadas. Para

ello las monocapas de células de Sertoli fueron incubadas con FSH (100 ng/ml), bFGF (30ng/ml) o ácido palmítico (500  $\mu$ M-1% BSA) por 48 horas en ausencia y presencia de GSK3787 —antagonista de PPAR  $\beta/\delta$ — (GSK, 20  $\mu$ M). Luego de las incubaciones, las células fueron procesadas como se describió anteriormente para analizar la expresión de FAT/CD36, CPT1 y LCAD.

Por otro lado, para evaluar los efectos de las células germinales apoptóticas (CGA), las monocapas de células de Sertoli fueron mantenidas en condiciones basales o cocultivadas con CGA por 24 y 48 horas. Luego de las incubaciones se realizó el tratamiento hipotónico y las monocapas de células de Sertoli fueron procesadas como se describió anteriormente para analizar la expresión de FAT/CD36, CPT1, LCAD y MCAD. Cocultivos paralelos fueron realizados para evaluar la participación de PPAR  $\beta/\delta$  en este tipo de regulación. Las monocapas de células de Sertoli fueron cocultivadas con CGA por 48 horas en ausencia y presencia de GSK3787 —antagonista de PPAR  $\beta/\delta$ — (GSK, 20  $\mu$ M). Luego de las incubaciones se realizó el tratamiento hipotónico y las monocapas de células de Sertoli fueron procesadas como se describió anteriormente para analizar la expresión de FAT/CD36, CPT1 y LCAD.

## **2) Estudio de la participación de los PPARs en la regulación de la producción de lactato y de los mecanismos moleculares involucrados**

### *2.a) Producción de lactato*

Los niveles de lactato fueron determinados en los medios condicionados obtenidos al finalizar el período de cultivo en cada condición experimental descrita a continuación:

1) Las monocapas de células de Sertoli fueron mantenidas en condiciones basales o tratadas con WY14643 (WY, 1 y 10  $\mu$ M) —activador farmacológico de PPAR  $\alpha$ —, GW0742 (GW, 1 y 5  $\mu$ M) —activador farmacológico de PPAR  $\beta/\delta$ —, BSA 1% (control), ácido palmítico (500  $\mu$ M-1% BSA), FSH (100 ng/ml), bFGF (30ng/ml) o cocultivadas con CGA por 48 horas.

2) Para evaluar la participación de las PDKs en la regulación por PPARs, las monocapas de células de Sertoli fueron mantenidas en condiciones basales o tratadas con WY 10  $\mu\text{M}$  o GW 5  $\mu\text{M}$  en ausencia y presencia de dicloroacetato, inhibidor de las PDKs (DCA, 10 mM), por 48 horas.

3) Con el objeto de evaluar la participación de PPAR  $\beta/\delta$  en la regulación de la producción de lactato, las monocapas de células de Sertoli fueron incubadas en condiciones basales o tratadas con FSH (100 ng/ml), bFGF (30 ng/ml), BSA 1% (control), ácido palmítico (500  $\mu\text{M}$ -1% BSA) o cocultivadas con CGA por 48 horas en ausencia y presencia de GSK3787 —antagonista de PPAR  $\beta/\delta$ — (GSK, 20  $\mu\text{M}$ ).

### *2.b) Mecanismos moleculares involucrados en la producción de lactato*

#### *2.b.1) Incorporación de glucosa y expresión de GLUT1*

Las monocapas de células de Sertoli fueron mantenidas en condiciones basales o tratadas con dosis variables de WY14643 —activador farmacológico de PPAR  $\alpha$ — (WY, 1 y 10  $\mu\text{M}$ ) o de GW0742 —activador farmacológico de PPAR  $\beta/\delta$ — (GW, 1 y 5  $\mu\text{M}$ ) por 48 horas. Al finalizar el período de incubación, las células fueron utilizadas para realizar el ensayo de incorporación de glucosa a la célula. Cultivos paralelos fueron mantenidos en condiciones basales o tratados con WY14643 (WY, 10  $\mu\text{M}$ ) o GW0742 (GW, 5  $\mu\text{M}$ ) por 24 y 48 horas. Luego de las incubaciones, las células fueron procesadas como se describió anteriormente para analizar la expresión de GLUT1.

#### *2.b.2) Actividad de LDH y expresión de LDH A*

Las monocapas de células de Sertoli fueron mantenidas en condiciones basales o tratadas con WY14643 (WY, 10  $\mu\text{M}$ ) o de GW0742 (GW, 5  $\mu\text{M}$ ) por 48 horas. Al finalizar el período de incubación las células fueron utilizadas para la determinación de la actividad de LDH. Cultivos paralelos fueron tratados con WY14643 (WY, 10  $\mu\text{M}$ ) o de GW0742 (GW, 5

μM) por 24 y 48 horas. Luego de las incubaciones, las células fueron procesadas como se describió anteriormente para analizar la expresión de LDH A.

### *2.b.3) Expresión de MCT4*

Las monocapas de células de Sertoli fueron mantenidas en condiciones basales o estimuladas con WY14643 (WY, 10 μM) o con GW0742 (GW, 5 μM) por 24 y 48 horas. Al finalizar el período de incubación las células fueron procesadas para analizar la expresión del transportador de monocarboxilatos MCT4 como se describió anteriormente.

### *2.b.4) Regulación del Complejo Piruvato Deshidrogenasa*

#### *i. Niveles de PDC fosforilado*

Las monocapas de células de Sertoli fueron mantenidas en condiciones basales o tratadas con WY14643 (WY, 10 μM) o con GW0742 (GW, 5 μM) por 24 y 48 horas o estimuladas con bFGF (30 ng/ml) por 48 horas.

Para evaluar la participación de las PDKs las monocapas de células de Sertoli fueron mantenidas en condiciones basales o tratadas con WY14643 (WY, 10 μM) o con GW0742 (GW, 5 μM) en ausencia y presencia de un inhibidor de PDKs, dicloroacetato (DCA, 10 mM) por 48 horas.

Para evaluar la participación de PPAR β/δ las monocapas de células de Sertoli fueron mantenidas en condiciones basales o estimuladas con bFGF (30 ng/ml) en ausencia y presencia de GSK3787 —antagonista de PPAR β/δ— (GSK, 20 μM) por 48 horas.

Al finalizar el período de incubación de cada condición experimental, las células fueron procesadas para determinar los niveles de P-PDC como se describió previamente.



*ii. Expresión de PDKs y PDPs*

Las monocapas de células de Sertoli fueron mantenidas en condiciones basales o tratadas con WY14643 (WY, 10  $\mu$ M) o con GW0742 (GW, 5  $\mu$ M) por 24 y 48 horas. Al finalizar el período de incubación las células fueron procesadas para determinar los niveles de expresión de PDKs y PDPs como se describió previamente.

## RESULTADOS

### I. PARTICIPACIÓN DE LOS PPARs EN EL METABOLISMO DE ÁCIDOS GRASOS Y EN LA PRODUCCIÓN DE LACTATO EN LA CÉLULA DE SERTOLI

Como se mencionó en la introducción, la célula de Sertoli posee una alta demanda metabólica, ya que debe cubrir las necesidades energéticas propias así como también aquellas de las células germinales en desarrollo. Se planteó como hipótesis la existencia de una regulación coordinada entre ambos procesos metabólicos con la posible participación de PPARs.

Se sabe que la célula de Sertoli expresa los genes involucrados en la oxidación de ácidos grasos y los factores de transcripción PPAR  $\alpha$  y PPAR  $\beta/\delta$ . Sin embargo, la relación entre estos últimos factores de transcripción y la oxidación de ácidos grasos en la célula de Sertoli no ha sido explorada aún. Por otro lado, se ha observado que ciertos PPARs también pueden estar involucrados en la regulación del metabolismo de hidratos de carbono. Teniendo en cuenta que la célula de Sertoli debe satisfacer las necesidades energéticas cambiantes de la población germinal circundante y que presenta una regulación fina de la producción de lactato, una relación entre la activación de los PPARs y la producción de lactato en la célula de Sertoli podría estar presente.

Nuestro primer objetivo fue evaluar, por un lado, la participación de la activación del PPAR  $\alpha$  y del PPAR  $\beta/\delta$  en la regulación de la oxidación de ácidos grasos y en la expresión de los genes involucrados en su transporte y metabolismo tales como FAT/CD36, CPT1, MCAD y LCAD. Por otro lado, evaluar si la activación de PPAR  $\alpha$  y de PPAR  $\beta/\delta$  participa además en la regulación de la producción de lactato y en los mecanismos moleculares involucrados en ella.

Para evaluar los efectos de la activación del PPAR  $\alpha$  y PPAR  $\beta/\delta$  se utilizaron como activadores farmacológicos el WY14643 (WY) y el GW0742 (GW), respectivamente. Estas drogas han sido ampliamente utilizadas en la literatura para demostrar las respuestas biológicas que resultan de la activación de los PPARs.

Se utilizó como modelo experimental cultivo primario de células de Sertoli aisladas de ratas de 20 días de edad. Los cultivos fueron incubados por 24 y 48 horas con dosis variables de WY (1 y 10  $\mu\text{M}$ ) y GW (1 y 5  $\mu\text{M}$ ). Se evaluó la viabilidad de las células luego de 48 horas de incubación con 10  $\mu\text{M}$  de WY o con 5  $\mu\text{M}$  de GW. En ningún caso el tratamiento modificó la viabilidad celular (dato no mostrado). En las próximas secciones se muestran los resultados obtenidos tanto en la regulación del metabolismo de ácidos grasos como en la regulación de la producción de lactato por activación de PPARs.

### 1) Regulación de la oxidación de ácidos grasos por activación de PPAR $\alpha$ y PPAR $\beta/\delta$

La tabla I muestra los resultados obtenidos para la oxidación de ácidos grasos en células de Sertoli tratadas por 24 y 48 horas con WY 10  $\mu\text{M}$ . Puede observarse que el tratamiento por 48 horas produjo un aumento estadísticamente significativo en la capacidad de la célula de Sertoli de oxidar ácidos grasos.

**Tabla I. Regulación de la oxidación de ácidos grasos por WY en células de Sertoli**

	BASAL	WY 10 $\mu\text{M}$ 24h	WY 10 $\mu\text{M}$ 48h
<b>pmol AG ox/h/<math>\mu\text{gADN}</math></b>	<b>2,6<math>\pm</math>0,1</b>	<b>3,0<math>\pm</math>0,2</b>	<b>3,5<math>\pm</math>0,2*</b>

Las células de Sertoli fueron mantenidas en condiciones basales (BASAL) o tratadas con WY 10  $\mu\text{M}$  por 24 ó 48 horas. En todos los casos las células permanecieron en cultivo hasta el día 5. Luego del período de incubación se realizó el ensayo de oxidación de ácidos grasos sobre la monocapa celular. Las incubaciones se realizaron por triplicado y los resultados se expresaron como  $X \pm \text{DS}$  de los picomoles de ácido graso oxidado por hora y por  $\mu\text{gADN}$  (pmol AG ox/h/ $\mu\text{gADN}$ ). Se muestra un experimento representativo de tres (\* $p < 0.05$  vs BASAL).

De igual manera, la tabla II muestra los resultados obtenidos para la oxidación de ácidos grasos en células de Sertoli tratadas por 24 y 48 horas con GW 5  $\mu\text{M}$ . Puede observarse que el tratamiento por 48 horas con el activador de PPAR  $\beta/\delta$  produjo un aumento estadísticamente significativo en la capacidad de la célula de Sertoli de oxidar ácidos grasos.

Tabla II. Regulación de la oxidación de ácidos grasos por GW en células de Sertoli

	BASAL	GW 5µM 24h	GW 5µM 48h
pmol AG ox/h/µgADN	2,4±0,1	2,3±0,3	3,4±0,1*

Las células de Sertoli fueron mantenidas en condiciones basales (BASAL) o tratadas con GW 5 µM por 24 ó 48 horas. En todos los casos las células permanecieron en cultivo hasta el día 5. Luego del período de incubación se realizó el ensayo de oxidación de ácidos grasos sobre la monocapa celular. Las incubaciones se realizaron por triplicado y los resultados se expresan como X±DS de los picomoles de ácido graso oxidado por hora y por µgADN (pmol AG ox/h/µgADN). Se muestra un experimento representativo de tres (\*p<0.05 vs BASAL).

## 2) Regulación de la expresión de genes relacionados con el transporte y metabolismo de ácidos grasos por activación de PPAR α

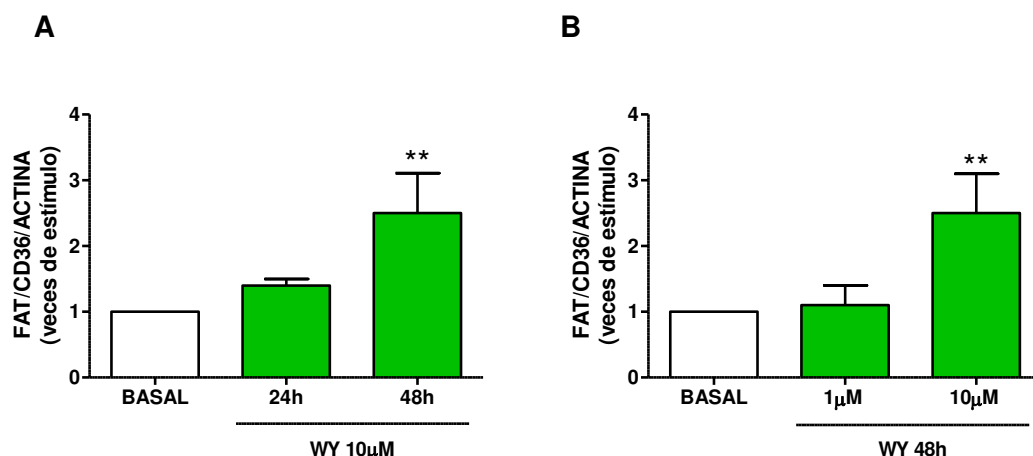
Luego de observar que la activación de PPAR α aumentaba la capacidad de la célula de Sertoli de oxidar ácidos grasos, se diseñaron experimentos para analizar la regulación de la expresión de genes que podría ser responsable de dicho aumento.

### 2.a) Regulación de la expresión de FAT/CD36

La figura 1 muestra los resultados obtenidos para la expresión de FAT/CD36 en cultivos de células de Sertoli incubadas con WY 10 µM por 24 y 48 horas (figura 1A) y WY 1 y 10 µM por 48 horas (figura 1B). Se observó que los niveles de ARNm de FAT/CD36 aumentan luego de 48 horas de tratamiento con WY 10 µM.

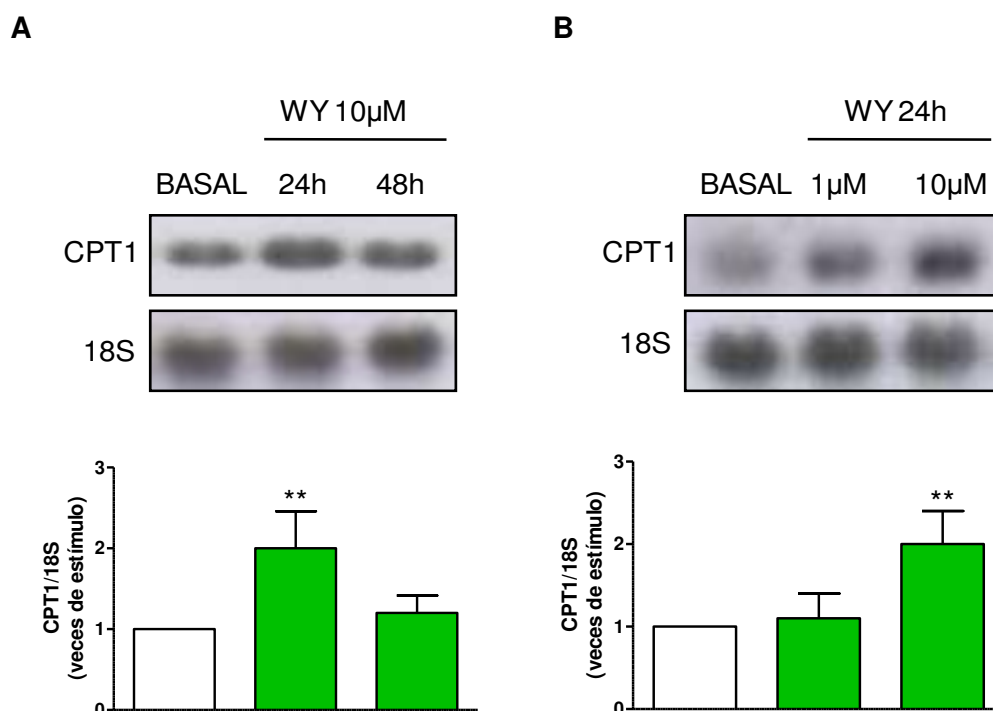
### 2.b) Regulación de la expresión de CPT1

La figura 2 muestra los resultados obtenidos para la expresión de CPT1 en condiciones basales y luego de la activación de PPAR α. Se observó que el tratamiento por 24 horas con WY 10 µM aumenta los niveles de ARNm de CPT1 (figura 2A y 2B).



**Figura 1. Regulación de la expresión de FAT/CD36 por WY en células de Sertoli**

Las células de Sertoli fueron mantenidas en condiciones basales (BASAL) o tratadas con: **(A)** WY 10 μM por 24 ó 48 horas; **(B)** WY 1 ó 10 μM por 48 horas. En todos los casos las células permanecieron en cultivo hasta el día 5. Finalizado el período de incubación se extrajo el ARN total, se realizó la síntesis de ADNc y se determinaron los niveles de ARNm de FAT/CD36 mediante la técnica de RT-qPCR, utilizando Actina como gen control. Los resultados se expresan como veces de estímulo respecto al BASAL de la relación FAT/CD36/Actina de tres experimentos independientes (X±DS) (\*\*p<0.01 vs BASAL).



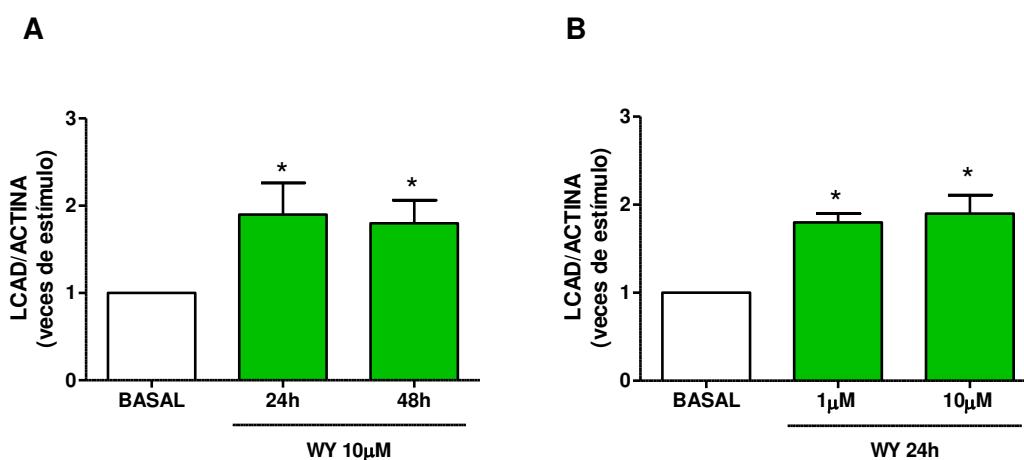
**Figura 2. Regulación de la expresión de CPT1 por WY en células de Sertoli**

Las células de Sertoli fueron mantenidas en condiciones basales (BASAL) o tratadas con: **(A)** WY 10 μM por 24 ó 48 horas; **(B)** WY 1 ó 10 μM por 24 horas. En todos los casos las células permanecieron en cultivo hasta el día 5. Finalizado el período de incubación se extrajo el ARN total y se determinaron los niveles de ARNm de CPT1 mediante la técnica de Northern Blot, utilizando el ARNr 18S como gen de carga. En la autorradiografía se muestra un experimento representativo de tres. En el gráfico de barras, los resultados se expresan como veces de estímulo respecto al BASAL de la relación CPT1/18S de tres experimentos independientes (X±DS) (\*\*p<0.01 vs BASAL).

### 2.c) Regulación de la expresión de LCAD y MCAD

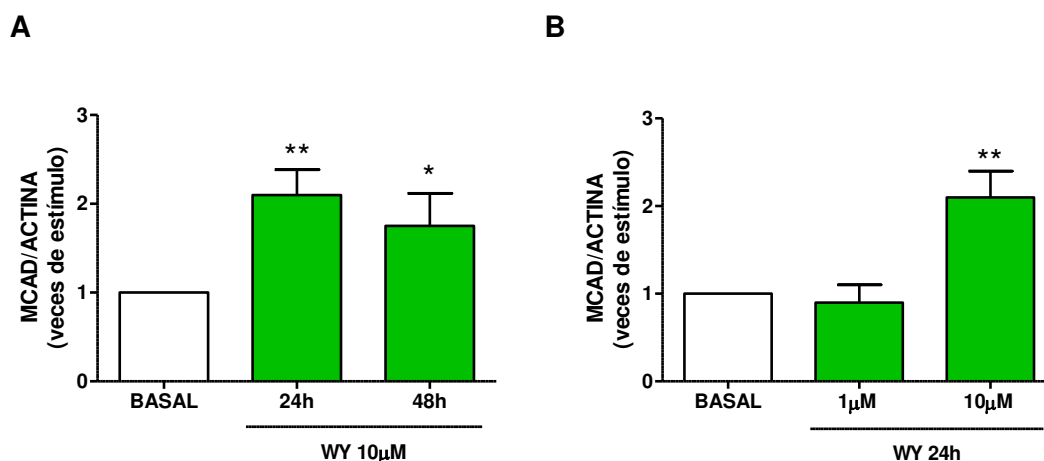
La figura 3 muestra los resultados obtenidos para la expresión de LCAD luego de la activación de PPAR  $\alpha$ . En la figura 3A se observa que los niveles de ARNm de LCAD aumentan luego de 24 y 48 horas de tratamiento con WY 10  $\mu$ M. La figura 3B muestra que ambas dosis de WY, 1 y 10  $\mu$ M, aumentan la expresión de LCAD luego de 24 horas de incubación.

La figura 4 muestra los resultados obtenidos para la expresión de MCAD luego de la activación de PPAR  $\alpha$ . En la figura 4A se observa que los niveles de ARNm de MCAD aumentan luego de 24 y 48 horas de tratamiento con WY 10  $\mu$ M. Por otro lado, la figura 4B muestra que sólo la dosis de WY 10  $\mu$ M aumenta los niveles de ARNm de MCAD luego de 24 horas de incubación.



**Figura 3. Regulación de la expresión de LCAD por WY en células de Sertoli**

Las células de Sertoli fueron mantenidas en condiciones basales (BASAL) o tratadas con: **(A)** WY 10  $\mu$ M por 24 ó 48 horas; **(B)** WY 1 ó 10  $\mu$ M por 24 horas. En todos los casos las células permanecieron en cultivo hasta el día 5. Finalizado el período de incubación se extrajo el ARN total, se realizó la síntesis de ADNc y se determinaron los niveles de ARNm de LCAD mediante la técnica de RT-qPCR, utilizando Actina como gen control. Los resultados se expresan como veces de estímulo respecto al BASAL de la relación LCAD/Actina de tres experimentos independientes ( $X \pm DS$ ) (\* $p < 0.05$  vs BASAL).



**Figura 4. Regulación de la expresión de MCAD por WY en células de Sertoli**

Las células de Sertoli fueron mantenidas en condiciones basales (BASAL) o tratadas con: **(A)** WY 10  $\mu\text{M}$  por 24 ó 48 horas; **(B)** WY 1 ó 10  $\mu\text{M}$  por 24 horas. En todos los casos las células permanecieron en cultivo hasta el día 5. Finalizado el período de incubación se extrajo el ARN total, se realizó la síntesis de ADNc y se determinaron los niveles de ARNm de MCAD mediante la técnica de RT-qPCR, utilizando Actina como gen control. Los resultados se expresan como veces de estímulo respecto al BASAL de la relación MCAD/Actina de tres experimentos independientes ( $X \pm \text{DS}$ ) (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  vs BASAL).

En resumen, la activación de PPAR  $\alpha$  con WY aumenta la expresión de FAT/CD36, CTP1, LCAD y MCAD lo que podría explicar el aumento observado en la oxidación de ácidos grasos.

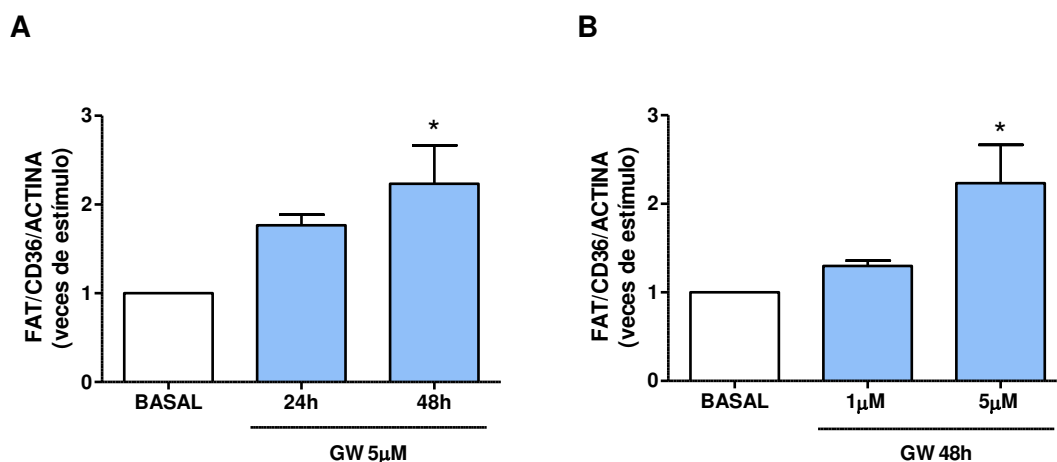
### 3) Regulación de la expresión de genes relacionados con el transporte y metabolismo de ácidos grasos por activación de PPAR $\beta/\delta$

El resultado presentado en la tabla II (página 60) muestra que la activación de PPAR  $\beta/\delta$ , al igual que la activación de PPAR  $\alpha$ , aumenta la capacidad de la célula de Sertoli de oxidar ácidos grasos. Los siguientes experimentos fueron destinados a analizar la expresión de genes que podrían ser responsables del incremento en la capacidad oxidativa observada.

#### 3.a) Regulación de la expresión de FAT/CD36

La figura 5 muestra los resultados obtenidos para la expresión de FAT/CD36 en cultivos de células de Sertoli incubadas con GW 5  $\mu\text{M}$  por 24 y 48 horas (figura 5A) y con

GW 1 y 5  $\mu\text{M}$  por 48 horas (figura 5B). Se observó que los niveles de ARNm de FAT/CD36 se encuentran aumentados luego de 48 horas de tratamiento con GW 5  $\mu\text{M}$ .



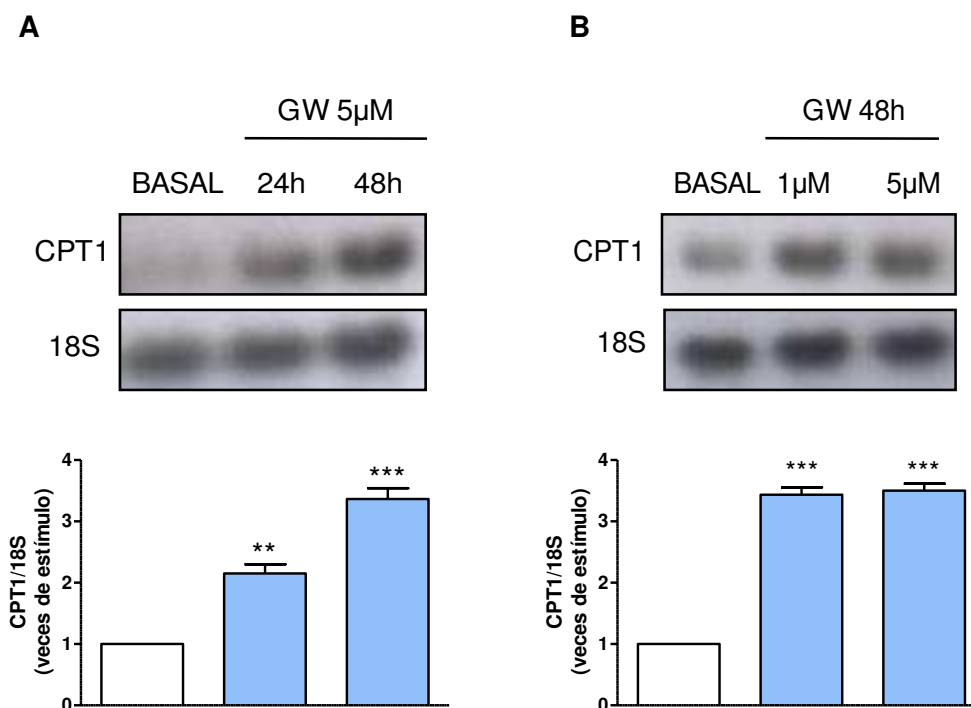
**Figura 5. Regulación de la expresión de FAT/CD36 por GW en células de Sertoli**

Las células de Sertoli fueron mantenidas en condiciones basales (BASAL) o tratadas con: **(A)** GW 5  $\mu\text{M}$  por 24 ó 48 horas; **(B)** GW 1 ó 5  $\mu\text{M}$  por 48 horas. En todos los casos las células permanecieron en cultivo hasta el día 5. Finalizado el período de incubación se extrajo el ARN total, se realizó la síntesis de ADNc y se determinaron los niveles de ARNm de FAT/CD36 mediante la técnica de RT-qPCR utilizando Actina como gen control. Los resultados se expresan como veces de estímulo respecto al BASAL de la relación FAT/CD36/Actina de tres experimentos independientes ( $X \pm DS$ ) (\* $p < 0.05$  vs BASAL).

### 3.b) Regulación de la expresión de CPT1

La figura 6 muestra los resultados obtenidos para la expresión de CPT1 en condiciones basales y luego de la activación de PPAR  $\beta/\delta$ . Se observó que el tratamiento por 24 y 48 horas con GW 5  $\mu\text{M}$  aumenta los niveles de ARNm de CPT1 (figura 6A). Asimismo, se observó que el tratamiento por 48 horas tanto con 1  $\mu\text{M}$  como con 5  $\mu\text{M}$  de GW aumenta los niveles de ARNm de CPT1 (figura 6B).





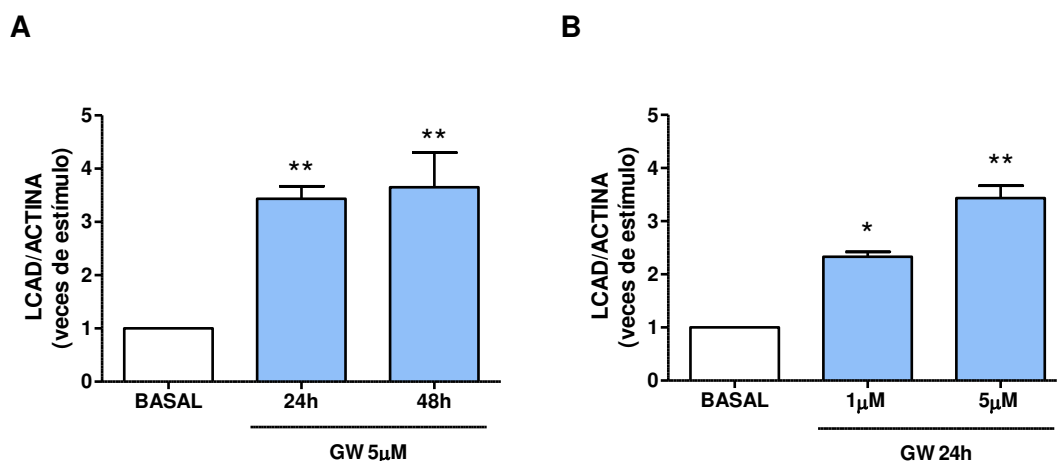
**Figura 6. Regulación de la expresión de CPT1 por GW en células de Sertoli**

Las células de Sertoli fueron mantenidas en condiciones basales (BASAL) o tratadas con: **(A)** GW 5  $\mu$ M por 24 ó 48 horas; **(B)** GW 1 ó 5  $\mu$ M por 48 horas. En todos los casos las células permanecieron en cultivo hasta el día 5. Finalizado el período de incubación se extrajo el ARN total y se determinaron los niveles de ARNm de CPT1 mediante la técnica de Northern Blot, utilizando el ARNr 18S como gen de carga. En la autorradiografía se muestra un experimento representativo de tres. En el gráfico de barras, los resultados se expresan como veces de estímulo respecto al BASAL de la relación CPT1/18S de tres experimentos independientes ( $X \pm DS$ ) (\*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  vs BASAL).

### 3.c) Regulación de la expresión de LCAD y MCAD

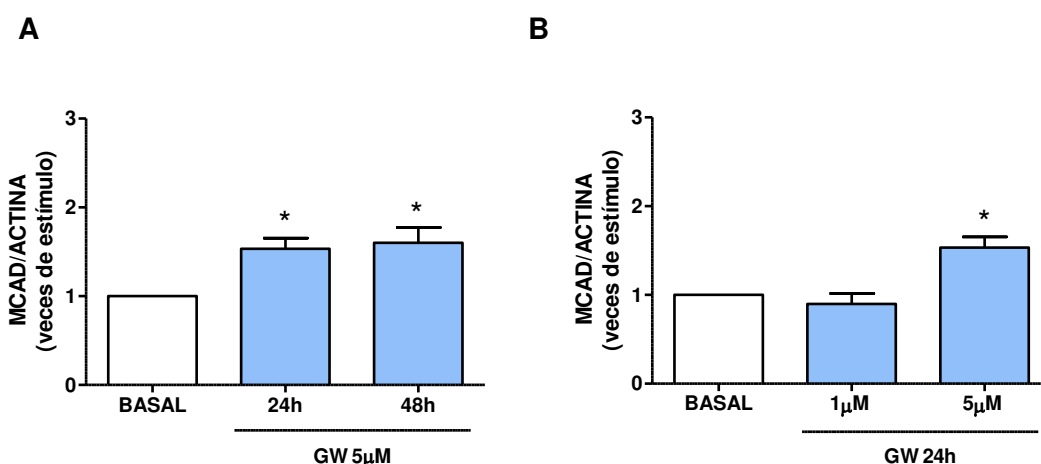
Se evaluaron a continuación los niveles de ARNm de LCAD y MCAD luego de la activación de PPAR  $\beta/\delta$ . La figura 7A muestra que el GW 5  $\mu$ M aumenta los niveles de ARNm de LCAD en los dos tiempos estudiados. En la figura 7B se observa que ambas dosis analizadas de GW aumentan la expresión de LCAD luego de 24 horas de tratamiento.

En cuanto a los niveles de ARNm de MCAD, la figura 8A muestra que luego del tratamiento con GW 5  $\mu$ M por 24 y 48 horas se produce un aumento de la expresión de dicho mensajero. En la figura 8B se observa que en incubaciones por 24 horas la dosis de 5  $\mu$ M de GW provoca un aumento en los niveles de MCAD.



**Figura 7. Regulación de la expresión de LCAD por GW en células de Sertoli**

Las células de Sertoli fueron mantenidas en condiciones basales (BASAL) o tratadas con: **(A)** GW 5 µM por 24 ó 48 horas; **(B)** GW 1 ó 5 µM por 24 horas. En todos los casos las células permanecieron en cultivo hasta el día 5. Finalizado el período de incubación se extrajo el ARN total, se realizó la síntesis de ADNc y se determinaron los niveles de ARNm de LCAD mediante la técnica de RT-qPCR utilizando Actina como gen control. Los resultados se expresan como veces de estímulo respecto al BASAL de la relación LCAD/Actina de tres experimentos independientes (X±DS) (\*p<0.05, \*\*p<0.01 vs BASAL).



**Figura 8. Regulación de la expresión de MCAD por GW en células de Sertoli**

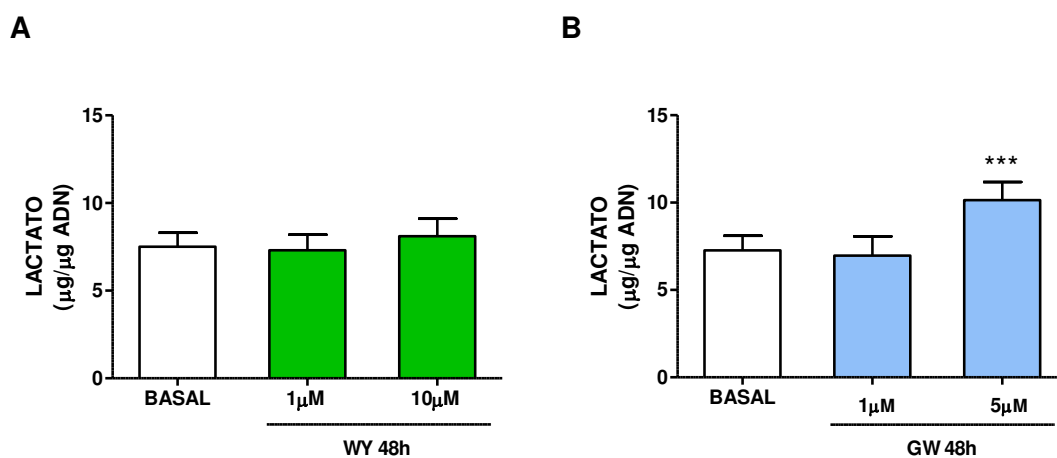
Las células de Sertoli fueron mantenidas en condiciones basales (BASAL) o tratadas con: **(A)** GW 5 µM por 24 ó 48 horas; **(B)** GW 1 ó 5 µM por 24 horas. En todos los casos las células permanecieron en cultivo hasta el día 5. Finalizado el período de incubación se extrajo el ARN total, se realizó la síntesis de ADNc y se determinaron los niveles de ARNm de MCAD mediante la técnica de RT-qPCR utilizando Actina como gen control. Los resultados se expresan como veces de estímulo respecto al BASAL de la relación MCAD/Actina de tres experimentos independientes (X±DS) (\*p<0.05 vs BASAL).

En resumen, la activación de PPAR β/δ con GW, al igual que la activación de PPAR α por WY, aumenta la expresión de FAT/CD36, CPT1, LCAD y MCAD lo que podría explicar el aumento observado en la oxidación de ácidos grasos.

#### 4) Regulación de la producción de lactato por activación de PPAR $\alpha$ y PPAR $\beta/\delta$

Como se describió en la introducción, la producción de lactato por la célula de Sertoli es fundamental para proveer de energía a las células germinales en desarrollo. El siguiente grupo de experimentos fue realizado con el objetivo de analizar si la activación de PPAR  $\alpha$  o de PPAR  $\beta/\delta$ , además de regular la oxidación de ácidos grasos, regulaba la producción de lactato en la célula de Sertoli. Para cumplir con este objetivo cultivos de células de Sertoli fueron incubados con WY (1 y 10  $\mu\text{M}$ ) y GW (1 y 5  $\mu\text{M}$ ) por 48 horas y se determinaron los niveles de lactato presentes en el medio condicionado.

La figura 9 muestra los resultados obtenidos para la producción de lactato luego de la activación de PPAR  $\alpha$  y de PPAR  $\beta/\delta$ . La activación de PPAR  $\alpha$  no modificó la producción de lactato en ninguna de las dosis evaluadas (figura 9A). Por otro lado, en la figura 9B se observa que la activación de PPAR  $\beta/\delta$  produjo un aumento en la producción de lactato.



**Figura 9. Regulación de la producción de lactato por WY y GW en células de Sertoli**

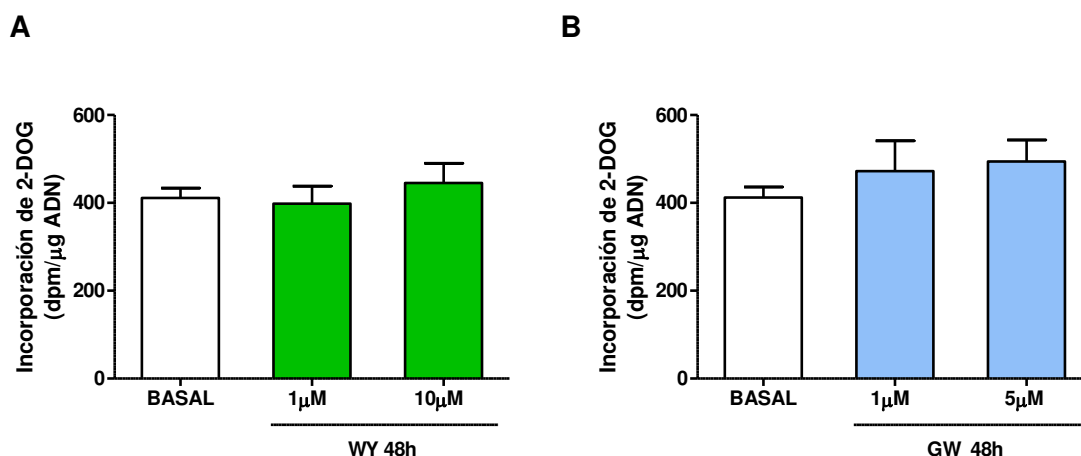
Las células de Sertoli fueron mantenidas en condiciones basales (BASAL) o tratadas por 48 horas con: **(A)** WY 1 ó 10  $\mu\text{M}$ ; **(B)** GW 1 ó 5  $\mu\text{M}$ . En todos los casos las células permanecieron en cultivo hasta el día 5. Finalizado el período de incubación se determinó el lactato producido en el medio condicionado. Las incubaciones se realizaron por triplicado y los resultados se expresan como microgramos de lactato por  $\mu\text{gADN}$  ( $X \pm \text{DS}$ ). Se muestra un experimento representativo de tres realizados (\*\*\*)  $p < 0.001$  vs BASAL).

## 5) Regulación de mecanismos moleculares relacionados con la producción de lactato por activación de PPAR $\alpha$ y PPAR $\beta/\delta$

El resultado observado en la figura 9 nos condujo a tratar de discernir cuáles podían ser los mecanismos moleculares que estaban participando en la acción diferencial de la activación de ambos PPARs sobre la producción de lactato. Se ha demostrado previamente que la regulación de diversos mecanismos bioquímicos puede participar en las variaciones en la producción de lactato. Entre ellos cabe mencionar, la entrada de glucosa a la célula y la expresión de GLUT1, la conversión de piruvato a lactato catalizada por la enzima LDH, la exportación del lactato al medio extracelular mediada por MCT4 y la regulación del PDC, complejo que cataliza la descarboxilación del piruvato, por un mecanismo que involucra su fosforilación. En nuestro laboratorio se ha demostrado que dichos mecanismos son finamente regulados por hormonas y factores de producción local en el testículo (Riera y col., 2001; 2002; Galardo y col., 2008; Regueira y col., 2015). El siguiente grupo de experimentos fue diseñado para evaluar si la regulación diferencial de alguno de estos mecanismos moleculares podría explicar la diferente respuesta observada en la producción de lactato por activación de PPAR  $\alpha$  y PPAR  $\beta/\delta$ .

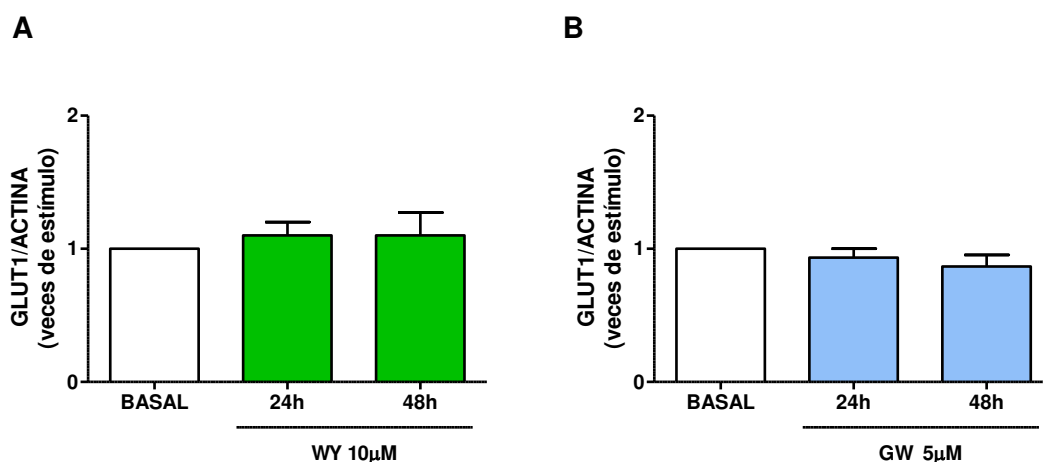
### *5.a) Regulación de la entrada de glucosa a la célula*

La figura 10 muestra que los tratamientos con 1 y 10  $\mu\text{M}$  de WY por 48 horas (figura 10A) y los tratamientos con 1 y 5  $\mu\text{M}$  de GW por 48 horas (figura 10B) no modifican la incorporación de glucosa a la célula. De manera similar, en las figuras 11A y 11B se observa que los tratamientos por 24 y 48 horas con WY (10 $\mu\text{M}$ ) o GW (5 $\mu\text{M}$ ) no modifican la expresión del transportador de glucosa, GLUT1.



**Figura 10. Regulación de la incorporación de 2-DOG por WY y GW en células de Sertoli**

Las células de Sertoli fueron mantenidas en condiciones basales (BASAL) o tratadas por 48 horas con: **(A)** WY 1 ó 10  $\mu\text{M}$ ; **(B)** GW 1 ó 5  $\mu\text{M}$ . En todos los casos las células permanecieron en cultivo hasta el día 5. Finalizado el período de incubación se realizó el ensayo de incorporación de 2-DOG sobre la monocapa celular. Las incubaciones se realizaron por triplicado y los resultados se expresan como desintegraciones por minuto por  $\mu\text{gADN}$  ( $X \pm \text{DS}$ ). Se muestra un experimento representativo de tres realizados.



**Figura 11. Regulación de la expresión de GLUT1 por WY y GW en células de Sertoli**

Las células de Sertoli fueron mantenidas en condiciones basales (BASAL) o tratadas por 24 ó 48 horas con: **(A)** WY 10  $\mu\text{M}$ ; **(B)** GW 5  $\mu\text{M}$ . En todos los casos las células permanecieron en cultivo hasta el día 5. Finalizado el período de incubación se extrajo el ARN total, se realizó la síntesis de ADNc y se midió el nivel de expresión de GLUT1 mediante la técnica de RT-qPCR utilizando Actina como gen control. Los resultados se expresan como veces de estímulo respecto al BASAL de la relación GLUT1/Actina de tres experimentos independientes ( $X \pm \text{DS}$ ).

### 5.b) Regulación de la conversión de piruvato a lactato catalizada por LDH

La tabla III muestra que ninguno de los dos agonistas modifica la actividad de LDH. Asimismo, en la figura 12 puede observarse que los tratamientos por 24 y 48 horas con WY (10 $\mu$ M) o GW (5 $\mu$ M) tampoco modifican la expresión de LDH A.

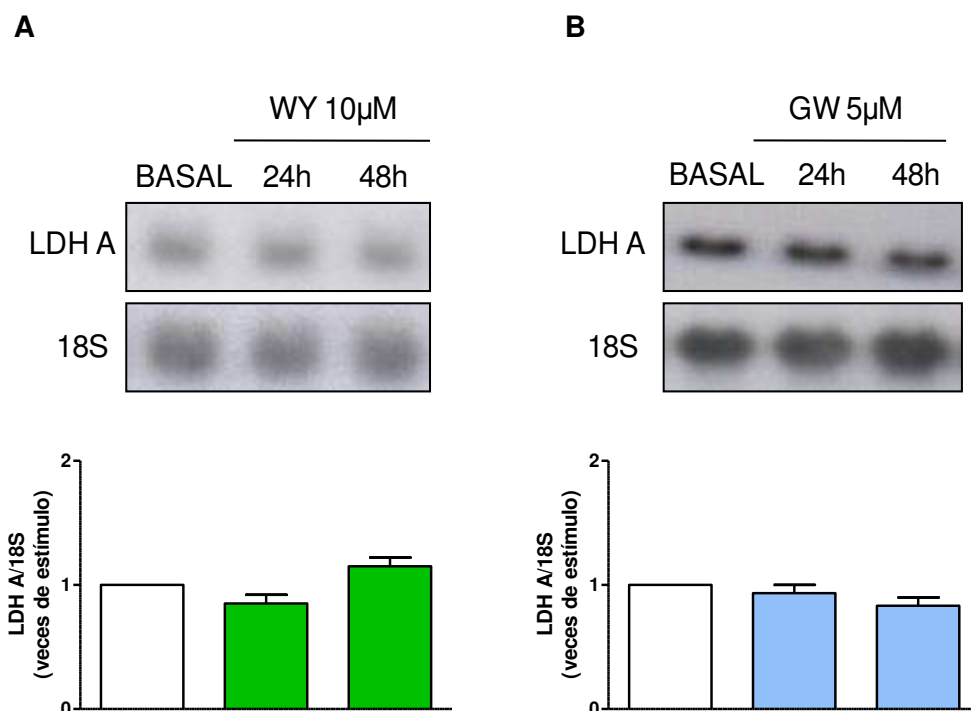
### 5.c) Regulación de la expresión de MCT4

Las figuras 13A y 13B muestran que ni el tratamiento con WY (10  $\mu$ M) ni con GW (5  $\mu$ M) modifican la expresión del transportador de monocarboxilatos MCT4 en los tiempos analizados.

**Tabla III. Regulación de la actividad de LDH por WY y GW en células de Sertoli**

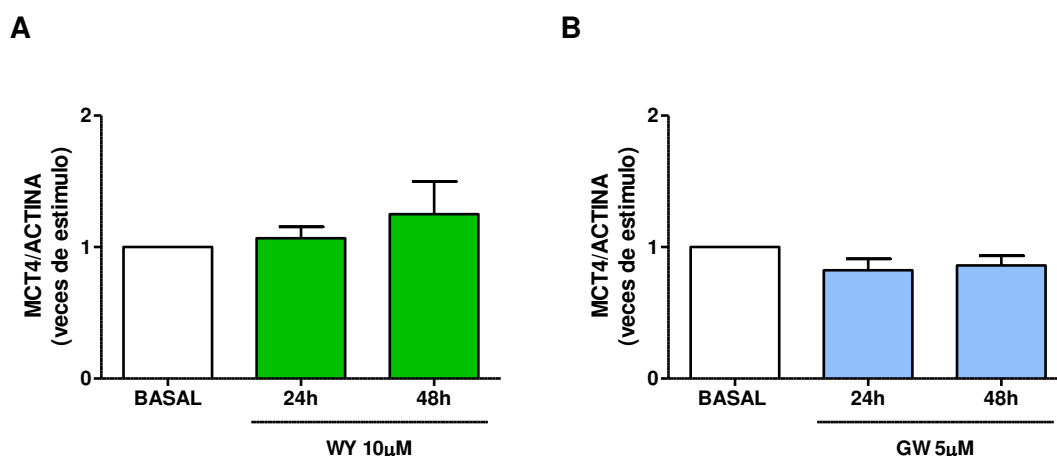
	mUI/ $\mu$ g ADN
<b>BASAL</b>	<b>22,9<math>\pm</math>1,8</b>
<b>WY 10<math>\mu</math>M 48h</b>	<b>25,2<math>\pm</math>0,1</b>
<b>GW 5<math>\mu</math>M 48h</b>	<b>22,2<math>\pm</math>0,1</b>

Las células de Sertoli fueron mantenidas en condiciones basales (BASAL) o tratadas con WY 10  $\mu$ M o GW 5  $\mu$ M por 48 horas. En todos los casos las células permanecieron en cultivo hasta el día 5. Luego del período de incubación se determinó la actividad de LDH en la monocapa celular. Las incubaciones se realizaron por triplicado y los resultados se expresan como miliunidades internacionales por  $\mu$ gADN ( $X\pm DS$ ). Se muestra un experimento representativo de tres.



**Figura 12. Regulación de la expresión de LDH A por WY y GW en células de Sertoli**

Las células de Sertoli fueron mantenidas en condiciones basales (BASAL) o tratadas por 24 ó 48 horas con: **(A)** WY 10 µM; **(B)** GW 5 µM. En todos los casos las células permanecieron en cultivo hasta el día 5. Finalizado el período de incubación se extrajo el ARN total y se determinaron los niveles de ARNm de LDH A mediante la técnica de Northern Blot, utilizando el ARNr 18S como gen de carga. En la autorradiografía se muestra un experimento representativo de tres. En el gráfico de barras, los resultados se expresan como veces de estímulo respecto al BASAL de la relación LDH A/18S de tres experimentos independientes ( $X \pm DS$ ).



**Figura 13. Regulación de la expresión de MCT4 por WY y GW en células de Sertoli**

Las células de Sertoli fueron mantenidas en condiciones basales (BASAL) o tratadas por 24 ó 48 horas con: **(A)** WY 10 µM; **(B)** GW 5 µM. En todos los casos las células permanecieron en cultivo hasta el día 5. Finalizado el período de incubación se extrajo el ARN total, se realizó la síntesis de ADNc y se determinaron los niveles de ARNm de MCT4 mediante la técnica de RT-qPCR utilizando Actina como gen control. Los resultados se expresan como veces de estímulo respecto al BASAL de la relación MCT4/Actina de tres experimentos independientes ( $X \pm DS$ ).

#### 5.d) Regulación del complejo PDC

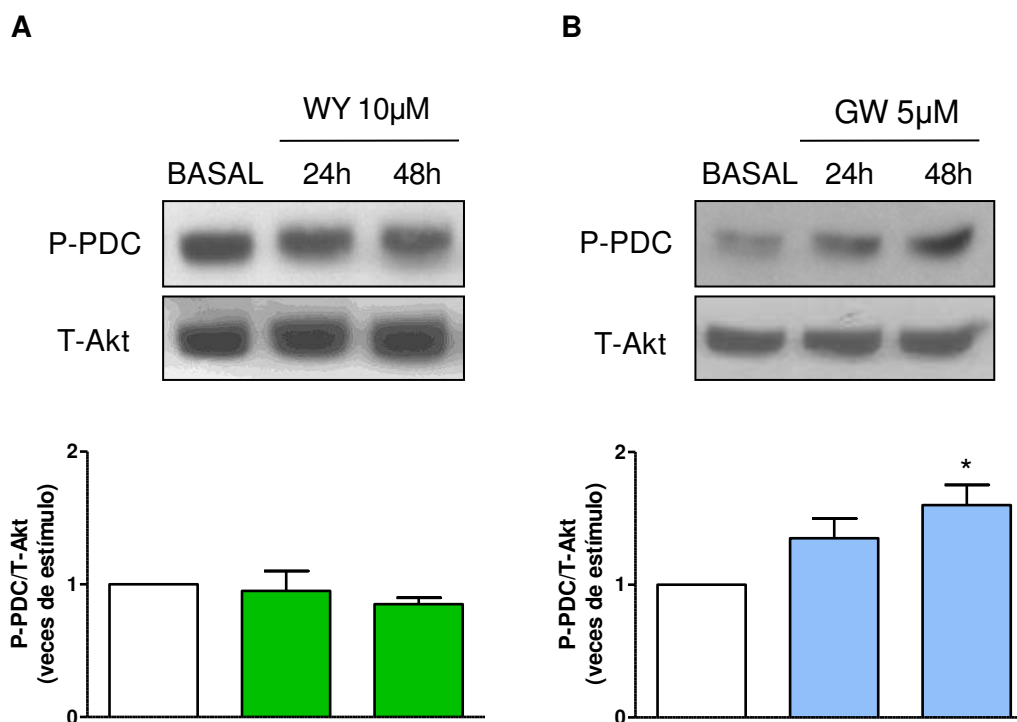
El siguiente grupo de experimentos fue destinado a analizar si un aumento en la disponibilidad de piruvato —sustrato de la enzima LDH— podía ser responsable del efecto diferencial observado con la activación de PPAR  $\alpha$  y PPAR  $\beta/\delta$  en la producción de lactato.

##### *i. Regulación de los niveles de PDC fosforilado*

Como se mencionó en la introducción, el PDC es regulado por fosforilación y su estado fosforilado (P-PDC) es el estado inactivo del mismo. Como consecuencia, todos aquellos mecanismos que aumenten los niveles de PDC fosforilado disminuirán la entrada de piruvato al ciclo de Krebs, aumentarán la disponibilidad de sustrato para la LDH y por consiguiente aumentarán la producción de lactato.

La figura 14A muestra que el tratamiento con 10  $\mu$ M de WY por 24 ó 48 horas, agonista que no modifica la producción de lactato, tampoco modifica los niveles de P-PDC. Por otro lado, la figura 14B muestra que el tratamiento con 5  $\mu$ M de GW por 48 horas, tratamiento que observamos que aumenta los niveles de lactato, resulta en un incremento en los niveles de P-PDC.





**Figura 14. Regulación de los niveles de P-PDC por WY y GW en células de Sertoli**

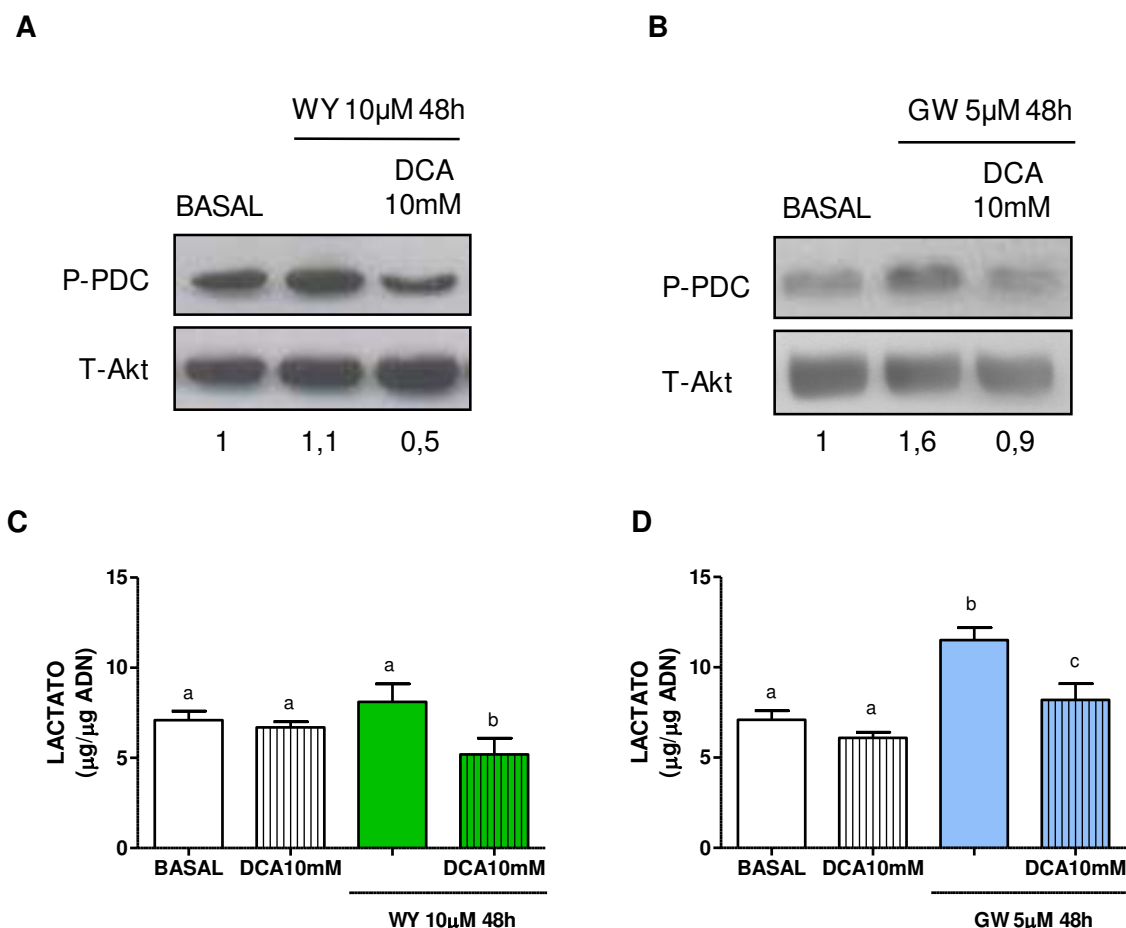
Las células de Sertoli fueron mantenidas en condiciones basales (BASAL) o tratadas por 24 ó 48 horas con: **(A)** WY 10  $\mu$ M; **(B)** GW 5  $\mu$ M. En todos los casos las células permanecieron en cultivo hasta el día 5. Los extractos celulares fueron utilizados para el análisis de Western Blot para P-PDC y T-Akt. En la autorradiografía se muestra un experimento representativo de tres. En el gráfico de barras, los resultados se expresan como veces de estímulo con respecto al BASAL de la relación P-PDC/T-Akt de tres experimentos independientes ( $X \pm DS$ ) (\* $p < 0.05$  vs BASAL).

#### ii. Participación de las PDKs en la producción de lactato

Los niveles de PDC fosforilado son regulados por una familia de cuatro quinasas –las piruvato deshidrogenasa quinasas (PDK1-4)– y por una familia de dos fosfatasa –las piruvato deshidrogenasa fosfatasa (PDP1-2).

Para evaluar la participación de las PDKs en la regulación del estado de fosforilación del PDC y de la producción de lactato se realizaron incubaciones con WY 10  $\mu$ M o GW 5  $\mu$ M, en ausencia o presencia del inhibidor de las PDKs, dicloroacetato (DCA), por 48 horas. La figura 15A muestra que el tratamiento con WY en presencia de DCA en el medio de incubación disminuye los niveles de P-PDC. De manera similar, la figura 15C muestra que la presencia del inhibidor disminuye la producción de lactato por debajo de la producción basal. Por otro lado, en la figura 15B se observa que la presencia de DCA disminuye los niveles de P-PDC estimulados por GW a niveles semejantes al basal y en la figura 15D se observa que

el DCA reduce, al menos en parte, la producción de lactato estimulada por activación del PPAR  $\beta/\delta$ .



**Figura 15. Efecto de DCA en la regulación de los niveles de P-PDC y en la producción de lactato por WY y GW en células de Sertoli**

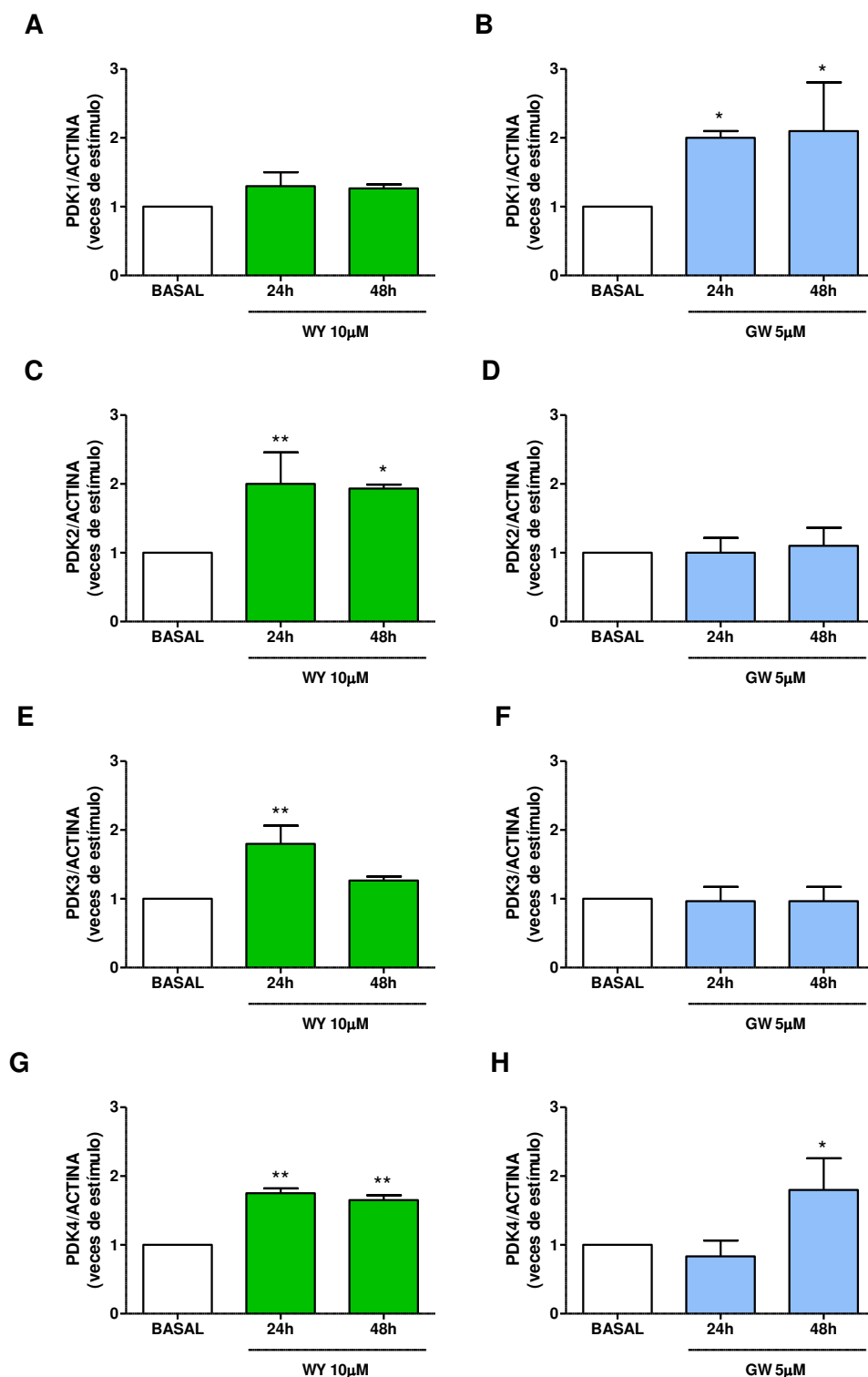
Las células de Sertoli fueron mantenidas en condiciones basales (BASAL) o tratadas por 48 horas con (A, C) WY 10  $\mu$ M o (B, D) GW 5  $\mu$ M, en ausencia y presencia de DCA 10mM. En todos los casos las células permanecieron en cultivo hasta el día 5. (A, B) Los extractos celulares fueron utilizados para el análisis de Western Blot para P-PDC y T-Akt. Los números debajo de la autorradiografía indican los resultados obtenidos luego del análisis densitométrico y se expresan los resultados como veces de estímulo con respecto al BASAL de la relación P-PDC/T-Akt. Se muestra un experimento representativo de tres. (C, D) Se determinó el lactato producido en el medio condicionado. Las incubaciones se realizaron por triplicado y los resultados se expresan como microgramos de lactato por  $\mu$ gADN ( $X \pm DS$ ), de un experimento representativo de tres. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ).

*iii. Regulación de la expresión de PDKs*

Habiendo demostrado que la acción diferencial de la activación farmacológica de ambos PPARs sobre la producción de lactato podía explicarse, al menos en parte, por una regulación diferencial de los niveles de P-PDC en la cual estaría involucrada la actividad de PDKs, decidimos analizar los niveles de expresión de PDKs en condiciones experimentales de activación de PPAR  $\alpha$  y PPAR  $\beta/\delta$ .

La figura 16 muestra que el tratamiento con WY 10  $\mu$ M por 24 y 48 horas aumenta los niveles de ARNm de PDK2 y PDK4 (figura 16C y 16G, respectivamente) mientras que los niveles de PDK3 se ven aumentados únicamente luego de 24 horas de tratamiento (figura 16E). No se observaron modificaciones en los niveles de expresión de PDK1 (figura 16A).

En cuanto a la activación de PPAR  $\beta/\delta$ , se observó que el tratamiento GW 5  $\mu$ M aumenta los niveles de ARNm de PDK1 a los dos tiempos analizados (figura 16B) mientras que los niveles de ARNm de PDK4 aumentan luego de 48 horas de incubación (figura 16H). No se observó modificación en los niveles de ARNm de PDK2 y PDK3 en los tratamientos con GW (figura 16D y 16F, respectivamente).

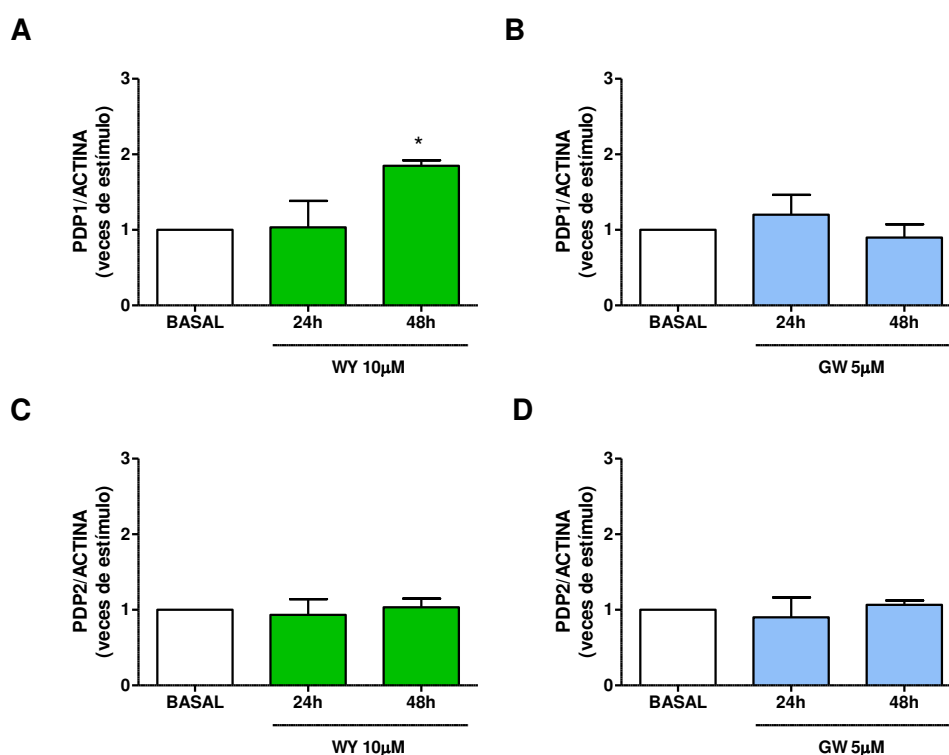


**Figura 16. Regulación de la expresión de PDK1-4 por WY y GW en células de Sertoli**

Las células de Sertoli fueron mantenidas en condiciones basales (BASAL) o tratadas por 24 ó 48 horas con: WY 10 µM (**A, C, E, G**) o con GW 5 µM (**B, D, F, H**). En todos los casos las células permanecieron en cultivo hasta el día 5. Finalizado el período de incubación se extrajo el ARN total, se realizó la síntesis de ADNc y se determinaron los niveles de ARNm de PDK1-4 mediante la técnica de RT-qPCR utilizando Actina como gen control. Los resultados se expresan como veces de estímulo respecto al BASAL de la relación PDKs/Actina de tres experimentos independientes (X±DS) (\*p<0.05, \*\*p<0.01 vs BASAL).

*iv. Regulación de la expresión de PDPs*

Considerando que no pudimos demostrar, a nivel de la expresión de PDKs, una diferencia clara que explique la regulación diferencial sobre los niveles de P-PDC por activación de ambos factores de transcripción y teniendo en cuenta que el nivel de fosforilación del PDC también es regulado por fosfatasas –las piruvato deshidrogenasa fosfatasas (PDP1-2)– decidimos analizar la expresión de estas enzimas. Al respecto, se observó que WY (10  $\mu$ M) aumenta los niveles de ARNm de PDP1 luego de 48 horas de tratamiento (figura 17A) mientras que no modifica la expresión de PDP2 (figura 17C). Por otro lado, se observó que el tratamiento con GW (5  $\mu$ M) no modifica los niveles de expresión de ninguna de las dos PDPs (figura 17B y 17D), poniendo en evidencia una regulación diferencial a este nivel.

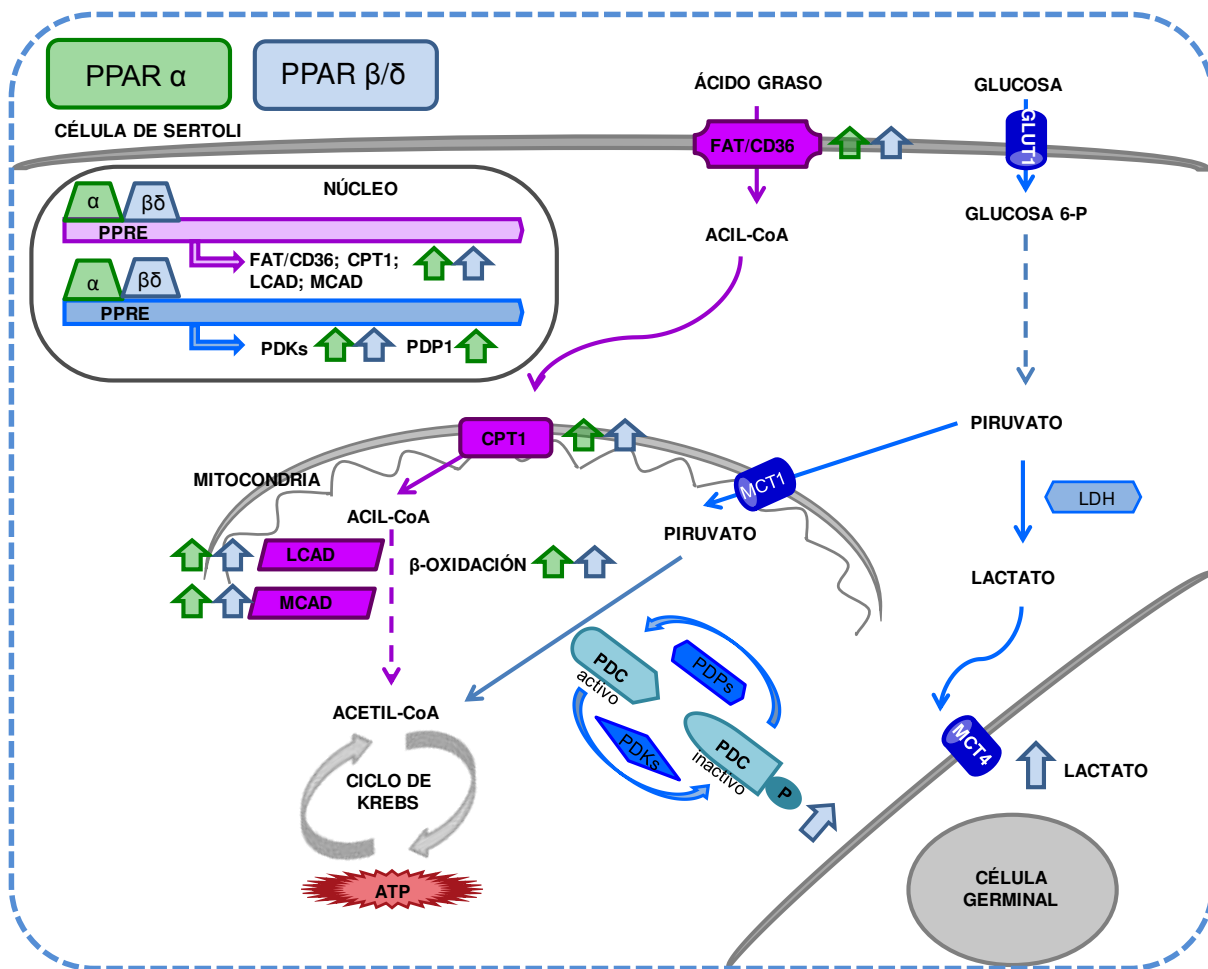


**Figura 17. Regulación de la expresión de PDP1-2 por WY y GW en células de Sertoli**

Las células de Sertoli fueron mantenidas en condiciones basales (BASAL) o tratadas por 24 ó 48 horas con: WY 10  $\mu$ M (A, C) o con GW 5  $\mu$ M (B, D). En todos los casos las células permanecieron en cultivo hasta el día 5. Finalizado el período de incubación se extrajo el ARN total, se realizó la síntesis de ADNc y se determinaron los niveles de ARNm de PDP1-2 mediante la técnica de RT-qPCR utilizando Actina como gen control. Los resultados se expresan como veces de estímulo respecto al BASAL de la relación PDPs/Actina de tres experimentos independientes ( $X \pm DS$ ) (\* $p < 0.05$  vs BASAL).

En resumen, se demostró una regulación diferencial en la producción de lactato por activación farmacológica de PPAR  $\alpha$  y PPAR  $\beta/\delta$  que podría explicarse por un aumento en los niveles de P-PDC relacionados con una regulación diferencial a nivel de PDPs.

*La figura 18 resume los resultados obtenidos en esta primera parte del trabajo de tesis. En la misma se demostró que, la activación del PPAR  $\alpha$  y del PPAR  $\beta/\delta$  regula la expresión de genes relacionados con el transporte y metabolismo de ácidos grasos, como son el FAT/CD36, CPT1, LCAD y MCAD, que se traduce en un aumento de la capacidad de la célula de Sertoli para oxidar ácidos grasos (camino metabólico representado en violeta). Por otro lado, se demostró que sólo la activación de PPAR  $\beta/\delta$  aumenta la producción de lactato y que dicho efecto está asociado a la regulación del estado de fosforilación del PDC (camino metabólico representado en azul).*



**Figura 18. Esquema del modelo propuesto para los mecanismos moleculares involucrados en el metabolismo de ácidos grasos y la producción de lactato en la célula de Sertoli por PPAR  $\alpha$  y PPAR  $\beta/\delta$  en la célula de Sertoli**

La activación del PPAR  $\alpha$  y PPAR  $\beta/\delta$  promueve la transcripción de FAT/CD36, CPT1, LCAD y MCAD, produciendo un aumento en la capacidad de la célula de oxidar ácidos grasos (camino metabólico representado en violeta). Por otro lado, la activación del PPAR  $\beta/\delta$  pero no de PPAR  $\alpha$ , provoca un aumento en la producción de lactato que se puede explicar por la regulación diferencial de la expresión de PDKs y PDPs que conducen a un aumento en los niveles de P-PDC (camino metabólico representado en azul).

## II. ANÁLISIS DE LOS POSIBLES MECANISMOS FISIOLÓGICOS QUE CONDUCEN A LA ACTIVACIÓN DE LOS PPARs EN LA CÉLULA DE SERTOLI

Como se mencionó en la introducción, los ácidos grasos y sus derivados pueden actuar como ligandos fisiológicos de los PPARs. En la primera parte de esta tesis demostramos que la activación farmacológica de PPAR  $\alpha$  y de PPAR  $\beta/\delta$  regula el metabolismo de ácidos grasos. En la gran mayoría de los estudios donde se demostró la participación de PPARs en la regulación de la expresión génica se han utilizado activadores farmacológicos. Los mecanismos que activan fisiológicamente a estos receptores son poco conocidos y su investigación en cada situación particular representa un gran desafío.

Se sabe que las células de Sertoli son capaces de fagocitar células germinales apoptóticas (CGA) y que los productos de la fagocitosis forman las gotas lipídicas que son características en este tipo celular (Shiratsuchi y col., 1999; Wang y col., 2006). Asimismo, Xiong y colaboradores (2009) demostraron que el cocultivo de células de Sertoli con CGA aumenta la cantidad de gotas lipídicas, la oxidación de ácidos grasos y consiguientemente los niveles de ATP en las células de Sertoli. La relación entre estos últimos sucesos con la expresión de genes relacionados con la oxidación de ácidos grasos ha sido poco estudiada en la célula de Sertoli. Por otro lado, se desconoce si existe una participación de PPARs en la regulación por CGA del metabolismo de ácidos grasos.

Basados en las observaciones previas postulamos que los ácidos grasos provenientes de las abundantes gotas lipídicas podrían actuar simultáneamente como sustratos energéticos para la producción de ATP y como ligandos de PPARs regulando así la funcionalidad de la célula de Sertoli. Para demostrar esta hipótesis analizamos si existía regulación de la expresión génica en respuesta a CGA y a posibles ligandos fisiológicos tales como los ácidos grasos. Por otro lado evaluamos si en dicha regulación participaba la activación de PPARs.

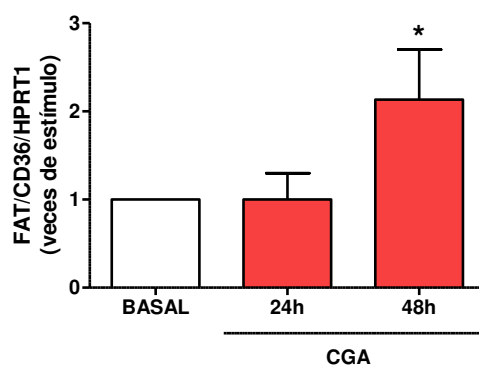


## 1) Regulación de la expresión de genes relacionados con el transporte y metabolismo de ácidos grasos por CGA

Se utilizó el procedimiento descrito por Xiong y colaboradores (2009) para generar CGA a partir de espermatocitos y espermátides. Las células de Sertoli fueron cocultivadas con CGA (en una relación número de células de Sertoli a CGA 1:1) por 24 y 48 horas. Luego de las incubaciones, la monocapa de células de Sertoli fue utilizada para analizar la regulación de la expresión de genes relacionados con el metabolismo energético en este tipo celular.

### 1.a) Regulación de la expresión de FAT/CD36

La figura 19 muestra que el cocultivo por 48 horas con CGA produjo un aumento en los niveles de ARNm de FAT/CD36 en las células de Sertoli.

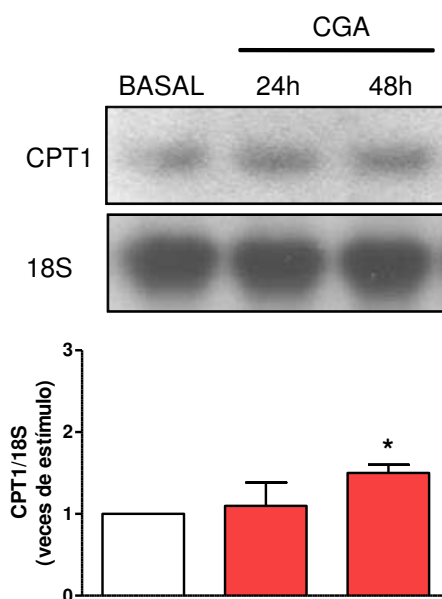


**Figura 19. Regulación de la expresión de FAT/CD36 por CGA en células de Sertoli**

Las células de Sertoli fueron mantenidas en condiciones basales (BASAL) o cocultivadas con CGA (1:1) por 24 ó 48 horas. En todos los casos las células permanecieron en cultivo hasta el día 5. Finalizado el período de incubación se realizó el tratamiento hipotónico, la extracción del ARN total, la síntesis de ADNc y se determinaron los niveles de ARNm de FAT/CD36 mediante la técnica de RT-qPCR utilizando HPRT1 como gen control. Los resultados se expresan como veces de estímulo respecto al BASAL de la relación FAT/CD36/HPRT1 de tres experimentos independientes ( $X \pm DS$ ) (\* $p < 0.05$  vs BASAL).

### 1.b) Regulación de la expresión de CPT1

La figura 20 muestra que los niveles de ARNm de CPT1 en las células de Sertoli también aumentaron luego de 48 horas de cocultivo con CGA.

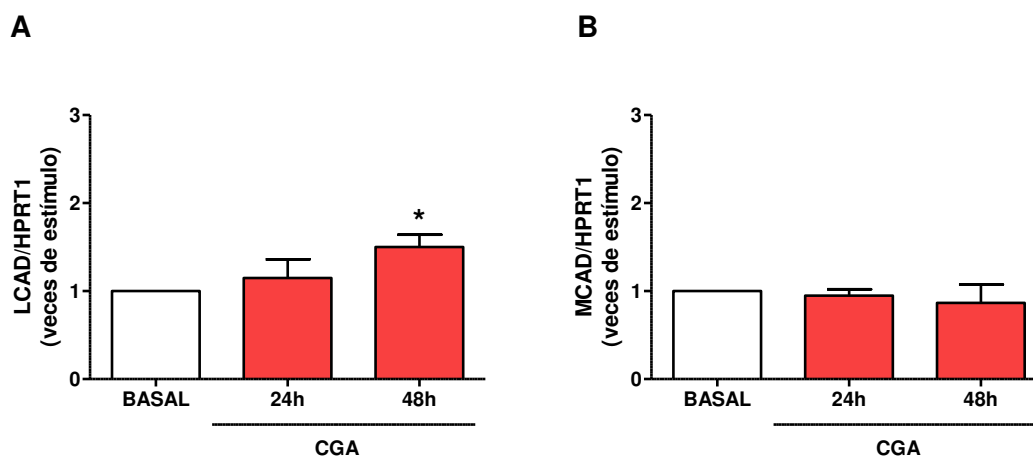


**Figura 20. Regulación de la expresión de CPT1 por CGA en células de Sertoli**

Las células de Sertoli fueron mantenidas en condiciones basales (BASAL) o cocultivadas con CGA (1:1) por 24 ó 48 horas. En todos los casos las células permanecieron en cultivo hasta el día 5. Finalizado el período de incubación se realizó el tratamiento hipotónico, se extrajo el ARN total y se determinaron los niveles de ARNm de CPT1 mediante la técnica de Northern Blot, utilizando el ARNr 18S como gen de carga. En la autorradiografía se muestra un experimento representativo de tres. En el gráfico de barras, los resultados se expresan como veces de estímulo respecto al BASAL de la relación CPT1/18S de tres experimentos independientes ( $X \pm DS$ ) (\* $p < 0.05$  vs BASAL).

### 1.c) Regulación de la expresión de LCAD y MCAD

La figura 21A muestra que el cocultivo de células de Sertoli con CGA por 48 horas aumentó los niveles de ARNm de LCAD, en forma semejante a lo observado para los genes analizados con anterioridad. Por otro lado, en la figura 21B se observa que el cocultivo con CGA no modificó los niveles de ARNm de MCAD en ninguno de los tiempos analizados.



**Figura 21. Regulación de la expresión de LCAD y MCAD por CGA en células de Sertoli**

Las células de Sertoli fueron mantenidas en condiciones basales (BASAL) o cocultivadas con CGA (1:1) por 24 ó 48 horas. En todos los casos las células permanecieron en cultivo hasta el día 5. Finalizado el período de incubación se realizó el tratamiento hipotónico, la extracción del ARN total, la síntesis de ADNc y se determinaron los niveles de ARNm de **(A)** LCAD o **(B)** MCAD, mediante la técnica de RT-qPCR utilizando HPRT1 como gen control. Los resultados se expresan como veces de estímulo respecto al BASAL de la relación LCAD/HPRT1 o MCAD/HPRT1 de tres experimentos independientes ( $X \pm DS$ ) (\* $p < 0.05$  vs BASAL).

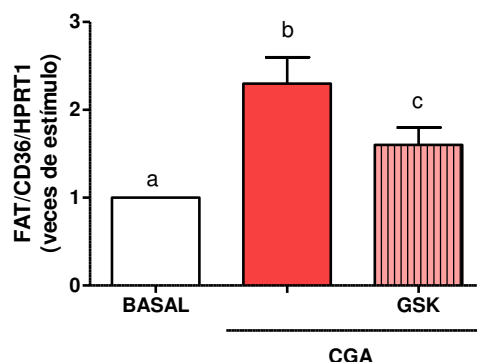
## 2) Participación de PPAR $\beta/\delta$ en la regulación de la expresión de genes relacionados con el transporte y metabolismo de ácidos grasos por CGA

Teniendo en cuenta que el cocultivo con CGA moduló la expresión de genes en forma semejante a lo observado con la activación farmacológica de PPARs, nos propusimos evaluar la participación de dichos receptores en los efectos observados en los cocultivos. Se seleccionó en particular el PPAR  $\beta/\delta$  debido a que el mismo regula de manera simultánea el metabolismo de ácidos grasos y la producción de lactato, procesos esenciales en el metabolismo energético del túbulo seminífero.

Para estudiar la participación del PPAR  $\beta/\delta$ , los cocultivos de células de Sertoli con CGA fueron realizados en presencia de un antagonista específico del PPAR  $\beta/\delta$ , GSK3787 (GSK, 20  $\mu$ M). Se observó que la presencia de GSK (20  $\mu$ M) por 48 horas en los cultivos no modifica la viabilidad de las células de Sertoli ni la expresión basal de los genes FAT/CD36, CPT1 y LCAD (resultados no mostrados).

### 2.a) Participación de PPAR $\beta/\delta$ en la expresión de FAT/CD36

La figura 22 muestra que el antagonista del PPAR  $\beta/\delta$  disminuye parcialmente los niveles de ARNm de FAT/CD36 estimulados por el cocultivo con CGA durante 48 horas.



**Figura 22. Efecto de GSK en la regulación de la expresión de FAT/CD36 por CGA en células de Sertoli**

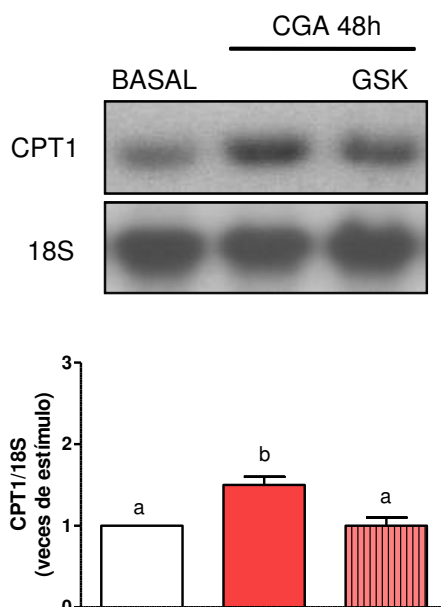
Las células de Sertoli fueron mantenidas en condiciones basales (BASAL) o cocultivadas con CGA (1:1) por 48 horas en ausencia y presencia de GSK (20  $\mu$ M). En todos los casos las células permanecieron en cultivo hasta el día 5. Finalizado el período de incubación se realizó el tratamiento hipotónico, la extracción del ARN total, la síntesis de ADNc y se determinaron los niveles de ARNm de FAT/CD36 mediante la técnica de RT-qPCR utilizando HPRT1 como gen control. Los resultados se expresan como veces de estímulo respecto al BASAL de la relación FAT/CD36/HPRT1 de tres experimentos independientes ( $X \pm DS$ ) (letras diferentes indican diferencias significativas,  $p < 0.05$ ).

### 2.b) Participación de PPAR $\beta/\delta$ en la expresión de CPT1

Con respecto a la expresión de CPT1, en la figura 23 se muestran los resultados obtenidos en el cocultivo de células de Sertoli con CGA en ausencia o presencia de GSK. Se observó que la presencia de GSK disminuye los niveles de ARNm de CPT1 estimulados por el cocultivo con CGA.

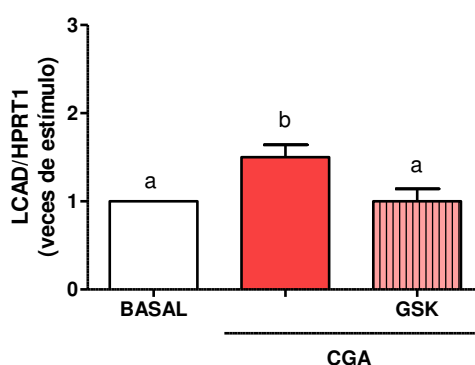
### 2.c) Participación de PPAR $\beta/\delta$ en la expresión de LCAD

De manera similar a lo observado para la expresión de los otros genes, en la figura 24 se observa que la presencia de GSK inhibió la expresión de LCAD promovida por el cocultivo con las CGA.



**Figura 23. Efecto de GSK en la regulación de la expresión de CPT1 por CGA en células de Sertoli**

Las células de Sertoli fueron mantenidas en condiciones basales (BASAL) o cocultivadas con CGA (1:1) por 48 horas en ausencia y presencia de GSK (20  $\mu$ M). En todos los casos las células permanecieron en cultivo hasta el día 5. Finalizado el período de incubación se realizó el tratamiento hipotónico, se extrajo el ARN total y se determinaron los niveles de ARNm de CPT1 mediante la técnica de Northern Blot, utilizando el ARNr 18S como gen de carga. En la autorradiografía se muestra un experimento representativo de tres. En el gráfico de barras, los resultados se expresan como veces de estímulo respecto al BASAL de la relación CPT1/18S de tres experimentos independientes ( $X \pm DS$ ) (letras diferentes indican diferencias significativas,  $p < 0.05$ ).



**Figura 24. Efecto de GSK en la regulación de la expresión de LCAD por CGA en células de Sertoli**

Las células de Sertoli fueron mantenidas en condiciones basales (BASAL) o cocultivadas con CGA (1:1) por 48 horas en ausencia y presencia de GSK (20  $\mu$ M). En todos los casos las células permanecieron en cultivo hasta el día 5. Finalizado el período de incubación se realizó el tratamiento hipotónico, la extracción del ARN total, la síntesis de ADNc y se determinaron los niveles de ARNm de LCAD mediante la técnica de RT-qPCR utilizando HPRT1 como gen control. Los resultados se expresan como veces de estímulo respecto al BASAL de la relación LCAD/HPRT1 de tres experimentos independientes ( $X \pm DS$ ) (letras diferentes indican diferencias significativas,  $p < 0.05$ ).

En resumen se observó que las CGA, además de aumentar la oxidación de ácidos grasos como demostraron Xiong y colaboradores (2009), regulan la expresión de FAT/CD36, CPT1 y LCAD. Adicionalmente se demostró que en dicha regulación participa, al menos en parte, la activación del PPAR  $\beta/\delta$ .

### **3) Regulación de la oxidación de ácidos grasos y de la expresión de genes relacionados con su transporte y metabolismo por ácido palmítico**

Se ha demostrado que el ácido palmítico —ácido graso saturado, 16:0— es el ácido graso mayoritario en células de Sertoli (Hurtado de Catalfo y Gómez Dumm, 2005) y en células germinales y cuerpos residuales (Oresti y col., 2013). Por otro lado, se conoce que el ácido palmítico en varios tejidos es capaz de estimular la expresión de genes blanco que contienen sitios PPRE en su promotor (van der Lee y col., 2000; Yang y col., 2007). Luego de haber observado que las CGA aumentan la expresión de genes relacionados con el transporte y metabolismo de los ácidos grasos y sabiendo que las CGA constituyen una fuente de ácidos grasos, decidimos analizar si un ácido graso tal como el ácido palmítico podía regular la funcionalidad de la célula de Sertoli. Para tal fin, los cultivos de células de Sertoli fueron incubados por 24 y 48 horas con ácido palmítico (500  $\mu$ M en 1% BSA) evaluándose luego del tratamiento, la oxidación de ácidos grasos y la expresión de los genes relacionados con el transporte y metabolismo de ácidos grasos.

#### *3.a) Regulación de la oxidación de ácidos grasos*

En la tabla IV se muestra que el tratamiento con ácido palmítico por 24 y 48 horas aumentó la capacidad de la célula de Sertoli de oxidar ácidos grasos.

Tabla IV. Regulación de la oxidación de ácidos grasos por ácido palmítico en células de Sertoli

	CONTROL	ÁC. PALMÍTICO 24h	ÁC. PALMÍTICO 48h
pmol AG ox/h/ugADN	3,1 ±0,2	4,6 ±0,3**	5,7 ±0,4***

Las células de Sertoli fueron mantenidas en medio completo con 1% BSA (CONTROL) o tratadas con ácido palmítico (500 µM-1%BSA) por 24 ó 48 horas. En todos los casos las células permanecieron en cultivo hasta el día 5. Luego del período de incubación se realizó el ensayo de oxidación de ácidos grasos sobre la monocapa celular. Las incubaciones se realizaron por triplicado y los resultados se expresan como X±DS de los picomoles de ácido graso oxidado por hora y por µgADN (pmol AG ox/h/µgADN). Se muestra un experimento representativo de tres realizados (\*\*p<0.01, \*\*\*p<0,001 vs CONTROL).

3.b) Regulación de la expresión de FAT/CD36

La figura 25 muestra los resultados obtenidos para la expresión de FAT/CD36 luego del tratamiento por 24 y 48 horas con ácido palmítico. Se observó que el ácido palmítico disminuye los niveles de ARNm de FAT/CD36 luego de 48 horas de tratamiento.

3.c) Regulación de la expresión de CPT1

La figura 26 muestra que el ácido palmítico aumenta la expresión de CPT1 luego de 48 horas de incubación.

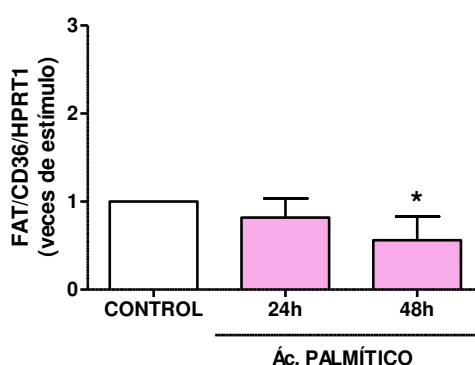
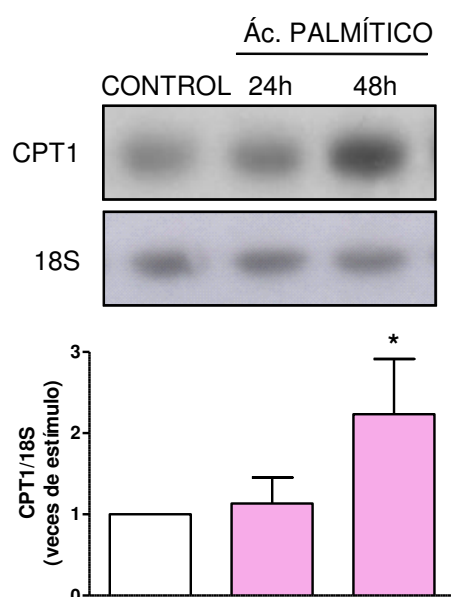


Figura 25. Regulación de la expresión de FAT/CD36 por ácido palmítico en células de Sertoli

Las células de Sertoli fueron mantenidas en medio completo con 1% BSA (CONTROL) o incubadas con ácido palmítico (500 µM-1%BSA) por 24 ó 48 horas. En todos los casos las células permanecieron en cultivo hasta el día 5. Finalizado el período de incubación se extrajo el ARN total, se realizó la síntesis de ADNc y se determinaron los niveles de ARNm de FAT/CD36 mediante la técnica de RT-qPCR utilizando HPRT1 como gen control. Los resultados se expresan como veces de estímulo respecto al CONTROL de la relación FAT/CD36/HPRT1 de tres experimentos independientes (X±DS) (\*p<0.05 vs CONTROL).



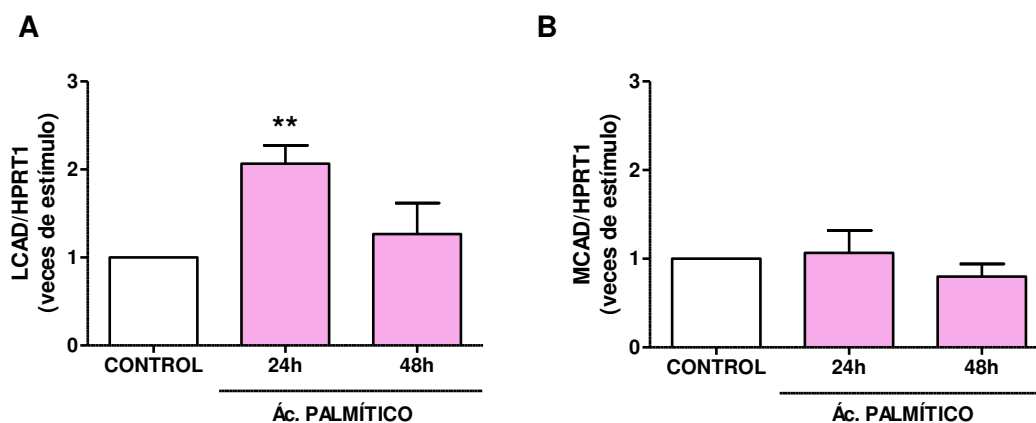
**Figura 26. Regulación de la expresión de CPT1 por ácido palmítico en células de Sertoli**

Las células de Sertoli fueron mantenidas en medio completo con 1% BSA (CONTROL) o incubadas con ácido palmítico (500  $\mu$ M-1%BSA) por 24 ó 48 horas. En todos los casos las células permanecieron en cultivo hasta el día 5. Finalizado el período de incubación se extrajo el ARN total y se determinaron los niveles de ARNm de CPT1 mediante la técnica de Northern Blot, utilizando el ARNr 18S como gen de carga. En la autorradiografía se muestra un experimento representativo de tres. En el gráfico de barras, los resultados se expresan como veces de estímulo respecto al CONTROL de la relación CPT1/18S de tres experimentos independientes ( $X \pm DS$ ) (\* $p < 0.05$  vs CONTROL).

### 3.d) Regulación de la expresión de LCAD y MCAD

Al analizar la expresión de LCAD y MCAD, se observó que el tratamiento con ácido palmítico por 24 horas aumenta la expresión de LCAD (figura 27A), mientras que los niveles de ARNm de MCAD no se modifican en ninguno de los tiempos estudiados (figura 27B).





**Figura 27. Regulación de la expresión de LCAD y MCAD por ácido palmítico en células de Sertoli**

Las células de Sertoli fueron mantenidas en medio completo con 1% BSA (CONTROL) o incubadas con ácido palmítico (500  $\mu$ M-1%BSA) por 24 ó 48 horas. En todos los casos las células permanecieron en cultivo hasta el día 5. Finalizado el período de incubación se extrajo el ARN total, se realizó la síntesis de ADNc y se determinaron los niveles de ARNm de **(A)** LCAD o **(B)** MCAD, mediante la técnica de RT-qPCR utilizando HPRT1 como gen control. Los resultados se expresan como veces de estímulo respecto al CONTROL de la relación LCAD/HPRT1 o MCAD/HPRT1 de tres experimentos independientes ( $X \pm DS$ ) (\*\* $p < 0.01$  vs CONTROL).

#### **4) Participación del PPAR $\beta/\delta$ en la regulación de la oxidación de ácidos y de la expresión de genes relacionados con su transporte y metabolismo por ácido palmítico**

El siguiente conjunto de experimentos fue diseñado con el objeto de analizar si la activación del PPAR  $\beta/\delta$  estaba involucrada en la regulación por ácido palmítico de la oxidación de ácidos grasos y de la expresión de FAT/CD36, CPT1 y LCAD. Para tal fin, los cultivos de células de Sertoli fueron estimulados con ácido palmítico en ausencia o presencia del antagonista del PPAR  $\beta/\delta$  (GSK) y se evaluaron las respuestas correspondientes.

##### *4.a) Participación de PPAR $\beta/\delta$ en la oxidación de ácidos grasos*

En la tabla V se muestran los resultados obtenidos para la oxidación de ácidos grasos luego del tratamiento con ácido palmítico en ausencia o presencia de GSK. Se observó que GSK disminuye parcialmente el estímulo que produce el ácido palmítico sobre la oxidación de ácidos grasos.

**Tabla V. Efecto de GSK en la regulación de la oxidación de ácidos grasos por ácido palmítico en células de Sertoli**

	CONTROL	GSK	ÁC.PALMÍTICO	ÁC.PALMÍTICO+GSK
pmol AG ox/h/ugADN	3,1 ±0,2 <sup>a</sup>	3,4±0,2 <sup>a</sup>	5,7 ±0,3 <sup>b</sup>	4,8 ±0,3 <sup>c</sup>

Las células de Sertoli fueron mantenidas en medio completo con 1% BSA (CONTROL) o tratadas con ácido palmítico (500  $\mu$ M-1%BSA) por 48 horas en ausencia o presencia de GSK (20  $\mu$ M). En todos los casos las células permanecieron en cultivo hasta el día 5. Luego del período de incubación se realizó el ensayo de oxidación de ácidos grasos sobre la monocapa celular. Los resultados se expresan como  $X \pm DS$  de los picomoles de ácido graso oxidado por hora y por  $\mu$ gADN (pmol AG ox/h/ $\mu$ gADN) se muestra un experimento representativo de tres realizados (letras diferentes indican diferencias significativas,  $p < 0.05$ ).

#### 4.b) Participación de PPAR $\beta/\delta$ en la expresión de FAT/CD36

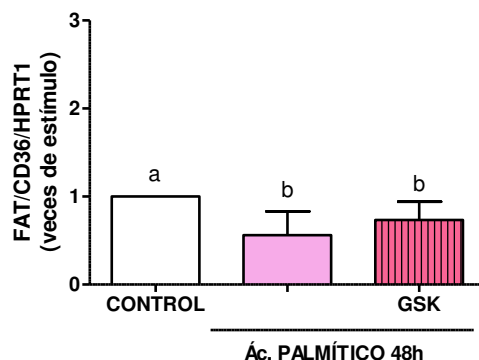
En la figura 28 se muestran los resultados obtenidos para los niveles de ARNm de FAT/CD36 luego del tratamiento con ácido palmítico por 48 horas en ausencia o presencia de GSK. Se observó que la disminución en los niveles de ARNm de FAT/CD36 inducida por ácido palmítico no se modifica en presencia de GSK.

#### 4.c) Participación de PPAR $\beta/\delta$ en la expresión de CPT1

La figura 29 muestra que la presencia de GSK inhibe el estímulo que produce el ácido palmítico sobre los niveles de ARNm de CPT1.

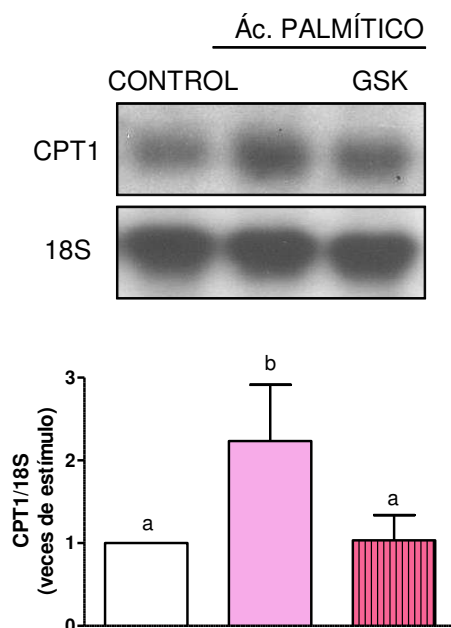
#### 4.d) Participación de PPAR $\beta/\delta$ en la expresión de LCAD

Finalmente, en la figura 30 se muestra que la presencia de GSK inhibe el estímulo que produce el ácido palmítico sobre los niveles de ARNm de LCAD.



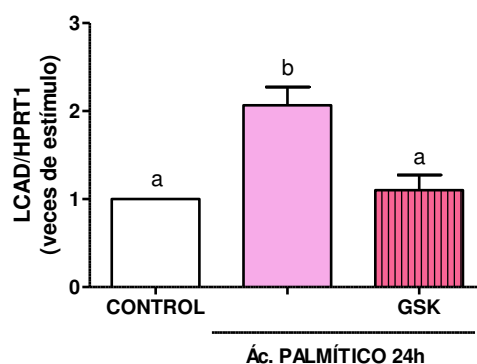
**Figura 28. Efecto de GSK en la regulación de la expresión de FAT/CD36 por ácido palmítico en células de Sertoli**

Las células de Sertoli fueron mantenidas en medio completo con 1% BSA (CONTROL) o tratadas con ácido palmítico (500  $\mu$ M-1%BSA) por 48 horas en ausencia o presencia de GSK (20  $\mu$ M). En todos los casos las células permanecieron en cultivo hasta el día 5. Finalizado el período de incubación se extrajo el ARN total, se realizó la síntesis de ADNc y se determinaron los niveles de ARNm de FAT/CD36 mediante la técnica de RT-qPCR utilizando HPRT1 como gen control. Los resultados se expresan como veces de estímulo respecto al CONTROL de la relación FAT/CD36/HPRT1 de tres experimentos independientes ( $X \pm DS$ ) (letras diferentes indican diferencias significativas,  $p < 0.05$ ).



**Figura 29. Efecto de GSK en la regulación de la expresión de CPT1 por ácido palmítico en células de Sertoli**

Las células de Sertoli fueron mantenidas en medio completo con 1% BSA (CONTROL) o tratadas con ácido palmítico (500  $\mu$ M-1%BSA) por 48 horas en ausencia o presencia de GSK (20  $\mu$ M). En todos los casos las células permanecieron en cultivo hasta el día 5. Finalizado el período de incubación se extrajo el ARN total y se determinaron los niveles de ARNm de CPT1 mediante la técnica de Northern Blot, utilizando el ARNr 18S como gen de carga. En la autorradiografía se muestra un experimento representativo de tres. En el gráfico de barras, los resultados se expresan como veces de estímulo respecto al CONTROL de la relación CPT1/18S de tres experimentos independientes ( $X \pm DS$ ) (Letras diferentes indican diferencias significativas,  $p < 0.05$ ).



**Figura 30. Efecto de GSK en la expresión de LCAD por ácido palmítico en células de Sertoli**

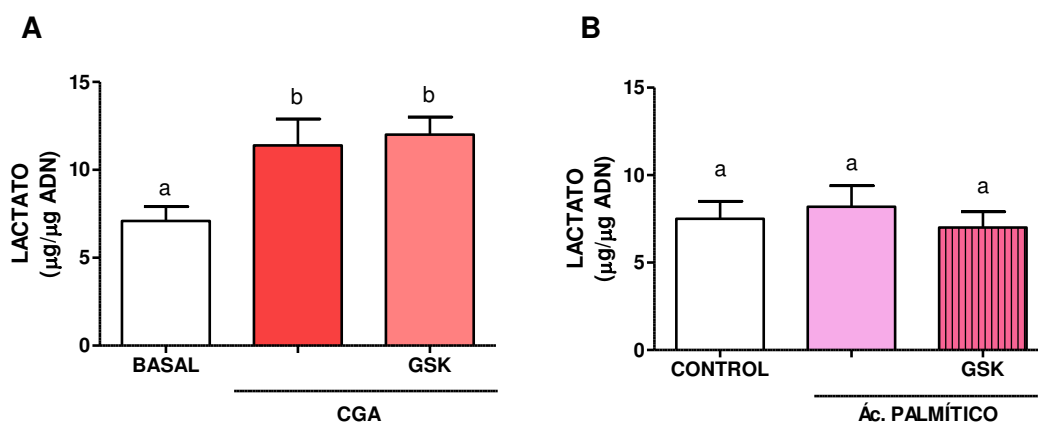
Las células de Sertoli fueron mantenidas en medio completo con 1% BSA (CONTROL) o tratadas con ácido palmítico (500  $\mu$ M-1%BSA) por 24 horas en ausencia o presencia de GSK (20  $\mu$ M). En todos los casos las células permanecieron en cultivo hasta el día 5. Finalizado el período de incubación se extrajo el ARN total, se realizó la síntesis de ADNc y se determinaron los niveles de ARNm de LCAD mediante la técnica de RT-qPCR utilizando HPRT1 como gen control. Los resultados se expresan como veces de estímulo respecto al CONTROL de la relación LCAD/HPRT1 de tres experimentos independientes ( $X \pm DS$ ) (letras diferentes indican diferencias significativas,  $p < 0.05$ ).

En resumen, este conjunto de resultados demuestra que el ácido palmítico aumenta la oxidación de ácidos grasos. Adicionalmente, demuestran que el ácido graso regula negativamente la expresión de FAT/CD36 y positivamente la expresión de CTP1 y LCAD. En la regulación ejercida por el ácido palmítico sobre la oxidación de ácidos grasos y la expresión de CTP1 y de LCAD estaría involucrada, al menos en parte, la activación de PPAR  $\beta/\delta$ .

### **5) Regulación de la producción de lactato por CGA y ácido palmítico. Participación de PPAR $\beta/\delta$**

Habíamos observado previamente que la activación farmacológica de PPAR  $\beta/\delta$  regula simultáneamente la oxidación de ácidos grasos y la producción de lactato. En las secciones inmediatamente anteriores se demostró un rol para dicho receptor en la regulación ejercida por CGA y por ácido palmítico sobre la oxidación de ácidos grasos. El conjunto de estas observaciones nos hizo pensar que las CGA y el ácido palmítico, no solamente podrían estar regulando la oxidación de ácidos grasos sino también la producción de lactato. Para responder a este interrogante, células de Sertoli en cultivo fueron

cocultivadas con CGA o tratadas con ácido palmítico y se determinó el lactato producido en el medio condicionado. Se observó que el cocultivo con CGA tiene un efecto estimulador sobre la producción de lactato y que dicho estímulo no se modifica en presencia de GSK (figura 31A). Por otro lado, se observó que el tratamiento con ácido palmítico no modifica la producción de lactato (figura 31B).



**Figura 31. Regulación de la producción de lactato por CGA y ácido palmítico en células de Sertoli. Efecto de GSK**

Las células de Sertoli fueron mantenidas **(A)** en condiciones basales (BASAL) o cocultivadas con CGA por 48 horas en ausencia o presencia de GSK (20 µM); **(B)** en medio completo con 1% BSA (CONTROL) o incubadas con ácido palmítico (500 µM-1%BSA) por 48 horas en ausencia o presencia de GSK (20 µM). En todos los casos las células permanecieron en cultivo hasta el día 5. Finalizado el período de incubación se determinó el lactato producido en el medio condicionado. Las incubaciones se realizaron por triplicado y los resultados se expresan como microgramos de lactato por µgADN ( $X \pm DS$ ), de un experimento representativo de tres, (letras diferentes indican diferencias significativas,  $p < 0.05$ ).

*Los resultados obtenidos en esta segunda parte del trabajo de tesis demuestran que las CGA regulan la expresión de genes implicados en el transporte y metabolismo de los ácidos grasos mediante la activación de PPAR  $\beta/\delta$ . Asimismo, sugieren que los ácidos grasos que podrían provenir de la hidrólisis de las gotas de lípidos –generadas por la fagocitosis de CGA– o del exterior de la célula, actuarían como ligandos de PPAR  $\beta/\delta$  regulando la expresión de genes involucrados en su propio metabolismo lo que aumentaría la capacidad de la célula de Sertoli para oxidarlos (figura 32). Los resultados observados con respecto a la producción de lactato se consideran en detalle en la discusión y no están mostrados en el presente esquema.*

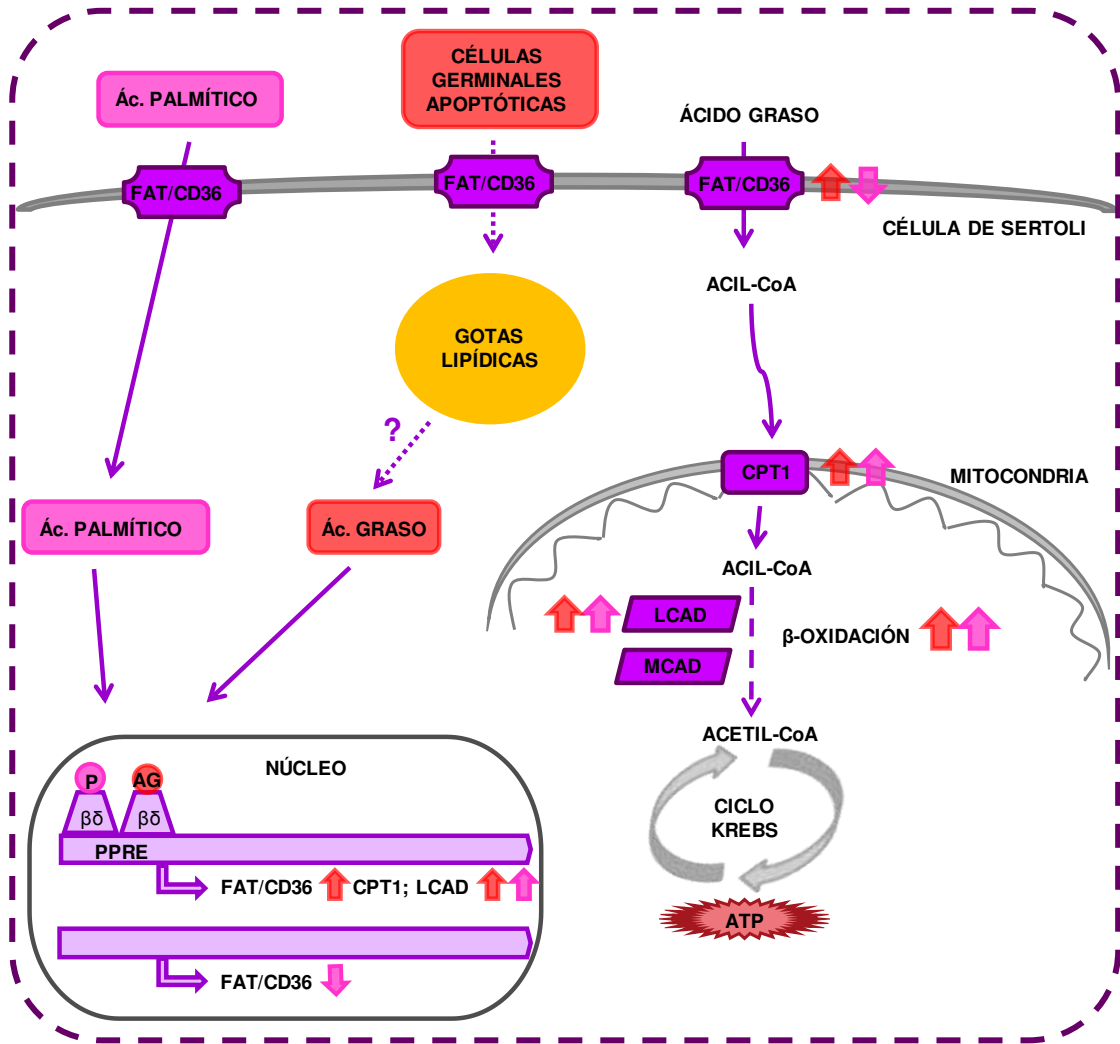


Figura 32. Esquema del modelo propuesto para los mecanismos fisiológicos de activación de PPAR  $\beta/\delta$  en la célula de Sertoli

La célula de Sertoli fagocita las CGA provocando un aumento el contenido de gotas de lípidos, estas últimas son fuente de ácidos grasos capaces de activar al PPAR  $\beta/\delta$  y regular la expresión de genes involucrados en el metabolismo de los mismos. Por otro lado, el ácido palmítico, ácido graso de mayor abundancia en la célula de Sertoli, es capaz de activar el PPAR  $\beta/\delta$  y regular la expresión génica y la oxidación de los ácidos grasos en este tipo celular.

### III. REGULACIÓN HORMONAL DE LA OXIDACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS. POSIBLE PARTICIPACIÓN DE PPAR $\beta/\delta$ EN DICHA REGULACIÓN Y EN LA PRODUCCIÓN DE LACTATO

Los receptores para la hormona hipofisaria FSH en el macho están presentes únicamente en la célula de Sertoli y dicha hormona es la ordenadora por excelencia de la funcionalidad de esta célula. Por otro lado, el factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF), uno de los factores proteicos de producción local, es considerado uno de los mensajeros paracrinos provenientes de las células germinales y sus acciones han sido interpretadas como representantes de la comunicación germinal-Sertoli. Se ha demostrado que ambas hormonas son capaces de regular la producción de lactato y varios de los procesos involucrados en dicha producción en la célula de Sertoli (Riera y col., 2001; 2002). Dado que el metabolismo de los ácidos grasos resulta fundamental para mantener los niveles energéticos de la célula de Sertoli, es pertinente pensar que el mismo también está regulado hormonalmente. En esta última sección de resultados se analiza la posible regulación hormonal de la oxidación de ácidos grasos y de la expresión de genes relacionados con el transporte y metabolismo de los mismos. Asimismo, se analiza la posible participación del PPAR  $\beta/\delta$  en la regulación hormonal del metabolismo de ácidos grasos y de la producción de lactato.

#### 1) Regulación de la oxidación de ácidos grasos por FSH y bFGF

Las tablas VI y VII respectivamente muestran los resultados obtenidos en cuanto a la oxidación de ácidos grasos en cultivos de células de Sertoli estimulados con FSH (100 ng/ml) y bFGF (30 ng/ml) por 24 y 48 horas. Se observó que el tratamiento por 48 horas con FSH disminuye la oxidación de ácidos grasos. Por otro lado, se observó que el tratamiento por 48 horas con bFGF provoca un incremento en la oxidación de ácidos grasos.

Tabla VI. Regulación de la oxidación de ácidos grasos por FSH en células de Sertoli

	BASAL	FSH 24h	FSH 48h
pmol AG ox/h/ $\mu$ gADN	3,3 $\pm$ 0,2	3,0 $\pm$ 0,1	2,3 $\pm$ 0,1***

Las células de Sertoli fueron mantenidas en condiciones basales (BASAL) o tratadas con FSH (100 ng/ml) por 24 ó 48 horas. En todos los casos las células permanecieron en cultivo hasta el día 5. Luego del período de incubación se realizó el ensayo de oxidación de ácidos grasos sobre la monocapa celular. Las incubaciones se realizaron por triplicado y los resultados se expresan como  $X \pm DS$  de los picomoles de ácido graso oxidado por hora y por  $\mu$ gADN (pmol AG ox/h/ $\mu$ gADN). Se muestra un experimento representativo de tres realizados (\*\*p<0.001 vs BASAL).

Tabla VII. Regulación de la oxidación de ácidos grasos por bFGF en células de Sertoli

	BASAL	bFGF 24h	bFGF 48h
pmol AG ox/h/ $\mu$ gADN	3,3 $\pm$ 0,2	2,8 $\pm$ 0,2	4,0 $\pm$ 0,1**

Las células de Sertoli fueron mantenidas en condiciones basales (BASAL) o tratadas con bFGF (30 ng/ml) por 24 ó 48 horas. En todos los casos las células permanecieron en cultivo hasta el día 5. Luego del período de incubación se realizó el ensayo de oxidación de ácidos grasos sobre la monocapa celular. Las incubaciones se realizaron por triplicado y los resultados se expresan como  $X \pm DS$  de los picomoles de ácido graso oxidado por hora y por  $\mu$ gADN (pmol AG ox/h/ $\mu$ gADN). Se muestra un experimento representativo de tres realizados (\*\*p<0.01 vs BASAL).

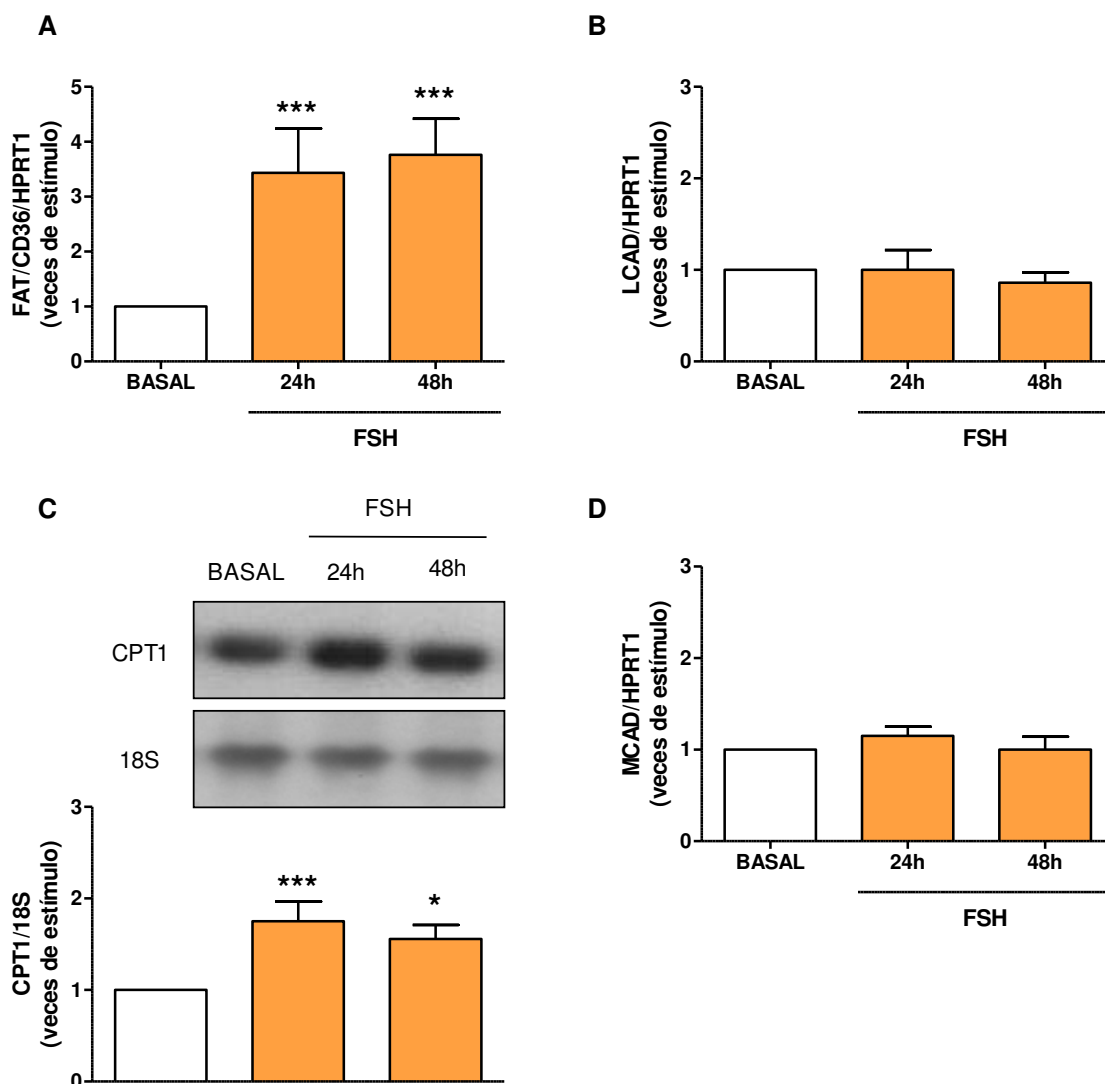
## 2) Regulación de la expresión de genes relacionados con el transporte y metabolismo de ácidos grasos por FSH y bFGF

En base a los resultados obtenidos anteriormente se decidió analizar los mecanismos moleculares que podrían ser responsables de la regulación por FSH y bFGF observada. Con tal objetivo, analizamos si FSH y bFGF regulaban la expresión de genes relacionados con el transporte y el metabolismo de ácidos grasos.

### 2.a) Regulación de la expresión de FAT/CD36, CPT1, LCAD y MCAD por FSH

En la figura 33 se muestran los resultados obtenidos para los niveles de ARNm de FAT/CD36, CPT1, LCAD y MCAD luego del tratamiento de las células con FSH. Se observó que FSH estimula la expresión de FAT/CD36 y CPT1 en ambos tiempos estudiados (figura 33A y 33C, respectivamente) y no modifica los niveles de LCAD ni MCAD (figura 33B y 33D, respectivamente).





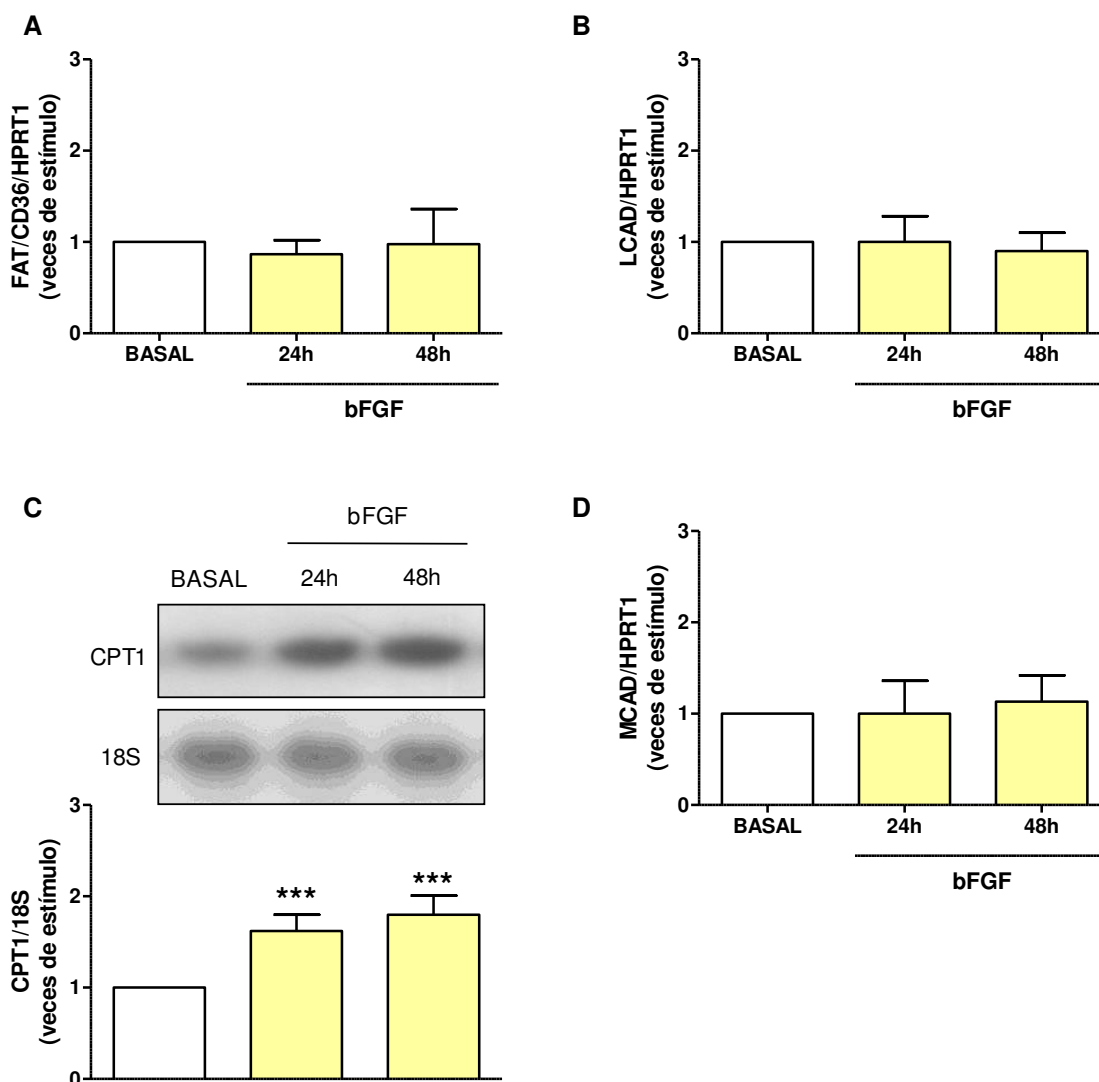
**Figura 33. Regulación de la expresión de FAT/CD36, CPT1, LCAD y MCAD por FSH en células de Sertoli**

Las células de Sertoli fueron mantenidas en condiciones basales (BASAL) o estimuladas con FSH (100 ng/ml) por 24 ó 48 horas. En todos los casos las células permanecieron en cultivo hasta el día 5. Finalizado el período de incubación se extrajo el ARN total. Se realizó la síntesis de ADNc y se determinaron mediante la técnica de RT-qPCR los niveles de ARNm de FAT/CD36 (**A**), LCAD (**B**) y MCAD (**D**) utilizando HPRT1 como gen de carga. Los resultados se expresan como veces de estímulo respecto al BASAL de la relación FAT/CD36/HPRT1, LCAD/HPRT1 o MCAD/HPRT1 de tres experimentos independientes ( $X \pm DS$ ), (\*\*\*) $p < 0.001$  vs BASAL). (**C**) Se determinaron los niveles de ARNm de CPT1 mediante la técnica de Northern Blot, utilizando el ARNr 18S como gen de carga. En la autorradiografía se muestra un experimento representativo de tres. En el gráfico de barras, los resultados se expresan como veces de estímulo respecto al BASAL de la relación CPT1/18S de tres experimentos independientes ( $X \pm DS$ ) (\* $p < 0.05$ , \*\*\*) $p < 0.001$  vs BASAL).

*2.b) Regulación de la expresión de FAT/CD36, CPT1, LCAD y MCAD por bFGF*

En la figura 34 se muestran los resultados obtenidos para los niveles de ARNm de FAT/CD36, CPT1, LCAD y MCAD luego del tratamiento de las células con bFGF. Se

observó que bFGF estimula la expresión de CPT1 en ambos tiempos estudiados (figura 34C) mientras que no modifica los niveles de FAT/CD36, LCAD y MCAD (figura 34A, 34B y 34D, respectivamente).



**Figura 34. Regulación de la expresión de FAT/CD36, CPT1, LCAD y MCAD por bFGF en células de Sertoli**

Las células de Sertoli fueron mantenidas en condiciones basales (BASAL) o estimuladas con bFGF (30 ng/ml) por 24 ó 48 horas. En todos los casos las células permanecieron en cultivo hasta el día 5. Finalizado el período de incubación se extrajo el ARN total. Se realizó la síntesis de ADNc y se determinaron mediante la técnica de RT-qPCR los niveles de ARNm de FAT/CD36 (A), LCAD (B) y MCAD (D) utilizando HPRT1 como gen de carga. Los resultados se expresan como veces de estímulo respecto al BASAL de la relación FAT/CD36/HPRT1, LCAD/HPRT1 o MCAD/HPRT1 de tres experimentos independientes ( $X \pm DS$ ). (C) Se determinaron los niveles de ARNm de CPT1 mediante la técnica de Northern Blot, utilizando el ARNr 18S como gen de carga. En la autorradiografía se muestra un experimento representativo de tres. En el gráfico de barras, los resultados se expresan como veces de estímulo respecto al BASAL de la relación CPT1/18S de tres experimentos independientes ( $X \pm DS$ ) (\*\*\*)  $p < 0.001$  vs BASAL).

En resumen, el conjunto de este grupo de resultados muestra que la FSH inhibe la oxidación de ácidos grasos mientras que al mismo tiempo aumenta la expresión de FAT/CD36 y de CPT1. Por otro lado, los resultados muestran que bFGF aumenta la oxidación de ácidos grasos y que dicho aumento está acompañado por un incremento en la expresión de CPT1.

### **3) Participación de PPAR $\beta/\delta$ en la regulación del metabolismo de ácidos grasos y en la producción de lactato por FSH**

En los puntos 1 y 2 de esta tercera sección se mostró que FSH regula negativamente la oxidación de ácidos grasos mientras que estimula la expresión de FAT/CD36 y CPT1. El siguiente grupo de experimentos evalúa la participación de PPAR  $\beta/\delta$  en los efectos observados. Asimismo, la posible participación de PPAR  $\beta/\delta$  en el ya bien conocido aumento de la producción de lactato que es producido por FSH.

Para cumplir con este objetivo, cultivos de células de Sertoli fueron incubados con FSH en ausencia o presencia del antagonista de PPAR  $\beta/\delta$ , GSK.

#### *3.a) Participación de PPAR $\beta/\delta$ en la oxidación de ácidos grasos y en la expresión de FAT/CD36 y de CPT1*

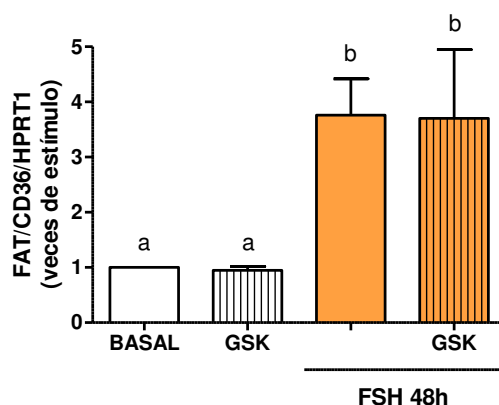
La tabla VIII muestra que la inhibición ejercida por FSH sobre la oxidación de ácidos grasos no se modifica en presencia del antagonista de PPAR  $\beta/\delta$ .

**Tabla VIII. Efecto de GSK en la regulación de la oxidación de ácidos grasos por FSH en células de Sertoli**

	BASAL	GSK	FSH 48h	FSH48h+GSK
<b>pmolAGox/h/μgADN</b>	<b>3,1±0,1<sup>a</sup></b>	<b>3,4±0,2<sup>a</sup></b>	<b>2,3±0,1<sup>b</sup></b>	<b>2,6±0,2<sup>b</sup></b>

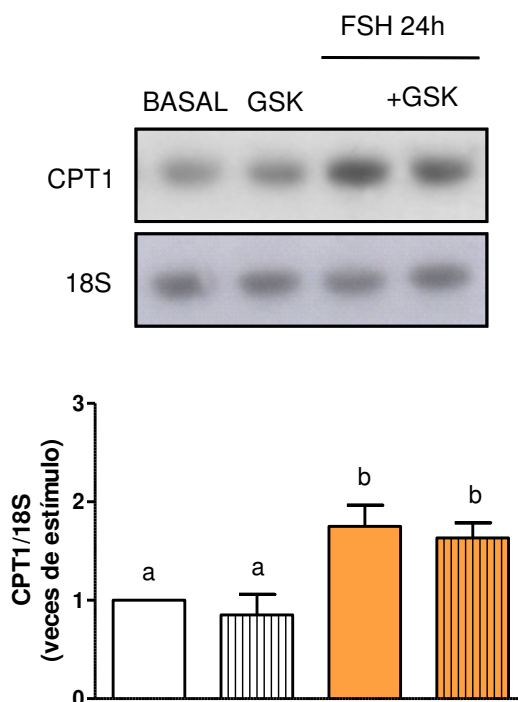
Las células de Sertoli fueron mantenidas en condiciones basales (BASAL) o tratadas con FSH (100 ng/ml) por 48 horas en ausencia o presencia de GSK (20 μM). En todos los casos las células permanecieron en cultivo hasta el día 5. Luego del período de incubación se realizó el ensayo de oxidación de ácidos grasos sobre la monocapa celular. Las incubaciones se realizaron por triplicado y los resultados se expresan como X±DS de los picomoles de ácido graso oxidado por hora y por μgADN (pmol AG Ox/h/μgADN). Se muestra un experimento representativo de tres realizados (letras diferentes indican diferencias significativas, p<0.01).

Adicionalmente, la figura 35 muestra que la presencia de GSK no modifica los niveles de ARNm de FAT/CD36 que se alcanzan por el estímulo con FSH. Del mismo modo, en la figura 36 se muestran los resultados obtenidos para los niveles de ARNm de CPT1 luego del estímulo con FSH por 24 horas en ausencia o presencia de GSK. Se observó que el aumento ejercido por FSH sobre los niveles de ARNm de CPT1 no se modifica en presencia del antagonista de PPAR β/δ.



**Figura 35. Efecto de GSK en la regulación de la expresión de FAT/CD36 por FSH en células de Sertoli**

Las células de Sertoli fueron mantenidas en condiciones basales (BASAL) o tratadas con FSH (100 ng/ml) por 48 horas en ausencia o presencia de GSK (20 μM). En todos los casos las células permanecieron en cultivo hasta el día 5. Finalizado el período de incubación se extrajo el ARN total, se realizó la síntesis de ADNc y se determinaron los niveles de ARNm de FAT/CD36 mediante la técnica de RT-qPCR utilizando HPRT1 como gen de carga. Los resultados se expresan como veces de estímulo respecto al BASAL de la relación FAT/CD36/HPRT1 de tres experimentos independientes (X±DS) (letras diferentes indican diferencias significativas, p<0.001).

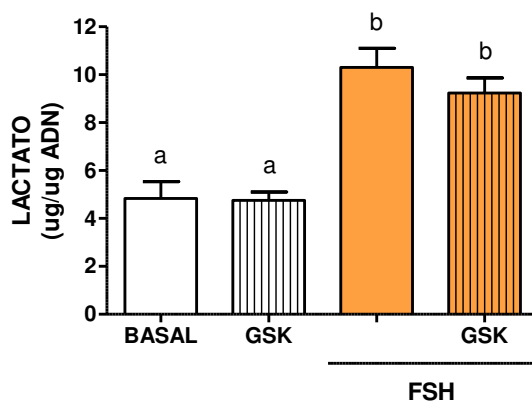


**Figura 36. Efecto de GSK en la regulación de la expresión de CPT1 por FSH en células de Sertoli**

Las células de Sertoli fueron mantenidas en condiciones basales (BASAL) o tratadas con FSH (100 ng/ml) por 24 horas en ausencia o presencia de GSK (20  $\mu$ M). En todos los casos las células permanecieron en cultivo hasta el día 5. Finalizado el período de incubación se extrajo el ARN total y se determinaron los niveles de ARNm de CPT1 mediante la técnica de Northern Blot, utilizando el ARNr 18S como gen de carga. En la autorradiografía se muestra un experimento representativo de tres. En el gráfico de barras, los resultados se expresan como veces de estímulo respecto al BASAL de la relación CPT1/18S de tres experimentos independientes ( $X \pm DS$ ) (letras diferentes indican diferencias significativas,  $p < 0.001$ ).

### 3.b) Participación de PPAR $\beta/\delta$ en la producción de lactato

Si bien se sabe que FSH estimula la producción de lactato y se conocen diversas señales de transducción involucradas, se desconoce si el PPAR  $\beta/\delta$  –PPAR cuya activación aumenta la producción de lactato— participa en el mecanismo de acción utilizado por la hormona. La figura 37 muestra que la presencia de GSK no modifica el estímulo por FSH de la producción de lactato.



**Figura 37. Efecto de GSK en la regulación de la producción de lactato por FSH en células de Sertoli**

Las células de Sertoli fueron mantenidas en condiciones basales (BASAL) o incubadas por 48 horas con FSH (100 ng/ml) en ausencia o presencia de GSK (20  $\mu$ M). En todos los casos las células permanecieron en cultivo hasta el día 5. Finalizado el período de incubación se determinó el lactato producido en el medio condicionado. Las incubaciones se realizaron por triplicado y los resultados se expresan como microgramos de lactato por  $\mu$ gADN ( $X \pm DS$ ). Se muestra un experimento representativo de tres realizados, (letras diferentes indican diferencias significativas,  $p < 0.001$ ).

#### **4) Participación de PPAR $\beta/\delta$ en la regulación del metabolismo de ácidos grasos y en la producción de lactato por bFGF**

En los puntos 1 y 2 de esta tercera sección de resultados se demostró que el bFGF aumenta la oxidación de ácidos grasos y que dicho aumento está acompañado por un incremento en la expresión de CPT1. El siguiente y último grupo de experimentos estuvieron diseñados para analizar la participación de PPAR  $\beta/\delta$  en la regulación de la oxidación de ácidos grasos y en la expresión de CPT1. Asimismo, la posible participación de PPAR  $\beta/\delta$  en el ya bien conocido aumento de la producción de lactato que es producido por bFGF.

Para cumplir con este objetivo, cultivos de células de Sertoli fueron incubados con bFGF en ausencia o presencia del antagonista de PPAR  $\beta/\delta$ , GSK.

##### *4.a) Participación de PPAR $\beta/\delta$ en la oxidación de ácidos grasos y en la expresión de CPT1*

La tabla IX muestra que el aumento por bFGF de la oxidación de ácidos grasos disminuye en presencia del antagonista del PPAR  $\beta/\delta$ .

Tabla IX. Efecto de GSK en la regulación de la oxidación de ácidos grasos por bFGF en células de Sertoli

	BASAL	GSK	bFGF 48h	bFGF48h+GSK
pmol AG ox/h/μgADN	3,1±0,1 <sup>a</sup>	3,4±0,2 <sup>a</sup>	4,2±0,2 <sup>b</sup>	3,4±0,2 <sup>a</sup>

Las células de Sertoli fueron mantenidas en condiciones basales (BASAL) o tratadas con bFGF (30 ng/ml) por 48 horas en ausencia o presencia de GSK (20 μM). En todos los casos las células permanecieron en cultivo hasta el día 5. Luego del período de incubación se realizó el ensayo de oxidación de ácidos grasos sobre la monocapa celular. Las incubaciones se realizaron por triplicado y los resultados se expresan como X±DS de los picomoles de ácido graso oxidado por hora y por μgADN (pmol AG ox/h/μgADN). Se muestra un experimento representativo de tres realizados (letras diferentes indican diferencias significativas, p<0.001).

Del mismo modo, la figura 38 muestra que la presencia de GSK disminuye el efecto de bFGF sobre los niveles de ARNm de CPT1.

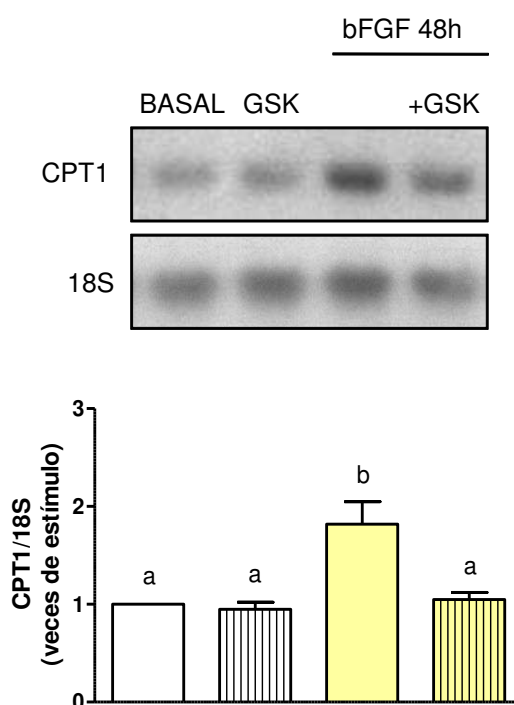


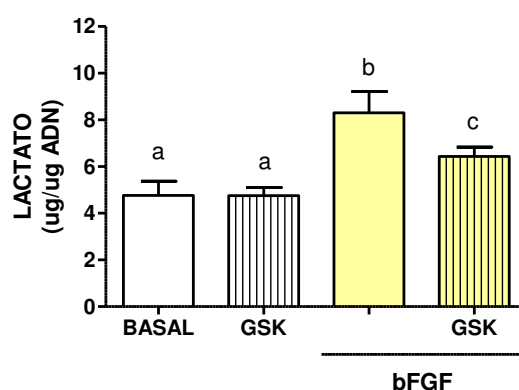
Figura 38. Efecto de GSK en la regulación de la expresión de CPT1 por bFGF en células de Sertoli

Las células de Sertoli fueron mantenidas en condiciones basales (BASAL) o tratadas con bFGF (30 ng/ml) por 48 horas en ausencia o presencia de GSK (20 μM). En todos los casos las células permanecieron en cultivo hasta el día 5. Finalizado el período de incubación se extrajo el ARN total y se determinaron los niveles de ARNm de CPT1 mediante la técnica de Northern Blot, utilizando el ARNr 18S como gen de carga. En la autorradiografía se muestra un experimento representativo de tres. En el gráfico de barras, los resultados se expresan como veces de estímulo respecto al BASAL de la relación CPT1/18S de tres experimentos independientes (X±DS) (letras diferentes indican diferencias significativas, p<0.001).

#### 4.b) Participación de PPAR $\beta/\delta$ en la producción de lactato

Como se mencionó en la introducción, el bFGF estimula la producción de lactato a través de la regulación de varios mecanismos moleculares (Riera y col., 2002). Se desconocía hasta el momento si en dicha regulación de la producción de lactato por bFGF participaba el PPAR  $\beta/\delta$ .

La figura 39 muestra que la presencia del antagonista del PPAR  $\beta/\delta$  disminuye parcialmente el estímulo ejercido por bFGF en la producción de lactato.



**Figura 39. Efecto de GSK en la regulación de la producción de lactato por bFGF en células de Sertoli**

Las células de Sertoli fueron mantenidas en condiciones basales (BASAL) o incubadas por 48 horas con bFGF (30 ng/ml) en ausencia y presencia de GSK (20  $\mu$ M). En todos los casos las células permanecieron en cultivo hasta el día 5. Finalizado el período de incubación se determinó el lactato producido en el medio condicionado. Las incubaciones se realizaron por triplicado y los resultados se expresan como microgramos de lactato por  $\mu$ gADN ( $X \pm DS$ ). Se muestra un experimento representativo de tres realizados, (letras diferentes indican diferencias significativas,  $p < 0.05$ ).

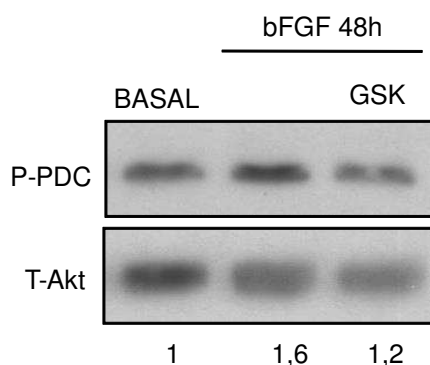
#### 4.c) Regulación de los niveles de PDC fosforilado. Participación de PPAR $\beta/\delta$ .

En la primera sección de resultados de esta tesis se demostró que la activación farmacológica de PPAR  $\beta/\delta$  aumenta la producción de lactato y que dicho incremento puede ser explicado por un aumento en los niveles de PDC fosforilado, que llevará a una mayor disponibilidad de piruvato para su conversión a lactato. En el punto anterior (4.b) se acaba de demostrar que el factor de transcripción PPAR  $\beta/\delta$  participa en la regulación por bFGF de la producción de lactato. Por lo tanto, el último experimento estuvo destinado a analizar si el



bFGF regulaba los niveles de P-PDC y si existía participación de PPAR  $\beta/\delta$  en dicha regulación.

La figura 40 muestra que bFGF aumenta los niveles de P-PDC y que dicho incremento disminuye, al menos en parte, en presencia del antagonista del PPAR  $\beta/\delta$ .



**Figura 40. Efecto de GSK en la regulación de los niveles de P-PDC por bFGF en células de Sertoli**

Las células de Sertoli fueron mantenidas en condiciones basales (BASAL) o tratadas por 48 horas con bFGF (30 ng/ml) en ausencia o presencia de GSK (20  $\mu$ M). En todos los casos las células permanecieron en cultivo hasta el día 5. Los extractos celulares fueron utilizados para el análisis de Western Blot para P-PDC y T-Akt. Los números debajo de la autorradiografía indican los resultados obtenidos luego del análisis densitométrico y se expresan los resultados como veces de estímulo con respecto al BASAL de la relación P-PDC/T-Akt. Se muestra un experimento representativo de tres.

En resumen, los resultados demuestran que en el mecanismo de acción de bFGF, pero no en el de FSH, participa la activación del factor de transcripción PPAR  $\beta/\delta$ .

*Los resultados obtenidos en esta tercera parte del trabajo de tesis sugieren que el metabolismo de los ácidos grasos en la célula de Sertoli es regulado hormonalmente de manera diferencial. Se observó que FSH inhibe la oxidación de ácidos grasos, mientras que aumenta la expresión de FAT/CD36 y CPT1 sin participación de la activación de PPAR  $\beta/\delta$ . Por otro lado, se observó que el bFGF aumenta la oxidación de ácidos grasos, la expresión de CPT1 y la producción de lactato en forma dependiente, al menos en parte, de la activación de PPAR  $\beta/\delta$ . En su conjunto, estos resultados revelan la existencia de una regulación hormonal de mecanismos moleculares que es muy compleja y que creemos contribuye al ajuste fino de la funcionalidad de la célula de Sertoli (figura 41).*

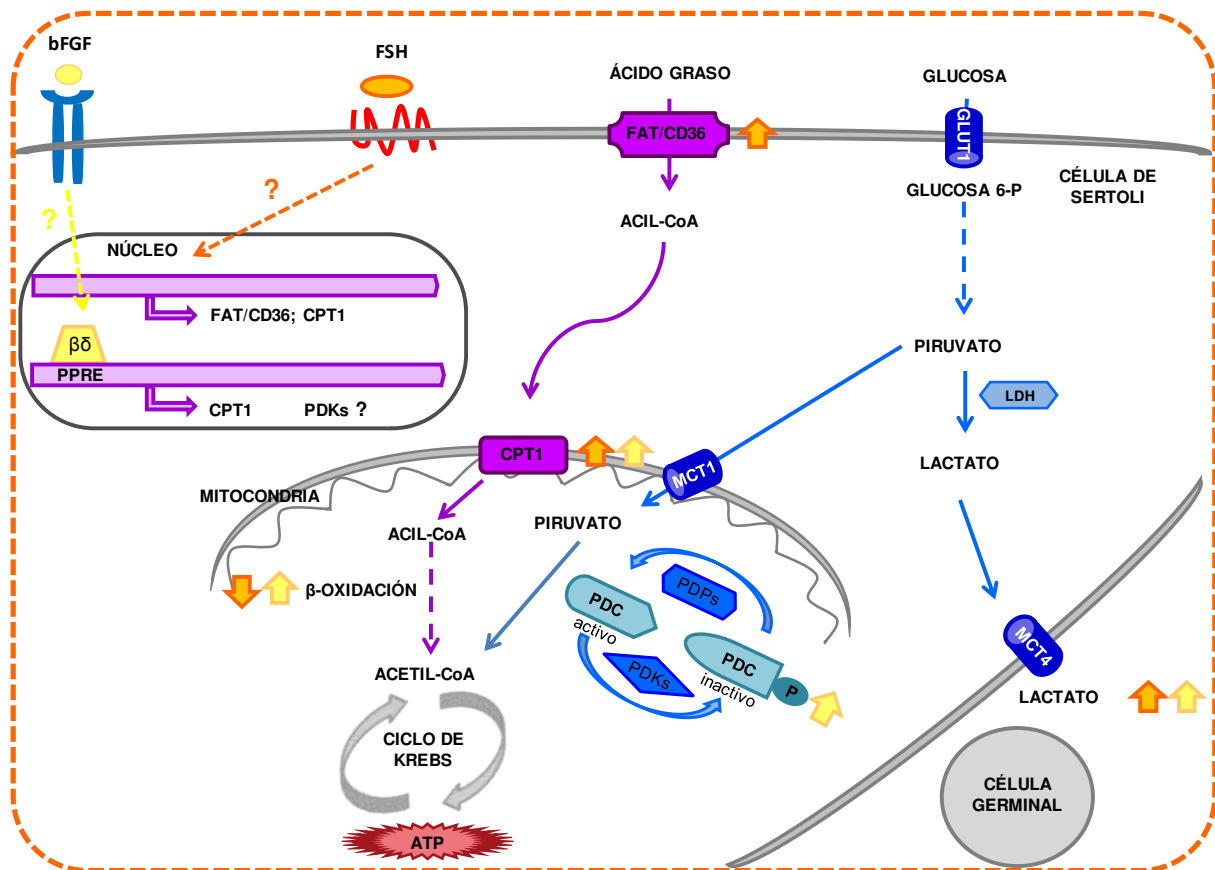


Figura 41. Esquema del modelo propuesto para los mecanismos moleculares involucrados en el metabolismo de ácidos grasos y la producción de lactato regulados por FSH y bFGF en la célula de Sertoli.

En la célula de Sertoli el estímulo hormonal con FSH regula la expresión de genes relacionados con el transporte de ácidos grasos y la producción de lactato sin participación de la activación de PPAR β/δ. Por el otro lado, el estímulo con bFGF regula la expresión de CPT1, la oxidación de ácidos grasos y la producción de lactato con participación de la activación de PPAR β/δ.

## DISCUSIÓN

Una espermatogénesis exitosa es la base de la fertilidad masculina y sin lugar a dudas las células de Sertoli juegan un rol esencial en la misma. La célula de Sertoli no sólo es primordial en el mantenimiento posicional de las células germinales, sino que también aporta los nutrientes que hacen posible el normal desarrollo de estas últimas células (Russell, 1993). Es por esta razón que se hace necesario comprender en profundidad cómo se regula el metabolismo energético en las células de Sertoli. El entendimiento de dicho metabolismo en cuanto a los sustratos preferidos, los metabolitos producidos y los mecanismos de adaptación a diferentes condiciones constituyen un punto de partida para comprender trastornos de la fertilidad masculina que no han podido ser aclarados hasta el momento sobre la base de los conocimientos existentes.

La espermatogénesis es un proceso sumamente complejo en el cual se pueden diferenciar cuatro etapas, a) la etapa mitótica o proliferativa, b) la etapa meiótica, c) la espermiogénesis y d) la espermiación. Todas las etapas de la espermatogénesis poseen regulación por FSH y andrógenos en forma variable. Sin embargo, ninguna de las células de la línea germinal posee receptores para dichas hormonas. Los investigadores en el tema están de acuerdo con que las células de Sertoli, el único componente somático del túbulo seminífero, son las principales células blanco de la acción de FSH y andrógenos. Aun así, los mecanismos y la extensión de dicha regulación hormonal, a pesar de las numerosas investigaciones realizadas, no han sido todavía aclarados en forma definitiva. Los estudios morfológicos e histoquímicos demuestran además, que la función de la célula de Sertoli varía a través del ciclo del epitelio seminífero dependiendo de los estadios de la espermatogénesis, es decir varía de acuerdo al complemento de células germinales asociado (Parvinen, 1982). Por lo tanto, se ha llegado a la conclusión que una espermatogénesis normal requiere un continuo y estrecho diálogo entre las células germinales y la célula de Sertoli y además que, el metabolismo de esta célula debe ser

estrictamente regulado para satisfacer los requerimientos energéticos propios y al mismo tiempo aquellos del complemento cambiante de células germinales en desarrollo.

El objetivo general de este trabajo de tesis fue tratar de dilucidar aspectos del metabolismo energético del túbulo seminífero que no habían sido analizados aún en la célula de Sertoli. En particular, estudiar nuevos mecanismos esenciales en la obtención de energía para las células de Sertoli y las células germinales en desarrollo tales como la oxidación de ácidos grasos y la producción de lactato, respectivamente.

El metabolismo energético en el túbulo seminífero tiene características que le son propias. El lactato, producido a partir del metabolismo de la glucosa en las células de Sertoli, es el metabolito energético más importante para espermatocitos y espermatides (Jutte y col., 1981). Como consecuencia de lo antedicho, se postuló que los requerimientos energéticos de la célula de Sertoli no podían ser alcanzados en su totalidad por el metabolismo de la mencionada aldohexosa y que la oxidación de los ácidos grasos satisfacía tales requerimientos. Reforzando esta hipótesis, Jutte y colaboradores (1985) demostraron que el palmitato puede ser oxidado a  $\text{CO}_2$  y cuerpos cetónicos y postularon que la célula de Sertoli utiliza ácidos grasos como su principal fuente energética. Curiosamente y desde entonces, el metabolismo de los ácidos grasos en la célula de Sertoli no ha sido extensamente estudiado.

Hasta el momento en que se inició este trabajo de tesis, se sabía que la célula de Sertoli posee el sistema enzimático completo de oxidación de ácidos grasos en la mitocondria: las acil-CoA deshidrogenasas de cadena muy larga (VLCAD), larga (LCAD), media (MCAD) y corta (SCAD), la enoil-CoA hidratasa, la L-3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa y la  $\beta$ -cetotilasa (Fukasawa y col., 2010). Asimismo, se había demostrado la existencia de proteínas transportadoras de ácidos grasos en la membrana plasmática, como el FAT/CD36 (Gillot y col., 2005) y la presencia de la enzima que participa en la translocación de acil-CoAs a la mitocondria, la carnitina palmitoil transferasa 1 (CPT1) (Adams y col., 1998). Sin embargo, los estudios mencionados no analizaron la regulación de

la expresión de estas proteínas y su posible relación con la oxidación de ácidos grasos en la célula de Sertoli.

Como se mencionó en la introducción, algunos de los miembros de los factores de transcripción de la familia de los PPARs están relacionados con la regulación de la oxidación de ácidos grasos en distintos tipos celulares. En particular en la célula de Sertoli, se había demostrado la presencia de PPAR  $\alpha$  y PPAR  $\beta/\delta$  (Braissant y col., 1996). Sin embargo, no existían hasta el momento del presente trabajo estudios que hubieran analizado la posible relación entre la activación de PPAR  $\alpha$  o PPAR  $\beta/\delta$  y el metabolismo de ácidos grasos en la célula de Sertoli. Es por ello que en la primera parte de este trabajo de tesis decidimos investigar esta posible relación.

En los últimos años se han diseñado múltiples moléculas capaces de activar a las distintas isoformas de PPARs. Los ligandos sintéticos más conocidos capaces de activar el PPAR y pertenecen a la familia de las glitazonas, drogas utilizadas para el tratamiento de la Diabetes Mellitus tipo 2. Entre ellas se encuentran la rosiglitazona, pioglitazona, troglitazona y GW7845. En cuanto a la activación farmacológica de PPAR  $\alpha$ , los fibratos son los ligandos sintéticos más ampliamente utilizados. Esta familia de compuestos se utiliza en la clínica para el tratamiento de las dislipidemias, entre ellos se encuentran el clofibrato, fenofibrato, gemfibrozilo y WY14643. Por último, los ligandos farmacológicos del PPAR  $\beta/\delta$  son la carbaprostaglandina e iloprost -análogos sintéticos de la prostaglandina  $I_2$  o prostaciclina-, GW501516, L-165041 y GW0742, entre otros. Estas drogas además de ser utilizadas en el tratamiento de diversas patologías han sido muy útiles para esclarecer en los distintos tejidos el papel de los PPARs en el metabolismo celular (Li y col., 2013; Kim y col., 2013; Festuccia y col., 2008; Kersten y Wahli, 2000; Desvergne y col., 2004; Bensinger y Tontonoz, 2008).

El aumento en la oxidación de ácidos grasos por activación farmacológica de los PPARs ha sido observado en diversos tipos celulares tales como en las fibras del músculo esquelético (Dressel y col., 2003) y la línea celular hepática HepG2 (Minnich y col., 2001). Adicionalmente, se ha observado que la activación de los PPARs está acompañada por un

aumento en la expresión de genes implicados en el transporte y catabolismo de ácidos grasos. Estas observaciones fueron realizadas utilizando diferentes tejidos tales como músculo esquelético (Finck y col., 2005), músculo cardíaco (Burkart y col., 2007), tejido adiposo (Ribet y col., 2010) e hígado (Sanderson y col., 2009). Se sabe que algunos de los genes vinculados con el transporte, activación, unión y oxidación de ácidos grasos presentan en su región promotora sitios de respuesta a los PPARs (PPRE), lo que explicaría el aumento en la oxidación de ácidos grasos observada (Gulick y col., 1994; Teboul y col., 2001; Mandard y col., 2004). En el presente trabajo de tesis utilizando los activadores farmacológicos WY14643 y GW0742 (WY, GW) se demostró que en células de Sertoli la activación de PPAR  $\alpha$  y PPAR  $\beta/\delta$  respectivamente aumenta la oxidación de ácidos grasos. Se decidió por lo tanto analizar si bajo las mismas condiciones experimentales se modificaba la expresión de genes involucrados en el transporte y metabolismo de ácidos grasos que permitiera explicar el aumento en la oxidación de ácidos grasos observado en este tipo celular.

Como se mencionó en la introducción, el transporte facilitado de ácidos grasos es mediado por proteínas integrales de membrana entre las que se encuentra el FAT/CD36 (Bonen y col., 2004; Holloway y col., 2008). La importancia de esta proteína en el metabolismo de ácidos grasos y de lipoproteínas ha sido demostrada utilizando ratones *knock-out* (KO) para la misma (Febbraio y col., 1999; 2002). Con relación a la regulación de la expresión de FAT/CD36 en células de Sertoli pudimos demostrar que la activación farmacológica de PPAR  $\alpha$  y PPAR  $\beta/\delta$  aumenta los niveles de ARNm del transportador. Un aumento en la expresión de FAT/CD36 por ligandos de PPARs había sido observado en otros tejidos. En este sentido, Motojima y colaboradores (1998) demostraron que la activación de PPAR  $\alpha$  en hígado y de PPAR  $\gamma$  en adipocito aumenta la expresión del transportador. Estos investigadores no hallaron sitios PPRE en el promotor del gen y sugirieron que la regulación de la expresión de FAT/CD36 por activación de PPARs se ejercía en forma indirecta (Sato y col., 2002). En forma simultánea, Teboul y colaboradores (2001), quienes analizaron cuidadosamente el promotor de FAT/CD36, demostraron

concluyentemente que el mismo tiene dos sitios PPRE cuya activación es responsable del aumento de su expresión durante la diferenciación del adipocito. Desde entonces es ampliamente aceptado que el promotor del gen de FAT/CD36 presenta sitios de regulación por PPARs. De esta forma, el aumento de la expresión de FAT/CD36 en la célula de Sertoli como consecuencia de la activación de PPAR  $\alpha$  y PPAR  $\beta/\delta$  probablemente pueda explicarse por una acción directa sobre los sitios PPRE en el promotor del gen. Cabe mencionar que se ha detectado la presencia de FAT/CD36 en células de Sertoli en contacto con los cuerpos residuales –porciones citoplasmáticas de la espermátide elongada removidas en el proceso de espermiación– fagocitados durante el proceso de espermiación y se ha postulado que, además de transportar ácidos grasos, esta proteína posee un rol en el proceso de fagocitosis (Gillot y col., 2005). Por lo tanto es posible especular que en células de Sertoli, un aumento en la expresión del transportador resultará en un aumento de la entrada de ácidos grasos a la célula y, al mismo tiempo, contribuirá a la fagocitosis de cuerpos residuales que constituyen posiblemente una fuente adicional de ácidos grasos para esta célula.

La obtención de energía a partir de la oxidación de ácidos grasos se produce en la mitocondria. La CPT1, proteína responsable de la entrada de ácidos grasos a la matriz mitocondrial y las deshidrogenasas LCAD y MCAD son esenciales en dicho proceso de oxidación. La relación entre la expresión de CPT1, LCAD y MCAD y la activación de PPARs había sido demostrada en varios tipos celulares tales como cardiomiocitos (Brandt y col., 1998; Gilde y col., 2003), adipocitos (Wang y col., 2003), células de músculo esquelético (Krämer y col., 2007) y la línea celular hepática HepG2 (Gulick y col., 1994). Estos antecedentes nos llevaron a analizar si la activación de PPAR  $\alpha$  y PPAR  $\beta/\delta$  en células de Sertoli, además de regular la expresión de FAT/CD36, regulaba la expresión de estos genes implicados directamente en el metabolismo de ácidos grasos. Al respecto, observamos que los tratamientos con WY y GW aumentan la expresión de CPT1, LCAD y MCAD, genes que poseen en su región promotora elementos de respuesta PPRE (Mandard y col., 2004). Este aumento en la expresión génica podría contribuir al aumento en la oxidación de ácidos

grasos observado. En su conjunto los resultados presentados sugieren que los PPARs juegan un rol relevante en la regulación de la oxidación de ácidos grasos en la célula de Sertoli.

Curiosamente, ratones deficientes en PPAR  $\alpha$  son viables, fértiles, sanos y carecen de cualquier defecto observable a simple vista (Lee y col., 1995). Por otro lado, ratones deficientes en PPAR  $\beta/\delta$  poseen una alta frecuencia de letalidad embrionaria (mayor al 90%), sugiriendo un rol importante de este factor de transcripción en el proceso de implantación. Los escasos ratones PPAR  $\beta/\delta$   $-/-$  sobrevivientes, son sanos y fértiles (Peters y col., 2000; Barak y col., 2002). Si bien estas observaciones sugerirían que PPAR  $\alpha$  y PPAR  $\beta/\delta$  no son de importancia para la fertilidad masculina, es importante tener en cuenta que estos factores de transcripción poseen funciones redundantes (Muio y col., 2002). Puede presumirse que la redundancia en su función asegura la transcripción de genes implicados en procesos biológicos esenciales para el mantenimiento de la funcionalidad de la célula de Sertoli y por lo tanto de la espermatogénesis.

Como se indicó en la introducción, se había observado que los PPARs, además de tener una participación en el metabolismo lipídico, estaban implicados en la regulación del metabolismo de los hidratos de carbono (Lee y col., 2006). En la célula de Sertoli, la glucosa es metabolizada a lactato que es secretado al compartimiento adluminal constituyendo la fuente energética de espermatoцитos y espermátides, mientras que no es esencial como sustrato energético de esta célula (Riera y col., 2009). Se pensó entonces que el metabolismo de los ácidos grasos y de la glucosa en células de Sertoli debían estar de alguna manera relacionados y que los PPARs eran buenos candidatos para establecer dicha conexión. Por consiguiente, se decidió analizar si existía participación de PPAR  $\alpha$  y PPAR  $\beta/\delta$  en la regulación de la producción de lactato en la célula de Sertoli. Observamos que, a diferencia de lo que ocurre con la oxidación de ácidos grasos, la activación farmacológica de PPAR  $\alpha$  y PPAR  $\beta/\delta$  regula de manera diferencial la producción de dicho hidroxiaácido. Los resultados obtenidos muestran que la activación de PPAR  $\beta/\delta$ , pero no la activación de PPAR  $\alpha$ , aumenta los niveles de lactato producidos por la célula de Sertoli. De esta manera,



la situación fisiológica que resulte en una activación del PPAR  $\beta/\delta$  traería como consecuencia un aumento en la oxidación de ácidos grasos, asegurando niveles energéticos adecuados en la célula de Sertoli, y simultáneamente un aumento en la producción de lactato que es indispensable como fuente energética para las células germinales.

Resulta difícil comprender cuáles son los mecanismos por los cuales los PPARs ejercen acciones diferenciales. Al respecto se ha observado que todos los PPARs se unen al ADN en los mismos elementos de respuesta. Sin embargo, se ha demostrado que la activación de cada uno de ellos genera respuestas biológicas diversas en distintos tejidos y en distintos estados metabólicos del organismo. Por ejemplo, en el hígado en estado de saciedad la regulación de la expresión génica por activación de ambos PPARs es muy semejante. Sin embargo, el PPAR  $\alpha$  parece ser el más importante para la adaptación al ayuno (Sanderson y col., 2010; Leone y col., 1999). Los animales *KO* para uno u otro receptor han sido útiles para dilucidar el rol de ambos factores de transcripción en cada tejido en particular. Por ejemplo, el *KO* de PPAR  $\alpha$  presenta acumulación anormal de lípidos en hígado y corazón, con una disminución de las enzimas de la oxidación de ácidos grasos que no puede ser compensada por la activación de PPAR  $\beta/\delta$  (Djouadi y col., 1999). No obstante, en el músculo la ausencia de PPAR  $\alpha$  es suplida por la activación de PPAR  $\beta/\delta$  que favorece la expresión de los genes de la oxidación de ácidos grasos (Muoio y col., 2002). Respecto al *KO* de PPAR  $\beta/\delta$ , se ha observado una disminución de tejido adiposo que no está presente en el *KO* específico de tejido adiposo, que reflejaría funciones del factor de transcripción en el metabolismo lipídico sistémico (Barak y col., 2002). Por otro lado, el *KO* de PPAR  $\beta/\delta$  presenta altos niveles de glucemia, acompañados por disminución del flujo glucolítico, disminución de la vía de las pentosas y del metabolismo de fructosa y manosa en el hígado, por lo cual se ha postulado un rol fundamental de este PPAR en el metabolismo de los hidratos de carbono (Lee y col., 2006; de Lange y col., 2008; Sanderson y col., 2010). Apoyando esta última hipótesis, estudios de sobreexpresión de PPARs realizados en tejido cardíaco demostraron que el PPAR  $\beta/\delta$  regula la entrada de glucosa a la célula, la expresión del transportador de glucosa 4 y de la enzima 6-fosfofructo-quinasa 1

(FFK1), eventos que no son regulados por la activación farmacológica de PPAR  $\alpha$  (Burkart y col., 2007). En su conjunto, estas observaciones indican que la activación de cada PPAR puede desencadenar distintos procesos metabólicos dependiendo del tejido analizado. En este contexto los resultados obtenidos en la célula de Sertoli, en los que se demuestra que sólo la activación de PPAR  $\beta/\delta$  aumenta simultáneamente la oxidación de ácidos grasos y la producción de lactato, son consistentes con que el PPAR  $\beta/\delta$  ejerce un papel esencial en la integración del metabolismo energético en el túbulo seminífero.

La siguiente pregunta que intentamos responder fue cuáles eran los mecanismos moleculares responsables de la respuesta biológica diferencial observada frente a la activación de PPAR  $\alpha$  y PPAR  $\beta/\delta$  en cuanto a la producción de lactato en la célula de Sertoli. Se han descrito diversos procesos y mecanismos moleculares, tales como la incorporación de glucosa, los niveles de ARNm de GLUT1, la actividad de la enzima LDH, los niveles de ARNm de LDH A y de MCT4, cuya modulación es responsable de la regulación hormonal de la producción de lactato en la célula de Sertoli (Nehar y col., 1997, 1998; Riera y col., 2001, 2002; Galardo, 2009). Se decidió entonces analizar si existía una regulación diferencial de estos mecanismos moleculares que pudiera explicar la diferente respuesta a la activación de ambos PPARs. Los resultados que obtuvimos demostraron que la activación farmacológica tanto de PPAR  $\alpha$  como de PPAR  $\beta/\delta$  no resulta en la regulación de ninguno de los mecanismos moleculares mencionados y por lo tanto no permite explicar la regulación diferencial de la producción de lactato.

Como se mencionó en la introducción, un mecanismo que también puede estar involucrado en la regulación de la producción de lactato lo constituye la regulación de la disponibilidad de piruvato —sustrato de la enzima LDH. Una de las formas por las cuales se obtendría un incremento en los niveles de piruvato es su menor conversión en acetil-CoA, efecto que se logra por inhibición del complejo enzimático piruvato deshidrogenasa (PDC). Al respecto, observamos un aumento en los niveles de PDC fosforilado, que se asocia con una inhibición de su actividad, en respuesta a la activación de PPAR  $\beta/\delta$ . Dicho aumento no se observa en respuesta a la activación de PPAR  $\alpha$  y por lo tanto es posible postular que no

aumenta la disponibilidad de piruvato en esta última condición experimental. La regulación de la actividad de PDC como mecanismo para aumentar la disponibilidad de piruvato ha sido observada en otros tipos celulares. En este sentido, Newington y colaboradores (2011) demostraron que células neuronales resistentes al péptido  $\beta$ -amiloide producen una mayor cantidad de lactato que está acompañado por un aumento en los niveles de PDC fosforilado. Existen además evidencias de que los altos niveles en la producción de lactato observado en células tumorales y en astrocitos pueden ser explicados por los elevados niveles del estado de fosforilación de PDC (Lu y col., 2008; McFate y col., 2008; Halim y col., 2010). Cabe mencionar que estas últimas células producen lactato para nutrir a las neuronas y establecen una cooperación metabólica astrocito-neurona similar a la presente en la dupla Sertoli-germinal.

Habiendo encontrado que los niveles de fosforilación del PDC podían explicar la regulación diferencial observada en la producción de lactato por activación de PPARs, investigamos cuáles eran los mecanismos participantes río arriba de la regulación del complejo. Como se mencionó en la introducción, la regulación de los niveles de fosforilación del PDC se logra a través de la regulación de la expresión de quinasas y fosfatasas del PDC, PDKs y PDPs. Las PDKs fosforilan y suprimen la actividad del PDC, mientras que las PDPs lo desfosforilan e incrementan la actividad del complejo. Se han identificado cuatro isoformas de PDKs (PDK1-PDK4) y dos de PDPs (PDP1 y PDP2) que se expresan diferencialmente en los distintos tejidos (Holness y Sugden, 2003; Patel y Korotchkina, 2001). El complejo PDC posee tres sitios de fosforilación para PDKs [Ser-293 (sitio 1); Ser-300 (sitio 2); Ser-232 (sitio 3)], las cuatro quinasas son capaces de fosforilar los sitios 1 y 2, mientras que sólo la PDK1 es capaz de fosforilar también el sitio 3. La fosforilación de cualquiera de los tres sitios lleva a la inhibición completa de la actividad del PDC (Korotchkina y Patel, 1995; Korotchkina y Patel, 2001). En cuanto a las fosfatasas, las dos isoformas son capaces de desfosforilar indistintamente los tres sitios y se ha postulado que la reactivación del complejo es más lenta si los tres sitios se encuentran fosforilados (Karpova y col., 2003). El conjunto de estas observaciones ha llevado a la postulación que

aquellas células que expresan las cuatro isoformas de PDK pueden tener los tres sitios de PDC fosforilados y al mismo tiempo mantener mayor proporción del mismo en estado inactivo (Korotchkina y Patel, 2001; Karpova y col., 2003; Rardin y col., 2009). Apoyando esta última hipótesis, se ha observado que los astrocitos expresan las cuatro isoformas de PDKs y además que el complejo PDC está menos activo en comparación con el de las neuronas que expresan únicamente PDK2 y PDK4 (Halim y col., 2010). Teniendo en cuenta que las cuatro isoformas de PDKs están presentes en células de Sertoli es posible especular que, al igual que en astrocitos, su regulación por fosforilación constituye un mecanismo fisiológicamente importante relacionado con la producción de lactato. En base a esta hipótesis se decidió a continuación explorar la participación de las PDKs en la regulación de los niveles de P-PDC y en la producción de lactato utilizando un inhibidor de PDKs (dicloroacetato, DCA). Se observó que en presencia del inhibidor tanto al activar al PPAR  $\alpha$  como al PPAR  $\beta/\delta$  disminuyen los niveles de P-PDC y la producción de lactato. Estos resultados permitieron llegar a la conclusión que las PDKs participan en la modulación del PDC y por lo tanto en la regulación de la disponibilidad de piruvato en la célula de Sertoli.

A continuación analizamos la posible regulación de la expresión de las distintas isoformas de PDKs en respuesta a la activación de los PPARs. Se observó que la activación de PPAR  $\alpha$  incrementa los niveles de PDK2, PDK3 y PDK4, mientras que la activación de PPAR  $\beta/\delta$  incrementa selectivamente los niveles de PDK1 y PDK4. Estos resultados, conjuntamente con los obtenidos con DCA, si bien apoyan la idea de que las PDKs son importantes fisiológicamente en la regulación de PDC, no explicarían fehacientemente la respuesta diferencial observada en cuanto a la producción de lactato por activación de PPAR  $\alpha$  y PPAR  $\beta/\delta$ . Como es sabido, el estado de fosforilación de PDC es el resultado de un balance entre la acción de las PDKs que lo fosforilan y las PDPs que lo desfosforilan. Consecuentemente se decidió evaluar si existía regulación de la expresión de PDPs luego de la activación de PPAR  $\alpha$  y de PPAR  $\beta/\delta$ . Se observó que la activación de PPAR  $\alpha$  provoca un incremento en los niveles de PDP1. Estos resultados indican que la activación de PPAR  $\alpha$  regula tanto la expresión de quinasas como de fosfatasa de PDC –enzimas que

ejercen efectos contrapuestos— lo que permitiría explicar la no modificación de los niveles de P-PDC en respuesta a la activación de este factor de transcripción.

A diferencia de lo observado con la activación del PPAR  $\alpha$ , se observó que la activación de PPAR  $\beta/\delta$  no regula la expresión de las PDPs. Además, es importante notar que la activación de PPAR  $\beta/\delta$  incrementa la expresión de PDK1 –quinasa que fosforila los tres sitios del PDC. Puede postularse que la convergencia de una mayor expresión de PDK1 sin alteración de los niveles de PDPs es responsable del aumento en los niveles de P-PDC y por lo tanto del aumento en la producción de lactato observado al activar PPAR  $\beta/\delta$ .

En su conjunto, los datos obtenidos ponen en evidencia que la regulación de la expresión de las PDKs y PDPs constituye un mecanismo utilizado para regular el destino del piruvato en las células de Sertoli. En otros tejidos también se ha observado una regulación diferencial de la expresión de PDKs y PDPs en distintas condiciones fisiológicas. Por ejemplo, se ha demostrado que ratas mantenidas en condiciones de ayuno presentan un aumento en la expresión de PDK2 en hígado, riñón y glándula mamaria, un incremento en la expresión de PDK4 en corazón, músculo esquelético, hígado, riñón y glándula mamaria y una disminución en la expresión de PDP2 en corazón y riñón (Wu y col., 1998; 2000; Huang y col., 2003). Adicionalmente, se ha demostrado que en condiciones de ayuno, el incremento en la expresión de PDKs acompañado por una disminución en las PDPs lleva a la inhibición de PDC en el hígado, hecho que incrementa la disponibilidad de piruvato para la gluconeogénesis (Wu y col., 2000; Jeong y col., 2012). Por el contrario, se ha demostrado que el tratamiento con insulina disminuye los niveles de ARNm de PDK2 y PDK4 e incrementa los niveles de PDP1 y PDP2 en distintos tipos celulares, favoreciendo de esta forma la activación de PDC lo que permitiría la entrada del piruvato al ciclo de Krebs para su oxidación (Abbot y col., 2005; Huang y col., 2002; Wang y col., 2009).

Con respecto al mecanismo por el cual los PPARs regulan la expresión de PDKs se ha demostrado que PDK2, PDK3 y PDK4 presentan sitios PPRE en sus promotores a los cuales podrían unirse los PPARs (Degenhardt y col., 2007). Es muy probable que estos sitios PPRE medien el aumento de la transcripción de PDK2, PDK3 y PDK4 por activación

de PPARs en las células de Sertoli. Curiosamente la PDK1, que es la quinasa que fosforila los tres sitios del PDC (Korotchkina y Patel, 2001) y presenta una regulación por PPAR  $\beta/\delta$  en células de Sertoli, no posee sitios PPRE en su región promotora (Degenhardt y col., 2007). Al respecto cabe mencionar que si bien la acción transcripcional clásica de los PPARs es a través de la unión al sitio de respuesta PPRE presente en el promotor del gen, se sabe que estos factores de transcripción también pueden regular la expresión génica de manera indirecta (Vanden Heuvel, 1999). En cuanto a las PDPs, no se conoce la estructura de la región promotora de las mismas, así como tampoco se conocen los factores de transcripción específicos que regulan su expresión.

En resumen, esta primera parte del trabajo de tesis muestra que la activación farmacológica de PPAR  $\alpha$  y PPAR  $\beta/\delta$  en células de Sertoli estimula la oxidación de ácidos grasos y la expresión de genes vinculados con el transporte y metabolismo de los mismos. Adicionalmente, muestra que la activación de PPAR  $\alpha$  y PPAR  $\beta/\delta$  provoca efectos diferentes en la regulación de la producción de lactato. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos se postula que en la célula de Sertoli, la activación de PPAR  $\alpha$  está dirigida a promover el autoabastecimiento energético, mientras que la activación de PPAR  $\beta/\delta$  está direccionada a abastecer de manera simultánea la provisión de sustratos energéticos a la propia célula de Sertoli y a las células germinales que la rodean. Un esquema que resume los resultados observados en esta primera sección de la tesis ha sido presentado en la figura 18 de resultados en la página 79.

Los hallazgos obtenidos acerca de la regulación del metabolismo energético de la célula de Sertoli por activación de PPAR  $\alpha$  y PPAR  $\beta/\delta$  nos llevaron a pensar cuáles podrían ser los mecanismos fisiológicos participantes en la activación de estos factores de transcripción en este tipo celular.

Hasta el momento, no están claramente definidos los mecanismos fisiológicos que participan en la activación de los PPARs en los distintos tejidos. La mayoría de los autores coinciden en que los ácidos grasos y sus derivados pueden actuar en forma general como

ligandos de los PPARs (Forman y col., 1997; Xu y col., 1999; Bensinger y Tontonoz, 2008). En la introducción se hizo mención a la actividad fagocítica muy importante que poseen las células de Sertoli y al hecho que la misma es esencial para el mantenimiento de la integridad del túbulo seminífero. Adicionalmente se mencionó que los cuerpos residuales y las células germinales apoptóticas al ser fagocitados y degradados, aumentan la cantidad de gotas lipídicas en las células de Sertoli (Kerr y col., 1984; Ueno y Mori 1990; Sasso-Cerri y col., 2001; Wang y col., 2006). Al respecto, Xiong y colaboradores (2009) postularon que dicho aumento en el contenido de gotas lipídicas en la célula de Sertoli aporta ácidos grasos para ser utilizados como fuente energética. Este conjunto de observaciones nos llevó a plantear como hipótesis que las células germinales apoptóticas aportando ácidos grasos o derivados eran capaces de regular la oxidación de ácidos grasos a través de la activación de los PPARs en la célula de Sertoli. Para poner a prueba la hipótesis planteada evaluamos los efectos de las células germinales apoptóticas sobre la expresión de genes relacionados con el transporte y metabolismo de ácidos grasos en las células de Sertoli. Se observó que las células germinales apoptóticas aumentan los niveles de ARNm del FAT/CD36. Como se mencionó en la introducción, el receptor de tipo *scavenger* FAT/CD36, además de ser un transportador de ácidos grasos, está implicado en la fagocitosis de cuerpos residuales y de células germinales apoptóticas (Kawasaki y col., 2002; Gillot y col., 2005). Por lo tanto, es posible pensar que probablemente el aumento en los niveles de ARNm de FAT/CD36 se traduzca en un aumento en la cantidad del transportador en la membrana plasmática que, además de permitir la entrada de ácidos grasos a la célula, favorezca la fagocitosis de los cuerpos residuales y de las células germinales apoptóticas. Las células germinales apoptóticas no solamente aumentaron los niveles de expresión de FAT/CD36 sino que también aumentaron los niveles de expresión de CPT1 y de LCAD. Nuestros resultados con respecto a la expresión de LCAD están en concordancia con los presentados por Xiong y colaboradores (2009). Estos últimos autores también observaron que las células germinales apoptóticas, además de provocar un aumento en la cantidad de gotas lipídicas, promueven un aumento en la expresión de LCAD. Por otro lado, dichos autores no observaron

regulación en la expresión de CPT1. Esta discrepancia entre los resultados obtenidos en el presente trabajo y los obtenidos por Xiong y colaboradores podría deberse a la utilización de condiciones experimentales ligeramente diferentes. Mientras que Xiong y colaboradores utilizaron cultivos de células de Sertoli de ratón y evaluaron los efectos del cocultivo sobre la expresión génica únicamente luego de 24 horas, en el presente trabajo se utilizaron cultivos de células de Sertoli de rata y la observación de los efectos producidos por las células germinales apoptóticas se realizó luego de un período de 24 y 48 horas de cocultivo. Con respecto al aumento en la expresión de CPT1 y LCAD observado es dable pensar que tal aumento conducirá a un incremento en la capacidad de transporte de los ácidos grasos al interior de la mitocondria, a una mayor degradación de los mismos a través del proceso de  $\beta$ -oxidación y, por lo tanto, a una mayor producción de ATP en la célula de Sertoli tal como ha sido descrita previamente (Xiong y col., 2009).

Habiendo demostrado que las células germinales apoptóticas aumentaban la expresión de genes relacionados con la oxidación de ácidos grasos se decidió analizar la posible participación de PPARs en el fenómeno observado. En la primera parte de esta tesis postulamos que la activación farmacológica de PPAR  $\beta/\delta$  en particular tiene un rol esencial en el metabolismo energético del túbulo seminífero, ya que participa simultáneamente en el metabolismo lipídico y en el de hidratos de carbono. Por consiguiente, decidimos estudiar específicamente la posible participación de la activación de PPAR  $\beta/\delta$  en la modulación de la expresión génica inducida por las células germinales apoptóticas en las células de Sertoli. Para lograr tal objetivo, evaluamos la expresión génica en células de Sertoli cocultivadas con células germinales apoptóticas en ausencia o presencia de un antagonista específico de PPAR  $\beta/\delta$ . Nuestros resultados mostraron que la presencia del antagonista no permite que las células germinales apoptóticas aumenten la expresión de FAT/CD36, CPT1 y LCAD. Estos resultados pusieron en evidencia que el factor de transcripción PPAR  $\beta/\delta$  participa en la regulación de la expresión génica que ejercen las células germinales apoptóticas sobre las células de Sertoli.



Teniendo en cuenta los resultados anteriores cabe plantearse cuál podría ser la fuente de los ligandos endógenos de PPAR  $\beta/\delta$  presentes en la célula de Sertoli que resultan de la fagocitosis de las células germinales apoptóticas. Al respecto, diversas observaciones apoyan la hipótesis que los productos de la hidrólisis de las gotas lipídicas constituyen ligandos endógenos capaces de activar a los PPARs. En este sentido, Mottillo y colaboradores (2012) demostraron que la degradación de las gotas de lípidos en la grasa parda brinda ligandos que activan específicamente al PPAR  $\alpha$  y al PPAR  $\beta/\delta$ . Además dichos autores demostraron que la activación puede correlacionarse con la expresión de genes tales como LCAD y MCAD. Asimismo, se obtuvieron evidencias acerca del rol de las gotas lipídicas y su hidrólisis para obtener ligandos endógenos de los PPARs evaluando ratones *KO* de la lipasa de triglicéridos de adipocitos (ATGL), enzima que cataliza el paso limitante de la degradación de triglicéridos. Más precisamente, se demostró que los cardiomiocitos presentan una disminución en la expresión de genes vinculados con el metabolismo lipídico tales como LCAD, MCAD, CPT1 y que esta disminución es revertida en presencia de un agonista farmacológico de PPAR  $\alpha$  en estos ratones *KO* (Haemmerle y col., 2011). Cabe mencionar que se ha demostrado la presencia de ATGL en el testículo (Zimmermann y col., 2004; Haemmerle y col., 2006). En base a los antecedentes de la literatura y los resultados obtenidos en este trabajo de tesis se postula que la hidrólisis de las gotas de lípidos presentes en las células de Sertoli genera ligandos endógenos de PPAR  $\beta/\delta$ , cuya activación sería finalmente la responsable de la regulación de la expresión génica observada en esta célula.

Como es sabido, entre los productos de la hidrólisis de triglicéridos presentes en las gotas lipídicas se encuentran los ácidos grasos, moléculas que han sido propuestas como ligandos de PPARs. Se decidió entonces analizar si un ácido graso producía efectos similares a los observados en el cocultivo con células germinales apoptóticas. Se utilizó el ácido palmitico —ácido graso saturado— debido a que este ácido graso es el que se encuentra en mayor abundancia tanto en células de Sertoli (Hurtado de Catalfo y Gómez Dumm, 2005) como en células germinales y cuerpos residuales (Oresti y col., 2013). Se

demonstró que el tratamiento de las células de Sertoli con ácido palmítico aumenta la oxidación de ácidos grasos. Asimismo, se analizó en qué medida dicho aumento podía ser explicado por una regulación en la expresión de genes tales como FAT/CD36, CPT1 y LCAD, cuya expresión se ve aumentada en los cocultivos con células germinales apoptóticas. Se observó que el tratamiento con ácido palmítico aumenta la expresión de CPT1 y LCAD. Estos resultados están en concordancia con observaciones realizadas en otros sistemas. Por ejemplo, se ha observado en células de músculo cardíaco que la expresión de CPT1 y LCAD aumenta en incubaciones con ácidos grasos de cadena larga (Brandt y col., 1998; van der Lee y col., 2000). Por otro lado y a diferencia de lo que ocurre con el cocultivo con células germinales apoptóticas, se observó que el tratamiento con ácido palmítico promueve una disminución en los niveles de ARNm de FAT/CD36. Esta regulación negativa observada fue inesperada, sin embargo la exploración exhaustiva de la literatura permitió interpretar las posibles causas del resultado obtenido. Se ha observado que algunos metabolitos energéticos regulan de forma variable la expresión de los genes relacionados con su propio transporte. Algunos ejemplos de dicha regulación variable se mencionan en las próximas líneas. En células germinales se demostró que el lactato, metabolito energético principal para este tipo celular, aumenta la expresión de su propio transportador (Galardo y col., 2014). Un fenómeno similar ocurre en células del colon, en las que se observó que el butirato -metabolito energético principal para este tipo celular- también aumenta la expresión de su propio transportador (Cuff y col., 2002). Por otro lado, se ha observado una correlación negativa entre la expresión del transportador de glucosa y los niveles de glucemia en las células  $\beta$  del páncreas (Thorens y col., 1990). En forma semejante y más recientemente se ha observado que la hiperglucemia crónica en ratas diabéticas disminuye los niveles de ARNm de los transportadores de glucosa GLUT1 y GLUT3 en cerebro. Se ha postulado que dicha disminución podría ser una respuesta adaptativa del organismo para evitar la entrada excesiva de glucosa y así prevenir el daño celular que la misma genera (Hou y col., 2007). Con respecto a la regulación de la expresión de FAT/CD36 por ácidos grasos, algunos estudios han mostrado que los ácidos grasos de

cadena larga o sus derivados no metabolizables provocan un aumento en la expresión de FAT/CD36 lo que resultaría en una mayor entrada y posterior utilización o almacenamiento de los mismos (van der Lee y col., 2000; Yang y col., 2007). Contrariamente y en concordancia con nuestros resultados, se ha demostrado recientemente que concentraciones crecientes de ácido palmítico promueven una disminución dosis dependiente en la expresión de FAT/CD36 en células intestinales (Xie y col., 2012). Como se mencionó en la introducción, un exceso de ácidos grasos en el interior celular puede provocar efectos nocivos y generar daño celular fundamentalmente debido a las características hidrofóbicas de dichas moléculas. Es de destacar que el exceso de ácidos grasos en el interior celular ha sido implicado en el desarrollo de algunas patologías tales como la Diabetes Mellitus tipo 2 y la falla cardíaca y que precisamente se ha propuesto como tratamiento de estas patologías a la inhibición farmacológica del FAT/CD36 (Glatz, 2015). Además, se observó que el tratamiento con inhibidores del FAT/CD36 en ratones disminuye la aterosclerosis y los niveles de glucosa y de triglicéridos en sangre (Geloan y col., 2012). De todo lo expuesto, se sugiere que la disminución en la expresión de FAT/CD36 en la célula de Sertoli en incubaciones con ácido palmítico podría entenderse como un fenómeno de citoprotección ante el exceso de ácidos grasos circundantes.

Dado que habíamos visto que en la regulación de la expresión génica producida por el cocultivo con células germinales apoptóticas participaba el PPAR  $\beta/\delta$  y que el ácido palmítico regulaba de forma semejante el metabolismo de ácidos grasos, decidimos evaluar si en dicha regulación participaba el PPAR  $\beta/\delta$ . Se demostró que en presencia del antagonista de PPAR  $\beta/\delta$  se produce una disminución en la oxidación de ácidos grasos en las células de Sertoli estimuladas con ácido palmítico. Asimismo, se demostró que dicha disminución está acompañada por una menor expresión de ARNm de CPT1 y de LCAD. En su conjunto, estos resultados permiten sugerir que en la célula de Sertoli los ácidos grasos son capaces de regular su propio metabolismo por un mecanismo que involucra la regulación de la expresión génica a través de la activación de PPAR  $\beta/\delta$ .

Es importante mencionar que los PPARs presentan afinidades diferentes por distintos ácidos grasos y sus derivados. Se ha postulado que el PPAR  $\alpha$  es el PPAR más versátil de los tres, ya que es capaz de unir tanto ácidos grasos de cadena larga saturados e insaturados como sus acil-CoA derivados. El PPAR  $\beta/\delta$  se asocia a los mismos ácidos grasos y derivados pero con menor afinidad que el PPAR  $\alpha$ . Finalmente, el PPAR  $\gamma$  es el que presenta un perfil más estricto en cuanto al tipo de ácidos grasos que une. En particular, este último PPAR posee una gran afinidad por ácidos grasos poliinsaturados y en menor medida por ácidos grasos monoinsaturados (Neels y Grimaldi, 2014; Grygiel-Górniak, 2014). Considerando que los efectos del ácido palmítico en células de Sertoli son sólo parcialmente inhibidos por el antagonista de PPAR  $\beta/\delta$  y que el PPAR  $\alpha$  y el PPAR  $\beta/\delta$  tienen la capacidad de unir este ácido graso, no se puede descartar la participación simultánea de PPAR  $\alpha$  en la regulación del metabolismo lipídico por ácido palmítico en la célula de Sertoli.

La concentración de ácido palmítico utilizada en este trabajo de tesis (500  $\mu\text{M}$ ) resulta elevada teniendo en cuenta las constantes de afinidad de los PPARs por los ácidos grasos (1 a 10  $\mu\text{M}$ ). Sin embargo, tal concentración es requerida y fue seleccionada sobre la base de estudios de otros autores quienes para activar eficientemente a los PPARs utilizaron concentraciones de hasta 1000  $\mu\text{M}$  de ácidos grasos (Brandt y col., 1998; van del Lee y col., 2000; Yang y col., 2007). El requerimiento de altas concentraciones de ácidos grasos con el objeto de observar efectos biológicos puso en duda durante varios años que los ácidos grasos actuaran como ligandos fisiológicos de los PPARs. Se considera en la actualidad que la necesidad de usar altas concentraciones de ácidos grasos o sus derivados en incubaciones crónicas es debida a su rápida metabolización en la célula. En tal sentido, se ha observado que moléculas de ácidos grasos no metabolizables como el 2-bromopalmitato (Yang y col., 2007), ácidos grasos con sustitución tiólica o metilados (Larsen y col., 2005) o eicosanoides estabilizados como la carbaprostaciclina (cPGI<sub>2</sub>) (Lim y col., 1999) producen las mismas respuestas biológicas en concentraciones mucho más bajas.

Como ya se señaló, la decisión de estudiar al PPAR  $\beta/\delta$  en particular se debió al hecho que este factor de transcripción posee la invaluable propiedad de participar

simultáneamente en la regulación del metabolismo de los ácidos grasos y de los hidratos de carbono. La regulación simultánea de ambos metabolismos tendría consecuencias sumamente beneficiosas en el túbulo seminífero. Al respecto, en la primera sección de resultados de esta tesis se demostró que la activación farmacológica de PPAR  $\beta/\delta$ , además de regular el metabolismo de ácidos grasos, regula la producción de lactato y se concluyó que la activación de este factor de transcripción simultáneamente brindaba sustratos energéticos a las células de Sertoli y a las germinales. Nos preguntamos entonces si era posible que en las células de Sertoli, tanto el cocultivo con células germinales apoptóticas como el tratamiento con ácido palmítico regularan, además de la oxidación de ácidos grasos, la producción de lactato. Adicionalmente si existiera tal regulación, cuál era la participación de PPAR  $\beta/\delta$ .

Los resultados obtenidos demostraron que el cocultivo con células germinales apoptóticas provoca un aumento de la producción de lactato. Sin embargo, contrariamente a lo esperado, observamos que la presencia del antagonista de PPAR  $\beta/\delta$  en los cocultivos con células germinales apoptóticas no modificaba los niveles de lactato producidos por la célula de Sertoli. Se requerirán estudios adicionales para comprender cuáles podrían ser los mecanismos involucrados en el aumento en la producción de lactato en forma independiente de la activación de PPAR  $\beta/\delta$  en los cocultivos con células germinales apoptóticas.

En cuanto al tratamiento con ácido palmítico que actuaría como ligando de PPAR  $\beta/\delta$  se esperaba una regulación positiva de la producción de lactato. Sin embargo, no se observó aumento en la producción de lactato en las incubaciones con ácido palmítico. Este último resultado nos hizo pensar que el tratamiento con dicho ácido graso podría estar ejerciendo efectos *per se* sobre el flujo glucolítico, independientemente de su acción como ligando de PPAR  $\beta/\delta$ . La revisión de la bibliografía al respecto aportó algunas posibles explicaciones para el resultado obtenido. A comienzos de la década del '60 surgieron los primeros estudios que evaluaron la actividad de diversas enzimas glucolíticas bajo diferentes situaciones metabólicas. En ese entonces se había observado que durante el ayuno, momento en el cual se observa un aumento de ácidos grasos en sangre, se

favorecen los procesos gluconeogénicos y se inhiben los glucolíticos, hecho que llevó a pensar que los ácidos grasos serían los responsables de la inhibición del flujo glucolítico. Estudios pioneros de Randle y colaboradores (1963) plantearon que la disminución en el flujo glucolítico se debía fundamentalmente a la inhibición de la enzima FFK1. Cincuenta años más tarde se ha podido demostrar la existencia de una regulación directa de los ácidos grasos sobre la mencionada enzima. Al respecto, se demostró concluyentemente que los acil-CoAs de cadena larga provocan una inhibición de la actividad de la enzima FFK1. Más precisamente, se observó que el palmitoil-CoA actúa como el regulador alostérico negativo más potente de la actividad de FFK1. Además, se demostró la especificidad de tal efecto ya que si se incrementa o disminuye el número de carbonos o si se introducen insaturaciones la inhibición es menor (Jenkins y col., 2011). Por lo tanto si bien esperábamos una regulación positiva de la producción de lactato por parte del ácido palmítico en las células de Sertoli –ácido graso propuesto como ligando de PPAR  $\beta/\delta$ –, el conjunto de las evidencias presentadas por otros autores hacen pensar que el tratamiento con ácido palmítico en los cultivos de células de Sertoli, además de su acción como ligando, generaría altos niveles de palmitoil-CoA provocando una regulación negativa sobre el flujo glucolítico. Dicha situación experimental podría enmascarar los efectos del ácido palmítico como agonista de PPAR  $\beta/\delta$ . Estudios adicionales utilizando como agonistas derivados no metabolizables del ácido palmítico contribuirían al esclarecimiento de la hipótesis planteada.

En resumen, en esta segunda parte del trabajo de tesis se demostró que las células germinales apoptóticas regulan la expresión de genes vinculados con el transporte y metabolismo de ácidos grasos. Por otro lado, que el ácido palmítico –ácido graso mayoritario en células de Sertoli– regula la expresión génica de forma semejante. Adicionalmente se demostró que tanto en las acciones de las células germinales apoptóticas como del ácido palmítico participa la activación del PPAR  $\beta/\delta$ . Se postula que el efecto de las células germinales apoptóticas es debido a la fagocitosis de las mismas, seguida de la acumulación de gotas lipídicas que al ser hidrolizadas generan ligandos de PPARs. Un

esquema que resume los resultados observados en esta segunda sección de la tesis ha sido presentado en la figura 32 de resultados en la página 94.

El estudio de la regulación hormonal de la funcionalidad en la célula de Sertoli ha sido el objetivo de nuestro laboratorio en los últimos veinte años. Al respecto, se ha demostrado que existe regulación por FSH, bFGF, IL-1 $\beta$  e IGF1 de distintos procesos fundamentales para la célula de Sertoli tales como, la actividad de  $\gamma$ -GTP, la producción de estradiol, lactato, transferrina y cuerpos cetónicos (Schteingart y col., 1999; Riera y col., 2001, 2002, 2003, 2007, 2011; Meroni y col., 1998, 2000, 2002; 2004; Galardo y col., 2008, 2013). El aspecto más estudiado ha sido la regulación hormonal de la producción de lactato debido a la importancia fisiológica de este metabolito de la glucosa, ya que el mismo constituye la principal fuente energética de espermatocitos meióticos y espermátides y es esencial para el desarrollo de la espermatogénesis (Jutte y col., 1983; Courtens y Plöen, 1999). Por otro lado la oxidación de ácidos grasos, que constituye una fuente energética para la célula de Sertoli, es muy probable que también esté estrictamente regulada por hormonas y por factores de producción local en el testículo. Curiosamente, muy pocos estudios han abordado el análisis de la regulación hormonal del metabolismo lipídico en la gónada masculina.

En la última sección de esta tesis se ha analizado la posible regulación hormonal de algunos mecanismos involucrados en la oxidación de ácidos grasos en la célula de Sertoli. Se estudiaron por un lado los efectos de FSH, hormona hipofisaria que regula la funcionalidad de la célula de Sertoli, y por el otro del factor de crecimiento bFGF, factor de crecimiento de producción local que ha sido utilizado como paradigma de la comunicación germinal-Sertoli.

En primer lugar, nuestros resultados mostraron que el estímulo con FSH disminuye la oxidación de ácidos grasos en la célula de Sertoli. Este resultado es consistente con el hecho de que la FSH estimula procesos anabólicos en la célula de Sertoli. Particularmente, se ha demostrado que FSH estimula la incorporación de acetato a triacilglicéridos y

fosfolípidos, lo que indica su participación en la síntesis de ácidos grasos y su posterior incorporación a lípidos en células de Sertoli (Guma y col., 1997). Simultáneamente, se observó que la hormona trófica regula positivamente la expresión de FAT/CD36. Es posible postular que dicho incremento en los niveles de expresión de FAT/CD36 favorece la entrada y disponibilidad de ácidos grasos para su posterior metabolización. Con respecto a la regulación de la expresión de genes relacionados directamente con la oxidación de ácidos grasos se observó que FSH estimula la expresión de CPT1, enzima que constituye el paso limitante en la degradación de ácidos grasos en la mitocondria. Esta regulación positiva, tanto de FAT/CD36 como de CPT1, probablemente reflejan el efecto trófico que esta hormona ejerce sobre la célula de Sertoli. Es dable pensar que esta regulación es esencial para la síntesis de lípidos fundamentales para el mantenimiento de la espermatogénesis y adicionalmente, para la obtención de energía a partir de la oxidación de ácidos grasos en respuesta a estímulos adecuados para la célula de Sertoli.

Con respecto a la regulación del metabolismo energético en respuesta al factor de crecimiento bFGF, se ha observado en el presente trabajo que dicho factor aumenta la oxidación de ácidos grasos en las células de Sertoli. En concordancia con dicha regulación, se observó un aumento en la expresión de CPT1. Es posible pensar que dicho aumento se traducirá finalmente en un aumento en la entrada de ácidos grasos a la mitocondria para su oxidación. Cabe resaltar que el bFGF es un factor producido por las células germinales y que su acción en la célula de Sertoli resultaría beneficioso para ambos tipos celulares, ya que aumenta la oxidación de ácidos grasos y simultáneamente la producción de lactato, fuentes energéticas de células de Sertoli y germinales, respectivamente.

Nuestras observaciones son consistentes con que FSH y bFGF regulan el metabolismo lipídico en cultivos de células de Sertoli y es posible avizorar un significado fisiológico para estas observaciones. En los roedores, las asociaciones celulares características que se presentan a lo largo del tubo seminífero definen catorce estadios (I a XIV) de la espermatogénesis. Cabe mencionar que en los distintos estadios de la espermatogénesis, la célula de Sertoli varía no sólo morfológicamente sino también



funcionalmente. Se ha demostrado que la unión de FSH a su receptor, la producción de AMPc y asimismo la expresión del receptor de FSH son mínimas durante los estadios de pre-espermiación y espermiación (estadios VI a VIII) (Kangasniemi y col., 1990a, 1990b; Heckert y Griswold, 1991). Por otro lado, también se han observado variaciones en la expresión del bFGF en los diferentes estadios de la espermatogénesis. La mayor producción de bFGF se ha observado en aquellos espermatocitos que están presentes en los estadios cercanos al estadio VIII donde ocurre la espermiación (VII a IX) (Mayerhofer y col., 1991). Es de hacer notar que los cuerpos residuales aparecen precisamente en el momento de la espermiación y su fagocitosis se observa en el estadio IX de la espermatogénesis (Morales y col., 1986). Coincidentemente, es en los estadios VIII y IX donde se ha observado un aumento en la cantidad de ATP presente en la célula de Sertoli (Xiong y col., 2009). Este escenario permite postular que el aumento de los niveles energéticos en la célula de Sertoli *in vivo* se correlaciona con una disminución en la respuesta a FSH, un aumento en la producción de bFGF por los espermatocitos y con la fagocitosis de los cuerpos residuales que constituyen una fuente de ácidos grasos para su oxidación. Completando este cuadro de situación fisiológica, cabe mencionar que en los estadios cercanos a la espermiación ocurre además el remodelamiento de la barrera hemato-testicular y que tanto espermiación como remodelamiento de la barrera son procesos que poseen un elevado requerimiento energético.

Las hormonas y los factores de crecimiento actúan a través de sus respectivos receptores de membrana activando señales de transducción y regulando, en última instancia, la expresión génica a través de la activación de distintos factores de transcripción entre los que pueden encontrarse los PPARs (Vanden Heuvel, 1999; Diradourian y col., 2005; Moreno y col., 2010). Como se demostró en la primera parte de este trabajo de tesis, sólo la activación del PPAR  $\beta/\delta$  regula de manera simultánea la oxidación de ácidos grasos y la producción de lactato. Se planteó como hipótesis que en el mecanismo de acción utilizado por FSH y por bFGF para regular el metabolismo de ácidos grasos y la producción de lactato en la célula de Sertoli estuviera involucrada la activación de PPAR  $\beta/\delta$ . Una vez

más y para contrastar esta hipótesis utilizamos como estrategia las incubaciones con un antagonista específico de PPAR  $\beta/\delta$  en combinación con los tratamientos hormonales.

Se demostró que el antagonista de PPAR  $\beta/\delta$  no modifica ninguno de los efectos obtenidos para FSH, y consecuentemente puede concluirse que no existe participación del factor de transcripción PPAR  $\beta/\delta$  en el mecanismo de acción utilizado por FSH para regular las respuestas biológicas consideradas en este trabajo de tesis. Por otro lado, se demostró que PPAR  $\beta/\delta$  participa en el mecanismo de acción utilizado por bFGF para regular la oxidación de ácidos grasos y los niveles de ARNm de CPT1. Considerando que la región promotora de CPT1 posee sitio PPRE es posible postular que el bFGF luego de la unión a su receptor y de la activación de vías de transducción en la célula de Sertoli regula, al menos en parte, la expresión CPT1 y el metabolismo de ácidos grasos a través de la activación de PPAR  $\beta/\delta$ .

Desde hace varios años se conoce que los PPARs son fosfoproteínas y que su actividad transcripcional es regulada por quinasas y fosfatasa. Entre las modificaciones que se producen en la actividad de los PPARs por su estado de fosforilación se encuentran la afinidad por el ligando, la unión al ADN, el reclutamiento de co-activadores/co-represores y su degradación por proteasoma. Se ha demostrado que las proteínas quinasas activadas por mitógenos –p44/p42-MAPK y p38-MAPK–, la proteína quinasa dependiente de AMPc, la proteína quinasa dependiente de calcio, la proteína quinasa activada por AMP y la glucógeno sintasa quinasa 3 son capaces de regular la actividad de los PPARs de manera dependiente o independiente de ligando. Asimismo se ha demostrado que los efectos de la fosforilación sobre los PPARs dependen del subtipo y del contexto celular (Diradourian y col., 2005). El hecho que FSH y bFGF activen distintas vías de transducción de señales en la célula de Sertoli (Riera y col., 2003; Gloaguen y col., 2011) podría explicar la participación diferencial de PPAR  $\beta/\delta$  observada en el mecanismo de acción de bFGF. Otros posibles mecanismos que podrían explicar la participación de PPAR  $\beta/\delta$  en el mecanismo de acción de bFGF serían la generación de ligandos intracelulares específicos y/o la modulación en la expresión del PPAR.

Como ya se mencionó, resultados de nuestro laboratorio demostraron que bFGF estimula la producción de lactato regulando la incorporación de glucosa a la célula, la actividad de LDH, la expresión de GLUT1 y de LDH A en la célula de Sertoli (Riera y col., 2002; 2003). Adicionalmente, en la primera sección de este trabajo de tesis se demostró que la activación de PPAR  $\beta/\delta$  regula la producción de lactato en forma independiente a los mecanismos recién mencionados y dependiente de la regulación del estado de fosforilación de PDC. Recientemente en nuestro laboratorio hemos demostrado que bFGF es capaz de estimular la expresión de las cuatro isoformas de PDKs y por consiguiente de provocar un aumento en los niveles de P-PDC, lo que conduce a un aumento en la disponibilidad de piruvato para ser convertido a lactato (Regueira y col., 2015). En el presente trabajo de tesis al evaluar la producción de lactato estimulada por bFGF en presencia del antagonista de PPAR  $\beta/\delta$ , se observó una inhibición parcial de dicho estímulo que es acompañado por una disminución de los niveles de P-PDC. El conjunto de los resultados hace pensar que en el mecanismo de acción utilizado por bFGF para regular la producción de lactato participa, al menos en parte, la activación de PPAR  $\beta/\delta$  y la subsiguiente regulación de la expresión de PDKs en particular de PDK1 y PDK4 –PDKs reguladas por activación farmacológica de PPAR  $\beta/\delta$  en células de Sertoli. Experimentos que analicen la regulación de la expresión de PDK1 y PDK4 por bFGF en presencia del antagonista de PPAR  $\beta/\delta$  serán necesarios para confirmar esta última hipótesis.

En resumen, los resultados de esta tercera parte del trabajo de tesis muestran que FSH y bFGF regulan de manera diferencial la oxidación de ácidos grasos en la célula de Sertoli. FSH inhibe la oxidación de ácidos grasos y simultáneamente estimula la expresión de FAT/CD36, CPT1 y la producción de lactato sin participación de la activación de PPAR  $\beta/\delta$ . Por otro lado, bFGF aumenta la oxidación de ácidos grasos, la expresión de CPT1 y la producción de lactato; efectos que serían mediados, al menos en parte, por la activación de PPAR  $\beta/\delta$ . Un esquema que resume los resultados observados en esta tercera sección de la tesis ha sido presentado en la figura 41 de resultados en la página 106.

Debido a la complejidad y al dinamismo de los procesos bioquímicos que ocurren en el túbulo seminífero muchos más estudios experimentales serán necesarios para comprender en profundidad como se producen las adaptaciones metabólicas que ocurren en las células de Sertoli para mantener un adecuado equilibrio energético. De lo que no cabe duda es que la regulación del metabolismo de esta célula es un proceso clave cuyo control es crítico para garantizar una espermatogénesis normal.

## CONCLUSIONES

*Este trabajo de tesis demuestra que el túbulo seminífero posee una estricta regulación del metabolismo energético. Se demostró que la activación farmacológica de PPAR  $\alpha$  y PPAR  $\beta/\delta$  en células de Sertoli estimula la oxidación de ácidos grasos y la expresión de genes involucrados en el transporte y metabolismo de los mismos. Adicionalmente, que la activación de PPAR  $\alpha$  y PPAR  $\beta/\delta$  provoca efectos diferentes en la regulación de la producción de lactato. Estos resultados nos permiten especular que, en la célula de Sertoli la activación de PPAR  $\alpha$  está dirigida a promover el autoabastecimiento energético, mientras que la activación de PPAR  $\beta/\delta$  está direccionada a abastecer de manera simultánea la provisión de sustratos energéticos a la propia célula de Sertoli y a las células germinales que la rodean.*

*Asimismo se analizaron posibles mecanismos fisiológicos que podrían ser responsables de la activación de los PPARs en la célula de Sertoli. Se demostró que las células germinales apoptóticas regulan la expresión de genes vinculados con el transporte y metabolismo de ácidos grasos. Por otro lado, que el ácido palmítico –ácido graso mayoritario en células de Sertoli– regula la expresión génica de forma semejante. Adicionalmente se demostró que tanto en las acciones de las células germinales apoptóticas como del ácido palmítico participa la activación del PPAR  $\beta/\delta$ . Estas observaciones nos permiten postular que los ácidos grasos, que probablemente provienen de la degradación de los triglicéridos de las gotas de lípidos generadas por la fagocitosis de células germinales apoptóticas o del medio extracelular, actúan como ligandos del factor de transcripción PPAR  $\beta/\delta$  regulando la oxidación de ácidos grasos y la expresión de genes relacionados con su propio transporte y metabolismo.*

*Por último, demostramos que las hormonas FSH y bFGF regulan de manera diferencial la oxidación de ácidos grasos en la célula de Sertoli. FSH inhibe la oxidación de*

*ácidos grasos y simultáneamente estimula la producción de lactato sin participación de la activación de PPAR  $\beta/\delta$ . Por otro lado, bFGF aumenta la oxidación de ácidos grasos, la expresión génica y la producción de lactato de manera PPAR  $\beta/\delta$  dependiente.*

*En su conjunto, estos resultados revelan la existencia de una regulación compleja de mecanismos moleculares que participan en el metabolismo de ácidos grasos y en la producción de lactato en células de Sertoli. La información obtenida constituye un aporte al conocimiento de los mecanismos fisiológicos que podrían contribuir a la regulación del metabolismo energético en el túbulo seminífero, fundamental para una espermatogénesis normal.*

Lic. Mariana Regueira  
Doctorando

Dra. Silvina B. Meroni  
Director

Dra. María F. Riera  
Director Asistente

**BIBLIOGRAFÍA**

- Abbot EL, McCormack JG, Reynet C, Hassall DG, Buchan KW, Yeaman SJ (2005). Diverging regulation of pyruvate dehydrogenase kinase isoform gene expression in cultured human muscle cells. *FEBS J.* 272(12): 3004-3014.
- Adams SH, Esser V, Brown NF, Ing NH, Johnson L, Foster DW, McGarry JD (1998). Expression and possible role of muscle-type carnitine palmitoyltransferase I during sperm development in the rat. *Biol Reprod.* 59(6): 1399-1405.
- Adida A, Spener F (2006). Adipocyte-type fatty acid-binding protein as inter-compartmental shuttle for peroxisome proliferator activated receptor gamma agonists in cultured cell. *Biochim Biophys Acta.* 1761: 172-181.
- Ailenberg M, Stetler-Stevenson WG, Fritz IB (1991). Secretion of latent type IV procollagenase and active type IV collagenase by testicular cells in culture. *Biochem J.* 279: 75-80.
- Anawalt BD, Bebb RA, Matsumoto AM, Groome NP, Illingworth PJ, McNeilly AS, Bremner WJ (1996). Serum inhibin B levels reflect Sertoli cell function in normal men and men with testicular dysfunction. *J Clin Endocrinol Metab.* 81: 3341-3345.
- Awoniyi CA, Sprando RL, Santulli R, Chandrashekar V, Ewing LL, Zirkin BR (1990). Restoration of spermatogenesis by exogenously administered testosterone in rats made azoospermic by hypophysectomy or withdrawal of luteinizing hormone alone. *Endocrinology* 127: 177-184.
- Ballescá JL, Balasch J, Calafell JM, Alvarez R, Fábregues F, de Osaba MJ, Ascaso C, Vanrell JA (2000). Serum inhibin B determination is predictive of successful testicular sperm extraction in men with non-obstructive azoospermia. *Hum Reprod.* 15: 1734-1738.
- Barak Y, Liao D, He W, Ong ES, Nelson MC, Olefsky JM, Boland R, Evans RM (2002). Effects of peroxisome proliferator-activated receptor delta on placentation, adiposity, and colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci USA.* 99: 1303-1308.
- Bensinger SJ, Tontonoz P (2008). Integration of metabolism and inflammation by lipid-activated nuclear receptors. *Nature* 454: 470-477.
- Blanco-Rodríguez J, Martínez-García C (1999). Apoptosis is physiologically restricted to a specialized cytoplasmic compartment in rat spermatids. *Biol Reprod.* 61: 1541-1547.
- Bonen A, Campbell SE, Benton CR, Chabowski A, Coort SL, Han XX, Koonen DP, Glatz JF, Luiken JJ (2004). Regulation of fatty acid transport by fatty acid translocase/CD36. *Proc Nutr Soc.* 63(2): 245-249.
- Borland K, Muffly KE, Hall PF (1986). Production of components of extracellular matrix by cultured rat Sertoli cells. *Biol Reprod.* 35: 997-1008.
- Bouffard G (1906). Injection des couleurs de benzidine aux animaux normaux. *Ann Inst Pasteur.* 20: 539-546.
- Boussouar F, Benahmed M (2004). Lactate and energy metabolism in male germ cells. *Trends Endocrinol Metab.* 15: 345-350.
- Boussouar F, Mauduit C, Tabone E, Pellerin L, Magistretti PJ, Benahmed M (2003). Developmental and hormonal regulation of the monocarboxylate transporter 2 (MCT2) expression in the mouse germ cells. *Biol Reprod.* 69: 1069-1078.

- Braissant O, Foufelle F, Scotto C, Dauça M, Wahli W (1996). Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR-alpha, -beta, and -gamma in the adult rat. *Endocrinology* 137(1): 354-366.
- Brandt JM, Djouadi F, Kelly DP (1998). Fatty acids activate transcription of the muscle carnitine palmitoyltransferase I gene in cardiac myocytes via the peroxisome proliferator-activated receptor alpha. *J Biol Chem.* 273(37): 23786-23792.
- Bremner WJ, Millar MR, Sharpe RM, Saunders PT (1994). Immunohistochemical localization of androgen receptors in the rat testis: evidence for stage-dependent expression and regulation by androgens. *Endocrinology* 135: 1227-1234.
- Bröer S, Rahman B, Pellegri G, Pellerin L, Martin JL, Verleystonk S, Hamprecht B, Magistretti PJ (1997). Comparison of lactate transport in astroglial cells and monocarboxylate transporter 1 (MCT 1) expressing *Xenopus laevis* oocytes. Expression of two different monocarboxylate transporters in astroglial cells and neurons. *J Biol Chem.* 272: 30096-30102.
- Bröer S, Schneider HP, Bröer A, Rahman B, Hamprecht B, Deitmer JW (1998). Characterization of the monocarboxylate transporter 1 expressed in *Xenopus laevis* oocytes by changes in cytosolic pH. *Biochem J.* 333: 167-174.
- Brugo-Olmedo S, De Vincentiis S, Calamera JC, Urrutia F, Nodar F, Acosta AA (2001). Serum inhibin B may be a reliable marker of the presence of testicular spermatozoa in patients with nonobstructive azoospermia. *Fertil Steril.* 76: 1124-1129.
- Burkart EM, Sambandam N, Han X, Gross RW, Courtois M, Gierasch CM, Shoghi K, Welch MJ, Kelly DP (2007). Nuclear receptors PPARbeta/delta and PPARalpha direct distinct metabolic regulatory programs in the mouse heart. *J Clin Invest.* 117(12): 3930-3939.
- Buzek SW, Caston LA, Sanborn BM (1987). Evidence for age-dependent changes in Sertoli cell androgen receptor concentration. *J Androl.* 8: 83-90.
- Buzek SW, Sanborn BM (1988). Increase in testicular androgen receptor during sexual maturation in the rat. *Biol Reprod.* 39: 39-49.
- Cahn RD, Zwilling E, Kaplan NO, Levine L (1962). Nature and Development of Lactic Dehydrogenases: The two major types of this enzyme form molecular hybrids which change in makeup during development. *Science* 136: 962-969.
- Cancilla B, Risbridger GP (1998). Differential localization of fibroblast growth factor receptor-1, -2, -3, and -4 in fetal, immature, and adult rat testes. *Biol Reprod.* 58: 1138-1145.
- Chakravarthy MV, Lodhi IJ, Yin L, Malapaka RR, Xu HE, Turk J, Semenkovich CF (2009). Identification of a physiologically relevant endogenous ligand for PPARalpha in liver. *Cell* 138(3): 476-488.
- Cheng CY, Grima J, Stahler MS, Guglielmotti A, Silvestrini B, Bardin CW (1990). Sertoli cell synthesizes and secretes a protease inhibitor, alpha 2-macroglobulin. *Biochemistry* 29: 1063-1068.
- Cheng CY, Mruk DD (2002). Cell junction dynamics in the testis: Sertoli-germ cell interactions and male contraceptive development. *Physiol Rev.* 82: 825-874.
- Cheng CY, Mruk DD (2012). The blood-testis barrier and its implications for male contraception. *Pharmacol Rev.* 64(1): 16-64.



- Coleman JD, Prabhu KS, Thompson JT, Reddy PS, Peters JM, Peterson BR, Reddy CC, Vanden Heuvel JP (2007). The oxidative stress mediator 4-hydroxynonenal is an intracellular agonist of the nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor-beta/ delta (PPARbeta/delta). *Free Radic Biol Med.* 42: 1155–1164.
- Conti M, Culler MD, Negro-Vilar A (1988). Adenosine receptor-dependent modulation of inhibin secretion in cultured immature rat Sertoli cells. *Mol Cell Endocrinol.* 59(3): 25525-25529.
- Corpeleijn E, Pelsers MM, Soenen S, Mensink M, Bouwman FG, Kooi ME, Saris WH, Glatz JF, Blaak EE (2008). Insulin acutely upregulates protein expression of the fatty acid transporter CD36 in human skeletal muscle in vivo. *J Physiol Pharmacol.* 59: 77-83.
- Courtens JL, Plöen L (1999). Improvement of spermatogenesis in adult cryptorchid rat testis by intratesticular infusion of lactate. *Biol Reprod.* 61(1): 154-161.
- Cuff MA, Lambert DW, Shirazi-Beechey SP (2002). Substrate-induced regulation of the human colonic monocarboxylate transporter, MCT1. *J Physiol.* 539: 361–371.
- Dailey L, Ambrosetti D, Mansukhani A, Basilico C (2005). Mechanisms underlying differential responses to FGF signaling. *Cytokine Growth Factor Rev.* 16: 233-247.
- Davis CM, Papadopoulos V, Sommers CL, Kleinman HK, Dym M (1990). Differential expression of extracellular matrix components in rat Sertoli cells. *Biol Reprod.* 43: 860-869.
- De Gendt K, Swinnen JV, Saunders PT, Schoonjans L, Dewerchin M, Devos A, Tan K, Atanassova N, Claessens F, Lécureuil C, Heyns W, Carmeliet P, Guillou F, Sharpe RM, Verhoeven G (2004). A Sertoli cell-selective knockout of the androgen receptor causes spermatogenic arrest in meiosis. *Proc Natl Acad Sci. U S A.* 101: 1327-1332.
- de Kretser DM, Buzzard JJ, Okuma Y, O'Connor AE, Hayashi T, Lin SY, Morrison JR, Loveland KL, Hedger MP (2004). The role of activin, follistatin and inhibin in testicular physiology. *Mol Cell Endocrinol.* 225: 57-64.
- de Lange P, Lombardi A, Silvestri E, Goglia F, Lanni A, Moreno M (2008). Peroxisome proliferator-activated receptor delta: a conserved director of lipid homeostasis through regulation of the oxidative capacity of muscle. *PPAR Res.* 2008:172676.
- Degenhardt T, Saramäki A, Malinen M, Rieck M, Väisänen S, Huotari A, Herzig KH, Müller R, Carlberg C (2007). Three members of the human pyruvate dehydrogenase kinase gene family are direct targets of the peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta. *J Mol Biol.* 372(2): 341-355.
- Degrace-Passilly P, Besnard P (2012). CD36 and taste of fat. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 15: 107–111.
- Desvergne B, Michalik L, Wahli W (2004). Be fit or be sick: peroxisome proliferator-activated receptors are down the road. *Mol Endocrinol.* 18(6): 1321-1332.
- Devchand PR, Keller H, Peters JM, Vazquez M, Gonzalez FJ, Wahli W (1996). The PPARalpha-leukotriene B4 pathway to inflammation control. *Nature* 384(6604): 39-43.
- Dimmer KS, Friedrich B, Lang F, Deitmer JW, Bröer S (2000). The low-affinity monocarboxylate transporter MCT4 is adapted to the export of lactate in highly glycolytic cells. *Biochem J.* 350: 219-227.
- Diradourian C, Girard J, Pégrier JP (2005). Phosphorylation of PPARs: from molecular characterization to physiological relevance. *Biochimie* 87: 33–38.

- Djouadi F, Brandt JM, Weinheimer CJ, Leone TC, Gonzalez FJ, Kelly DP (1999). The role of the peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR alpha) in the control of cardiac lipid metabolism. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 60(5-6): 339-343.
- Dowell P, Ishmael JE, Avram D, Peterson VJ, Nevriy DJ, Leid M (1999). Identification of nuclear receptor corepressor as a peroxisome proliferator-activated receptor alpha interacting protein. *J Biol Chem*. 274: 15901–15907.
- Dressel U, Allen TL, Pippal JB, Rohde PR, Lau P, Muscat GE (2003). The peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta agonist, GW501516, regulates the expression of genes involved in lipid catabolism and energy uncoupling in skeletal muscle cells. *Mol Endocrinol*. 17(12): 2477-2493.
- Dutta-Roy AK (2009). Transport of fatty acids across the human placenta: a review, *Prog Lipid Res*. 48: 52–61.
- Dym M, Cavicchia JC (1977). Further observations on the blood-testis barrier in monkeys. *Biol Reprod*. 17: 390–403.
- Dym M, Fawcett DW (1970). The blood-testis barrier in the rat and the physiological compartmentation of the seminiferous epithelium. *Biol Reprod*. 3: 308-326.
- Fajas L, Auboeuf D, Raspé E, Schoonjans K, Lefebvre AM, Saladin R, Najib J, Laville M, Fruchart JC, Deeb S, Vidal-Puig A, Flier J, Briggs MR, Staels B, Vidal H, Auwerx J (1997). The organization, promoter analysis, and expression of the human PPARgamma gene. *J Biol Chem*. 272(30): 18779-18789.
- Fajas L, Debril MB, Auwerx J (2001). PPAR gamma: an essential role in metabolic control. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 11(1): 64-69.
- Fawcett DW, Leak LV, Heidger PM Jr (1970). Electron microscopic observations on the structural components of the blood-testis barrier. *J Reprod Fertil Suppl*. 10: 105–122.
- Fawcett DW, Neaves WB, Flores MN (1973). Comparative observations on intertubular lymphatics and the organization of the interstitial tissue of the mammalian testis. *Biol Reprod*. 9: 500-532.
- Febbraio M, Abumrad NA, Hajjar DP, Sharma K, Cheng W, Pearce SF, Silverstein RL (1999). A null mutation in murine CD36 reveals an important role in fatty acid and lipoprotein metabolism. *J Biol Chem*. 274(27): 19055-19062.
- Febbraio M, Guy E, Coburn C, Knapp FF Jr, Beets AL, Abumrad NA, Silverstein RL (2002). The impact of overexpression and deficiency of fatty acid translocase (FAT)/CD36. *Mol Cell Biochem*. 239(1-2): 193-197.
- Festuccia WT, Blanchard PG, Turcotte V, Laplante M, Sariahmetoglu M, Brindley DN, Richard D, Deshaies Y (2009). The PPARgamma agonist rosiglitazone enhances rat brown adipose tissue lipogenesis from glucose without altering glucose uptake. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 296(5): R1327-1335.
- Finck BN, Bernal-Mizrachi C, Han DH, Coleman T, Sambandam N, LaRiviere LL, Holloszy JO, Semenkovich CF, Kelly DP (2005). A potential link between muscle peroxisome proliferator- activated receptor-alpha signaling and obesity-related diabetes. *Cell Metab*. 1(2): 133-144.
- Forman BM, Chen J, Evans RM (1997). Hypolipidemic drugs, polyunsaturated fatty acids, and eicosanoids are ligands for peroxisome proliferator-activated receptors alpha and delta. *Proc Natl Acad Sci USA*. 94: 4312–4317.

Fritz IB, Rommerts FG, Louis BG, Dorrington JH (1976). Regulation by FSH and dibutyryl cyclic AMP of the formation of androgen-binding protein in Sertoli cell-enriched cultures. *J Reprod Fertil.* 46: 17-24.

Frungieri MB, Calandra RS, Mayerhofer A, Matzkin ME (2015). Cyclooxygenase and prostaglandins in somatic cell populations of the testis. *Reproduction* 149(4): R169-180.

Fu J, Gaetani S, Oveisi F, Lo Verme J, Serrano A, Rodriguez De Fonseca F, Rosengarth A, Luecke H, Di Giacomo B, Tarzia G, Piomelli D (2003). Oleyl ethanolamide regulates feeding and body weight through activation of the nuclear receptor PPAR- $\alpha$ . *Nature* 425: 90–93.

Fukasawa M, Atsuzawa K, Mizutani K, Nakazawa A, Usuda N (2010). Immunohistochemical localization of mitochondrial fatty acids  $\beta$ -oxidation enzymes in rat testis. *J Histochem Cytochem.* 58(2): 195-206.

Galardo MN (2009). Mecanismos moleculares en la función nutricional de la célula de Sertoli pp. 168. Tesis doctoral de la Facultad de Farmacia y Bioquímica-Universidad de Buenos Aires.

Galardo MN, Rigueira M, Riera MF, Pellizzari EH, Cigorruga SB, Meroni SB (2014). Lactate regulates rat male germ cell function through reactive oxygen species. *PLoS One* 9(1): e88024.

Galardo MN, Riera MF, Pellizzari EH, Chemes HE, Venara MC, Cigorruga SB, Meroni SB (2008). Regulation of expression of Sertoli cell glucose transporters 1 and 3 by FSH, IL1  $\beta$ , and bFGF at two different time-points in pubertal development. *Cell Tissue Res.* 334(2): 295-304.

Galardo MN, Riera MF, Pellizzari EH, Cigorruga SB, Meroni SB (2007). The AMP-activated protein kinase activator, 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- $\beta$ -D-ribose, regulates lactate production in rat Sertoli cells. *J Mol Endocrinol.* 39(4): 279-288

Galardo MN, Riera MF, Pellizzari EH, Sobarzo C, Scarcelli R, Denduchis B, Lustig L, Cigorruga SB, Meroni SB (2010). Adenosine regulates Sertoli cell function by activating AMPK. *Mol Cell Endocrinol.* 330(1-2): 49-58.

Galardo MN, Riera MF, Rigueira M, Pellizzari EH, Cigorruga SB, Meroni SB (2013). Different signal transduction pathways elicited by basic fibroblast growth factor and interleukin 1 $\beta$  regulate CREB phosphorylation in Sertoli cells. *J Endocrinol Invest.* 36(5): 331-338.

Geloën A, Helin L, Geeraert B, Malaud E, Holvoet P, Marguerie G (2012). CD36 inhibitors reduce postprandial hypertriglyceridemia and protect against diabetic dyslipidemia and atherosclerosis. *PLoS One* e37633.

Ghisla S, Thorpe C (2004). Acyl-CoA dehydrogenase. A mechanistic overview. *Eur J Biochem.* 271: 494–508.

Gilde AJ, van der Lee KA, Willemsen PH, Chinetti G, van der Leij FR, van der Vusse GJ, Staels B, van Bilsen M (2003). Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)  $\alpha$  and PPAR $\beta$ / $\delta$ , but not PPAR $\gamma$ , modulate the expression of genes involved in cardiac lipid metabolism. *Circ Res.* 92(5): 518-524.

Gillot I, Jehl-Pietri C, Gounon P, Luquet S, Rassoulzadegan M, Grimaldi P, Vidal F (2005). Germ cells and fatty acids induce translocation of CD36 scavenger receptor to the plasma membrane of Sertoli cells. *J Cell Sci.* 118(14): 3027-3035.

- Glatz JF (2015). Lipids and lipid binding proteins: A perfect match, Prostaglandins Leukotrienes Essent Fatty Acids 93: 45-49.
- Glatz JF, Luiken JJ, Bonnen A (2010). Membrane Fatty Acid Transporters as Regulators of Lipid Metabolism: Implications for Metabolic Disease. *Physiol Rev.* 90: 367–417.
- Gloaguen P, Crépieux P, Heitzler D, Poupon A, Reiter E (2011). Mapping the follicle-stimulating hormone-induced signaling networks. *Front Endocrinol. (Lausanne)* 2: 45.
- Gnessi L, Emidi A, Jannini EA, Carosa E, Maroder M, Arizzi M, Ulisse S, Spera G (1995). Testicular development involves the spatiotemporal control of PDGFs and PDGF receptors gene expression and action. *J Cell Biol.* 131: 1105-1121.
- Gnessi L, Fabbri A, Spera G (1997). Gonadal peptides as mediators of development and functional control of the testis: an integrated system with hormones and local environment *Endocr Rev.* 18(4): 541-609.
- Goldmann EE (1909) [Die äußere und innere Sekretion des gesunden und kranken]
- Gorovits N, Charron M (2003). What we know about facilitative Glucose Transporters. *Biochem Molec Biol Ed.* 31: 163-172.
- Grimaldi P, Di Giacomo D, Geremia R (2013). The endocannabinoid system and spermatogenesis. *Front Endocrinol (Lausanne)* 4: 192.
- Griswold MD (1988). Protein secretions of Sertoli cells. *Int Rev Cytol.* 110: 133-156.
- Grootegoed JA, Jansen R, van der Molen HJ (1986b). Effect of glucose on ATP dephosphorylation in rat spermatids. *J Reprod Fertil.* 77: 99-107.
- Grootegoed JA, Oonk RB, Jansen R, van der Molen HJ (1986a). Metabolism of radiolabelled energy-yielding substrates by rat Sertoli cells. *J Reprod Fertil.* 77: 109-118.
- Grootegoed JA, Peters MJ, Mulder E, Rommerts FF, Van der Molen HJ (1977). Absence of a nuclear androgen receptor in isolated germinal cells of rat testis. *Mol Cell Endocrinol.* 9: 159-167.
- Grygiel-Górniak B (2014). Peroxisome proliferator-activated receptors and their ligands: nutritional and clinical implications--a review. *Nutr J.* 13:17.
- Gualtieri AF, Mazzone GL, Rey RA, Schteingart HF (2009). FSH and bFGF stimulate the production of glutathione in cultured rat Sertoli cells. *Int J Androl.* 32(3): 218-225.
- Guan HP, Ishizuka T, Chui PC, Lehrke M, Lazar MA (2005). Corepressors selectively control the transcriptional activity of PPARgamma in adipocytes. *Genes Dev.* 19(4): 453-461.
- Gulick T, Cresci S, Caira T, Moore DD, Kelly DP (1994). The peroxisome proliferator-activated receptor regulates mitochondrial fatty acid oxidative enzyme gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA.* 91(23): 11012-11016.
- Guma FC, Wagner M, Martini LH, Bernard EA (1997). Effect of FSH and insulin on lipogenesis in cultures of Sertoli cells from immature rats. *Braz J Med Biol Res.* 30(5): 591-597.
- Gunsalus GL, Musto NA, Bardin CW (1980). Bidirectional release of a Sertoli cell product, androgen binding protein, into the blood and seminiferous tubule. In: *Testicular Development, Structure, and Function* (Steinberger A, Steinberger E, eds.), pp. 291-297, Raven Press, New York.

Haemmerle G, Lass A, Zimmermann R, Gorkiewicz G, Meyer C, Rozman J, Heldmaier G, Maier R, Theussl C, Eder S, Kratky D, Wagner EF, Klingenspor M, Hoefler G, Zechner R (2006). Defective lipolysis and altered energy metabolism in mice lacking adipose triglyceride lipase. *Science* 312(5774): 734-737.

Haemmerle G, Moustafa T, Woelkart G, Büttner S, Schmidt A, van de Weijer T, Hesselink M, Jaeger D, Kienesberger PC, Zierler K, Schreiber R, Eichmann T, Kolb D, Kotzbeck P, Schweiger M, Kumari M, Eder S, Schoiswohl G, Wongsiriroj N, Pollak NM, Radner FP, Preiss-Landl K, Kolbe T, Rülcke T, Pieske B, Trauner M, Lass A, Zimmermann R, Hoefler G, Cinti S, Kershaw EE, Schrauwen P, Madeo F, Mayer B, Zechner R (2011). ATGL-mediated fat catabolism regulates cardiac mitochondrial function via PPAR- $\alpha$  and PGC-1. *Nat Med.* 17(9): 1076-1085.

Halim ND, McFate T, Mohyeldin A, Okagaki P, Korotchkina LG, Patel MS, Jeoung NH, Harris RA, Schell MJ, Verma A. (2010) Phosphorylation status of pyruvate dehydrogenase distinguishes metabolic phenotypes of cultured rat brain astrocytes and neurons. *Glia* 58(10): 1168-1176.

Hall SH, Joseph DR, French FS, Conti M (1988). Follicle-stimulating hormone induces transient expression of the protooncogene c-fos in primary Sertoli cell cultures. *Mol Endocrinol.* 2: 55-61.

Han IS, Sylvester SR, Kim KH, Schelling ME, Venkateswaran S, Blanckaert VD, McGuinness MP, Griswold MD (1993). Basic fibroblast growth factor is a testicular germ cell product which may regulate Sertoli cell function. *Mol Endocrinol.* 7: 889-897.

Hara T, Kashihara D, Ichimura A, Kimura I, Tsujimoto G, Hirasawa A (2014). Role of free fatty acid receptors in the regulation of energy metabolism *Biochim Biophys Acta* 1841(9): 1292-1300.

He W, Barak Y, Hevener A, Olson P, Liao D, Le J, Nelson M, Ong E, Olefsky JM, Evans RM (2003). Adipose-specific peroxisome proliferator-activated receptor gamma knockout causes insulin resistance in fat and liver but not in muscle. *Proc Natl Acad Sci USA.* 100(26): 15712-15717.

Heckert LL, Griswold MD (1991). Expression of follicle-stimulating hormone receptor mRNA in rat testes and Sertoli cells. *Mol Endocrinol.* 5: 670-677.

Helledie T, Antonius M, Sorensen RV, Hertzog AV, Bernlohr DA, Kolvraa S, Kristiansen K, Mandrup S (2000). Lipid-binding proteins modulate ligand-dependent trans-activation by peroxisome proliferator-activated receptors and localize to the nucleus as well as the cytoplasm. *J Lipid Res.* 41: 1740-1751.

Hettle JA, Waller EK, Fritz IB (1986). Hormonal stimulation alters the type of plasminogen activator produced by Sertoli cells. *Biol Reprod.* 34: 895-904.

Holloway GP, Luiken JJ, Glatz JF, Spriet LL, Bonen A (2008). Contribution of FAT/CD36 to the regulation of skeletal muscle fatty acid oxidation: an overview. *Acta Physiol (Oxf).* 194(4): 293-309.

Holness MJ, Sugden MC (2003). Regulation of pyruvate dehydrogenase complex activity by reversible phosphorylation. *Biochem Soc Trans.* 31(Pt 6): 1143-1151.

Hou WK, Xian YX, Zhang L, Lai H, Hou XG, Xu YX, Yu T, Xu FY, Song J, Fu CL, Zhang WW, Chen L (2007). Influence of blood glucose on the expression of glucose transporter proteins 1 and 3 in the brain of diabetic rats. *Chin Med J (Engl).* 120(19): 1704-1709.

- Huang B, Wu P, Bowker-Kinley MM, Harris RA (2002). Regulation of pyruvate dehydrogenase kinase expression by peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$  ligands, glucocorticoids, and insulin. *Diabetes* 51(2): 276-283.
- Huang B, Wu P, Popov KM, Harris RA. (2003) Starvation and diabetes reduce the amount of pyruvate dehydrogenase phosphatase in rat heart and kidney. *Diabetes* 52(6): 1371-1376.
- Huang H, Starodub O, McIntosh A, Atshaves BP, Woldegiorgis G, Kier AB, Schroeder F (2004). Liver fatty acid-binding protein colocalizes with peroxisome proliferator activated receptor  $\alpha$  and enhances ligand distribution to nuclei of living cells. *Biochemistry* 43: 2484–2500.
- Hurtado de Catalfo GE, Gómez Dumm IN (2005). Influence of testosterone on polyunsaturated fatty acid biosynthesis in Sertoli cells in culture. *Cell Biochem Funct.* 23(3): 175-180.
- Illingworth PJ, Groome NP, Byrd W, Rainey WE, McNeilly AS, Mather JP, Bremner WJ (1996). Inhibin-B: a likely candidate for the physiologically important form of inhibin in men. *J Clin Endocrinol Metab.* 81: 1321-1325.
- Isomaa V, Parvinen M, Jänne OA, Bardin CW (1985). Nuclear androgen receptors in different stages of the seminiferous epithelial cycle and the interstitial tissue of rat testis. *Endocrinology* 116: 132-137.
- Jenkins CM, Yang J, Sims HF, Gross RW (2011). Reversible high affinity inhibition of phosphofructokinase-1 by acyl-CoA: a mechanism integrating glycolytic flux with lipid metabolism. *J Biol Chem.* 286(14): 11937-11950.
- Jeong JY, Jeoung NH, Park KG, Lee I (2012). Transcriptional regulation of pyruvate dehydrogenase kinase. *Diabetes Metab.* 36: 328-335.
- Johnson DE, Williams LT (1993). Structural and functional diversity in the FGF receptor multigene family. *Adv Cancer Res.* 60: 1-41.
- Josso N, di Clemente N, Gouédard L (2001). Anti-Müllerian hormone and its receptors. *Mol Cell Endocrinol.* 179: 25-32.
- Jutte NH, Eikvar L, Levy FO, Hansson V (1985). Metabolism of palmitate in cultured rat Sertoli cells. *J Reprod Fertil.* 73: 497-503.
- Jutte NH, Grootegoed JA, Rommerts FF, van der Molen HJ (1981). Exogenous lactate is essential for metabolic activities in isolated rat spermatocytes and spermatids. *J Reprod Fertil.* 62: 399-405.
- Jutte NH, Jansen R, Grootegoed JA, Rommerts FF, Clausen OP, van der Molen HJ (1982). Regulation of survival of rat pachytene spermatocytes by lactate supply from Sertoli cells. *J Reprod Fertil.* 65: 431-438.
- Jutte NH, Jansen R, Grootegoed JA, Rommerts FF, van der Molen HG (1983). FSH stimulation of the production of pyruvate and lactate by rat Sertoli cells may be involved in hormonal regulation of spermatogenesis. *J Reprod Fertil.* 68(1): 219-226.
- Kaitu'u-Lino TJ, Sluka P, Foo CF, Stanton PG (2007). Claudin-11 expression and localisation is regulated by androgens in rat Sertoli cells in vitro. *Reproduction* 133(6): 1169-1179.
- Kangasniemi M, Kaipia A, Mali P, Toppari J, Huhtaniemi I, Parvinen M (1990a). Modulation of basal and FSH-dependent cyclic AMP production in rat seminiferous tubules staged by an improved transillumination technique. *Anat Rec.* 227(1): 62-76.

- Kangasniemi M, Kaipia A, Toppari J, Mali P, Huhtaniemi I, Parvinen M. (1990b). Cellular regulation of basal and FSH-stimulated cyclic AMP production in irradiated rat testes. *Anat Rec.* 227(1): 32-36.
- Karpova T, Danchuk S, Kolobova E, Popov KM (2003). Characterization of the isozymes of pyruvate dehydrogenase phosphatase: implications for the regulation of pyruvate dehydrogenase activity. *Biochim Biophys Acta* 1652(2): 126-135.
- Katz AM, Messineo FC (1981). Lipid-membrane interactions and the pathogenesis of ischemic damage in the myocardium. *Circ Res.* 48: 1–16.
- Kawasaki Y, Nakagawa A, Nagaosa K, Shiratsuchi A, Nakanishi Y (2002). Phosphatidylserine binding of class B scavenger receptor type I, a phagocytosis receptor of testicular Sertoli cells. *J Biol Chem.* 277(30): 27559–27566.
- Kazantzis M, Stahl A (2012). Fatty acid transport proteins, implications in physiology and diseases. *Biochim Biophys Acta* 1821(5): 852–857.
- Kerr JB, de Kretser DM (1974). Proceedings: The role of the Sertoli cell in phagocytosis of the residual bodies of spermatids. *J Reprod Fertil.* 36: 439-440.
- Kerr JB, Mayberry RA, Irby DC (1984). Morphometric studies on lipid inclusions in Sertoli cell during the spermatogenic cycle in the rat. *Cell Tissue Res.* 236: 699-709
- Kersten S, Wahli W (2000). Peroxisome proliferator activated receptor agonists. *Exs.* 89: 141-151.
- Kim DH, Liu J, Bhat S, Benedict G, Lecka-Czernik B, Peterson SJ, Ebraheim NA, Heck BE (2013). Peroxisome proliferator-activated receptor delta agonist attenuates nicotine suppression effect on human mesenchymal stem cell-derived osteogenesis and involves increased expression of heme oxygenase-1. *J Bone Miner Metab.* 31(1): 44-52.
- Korotchkina LG, Patel MS (1995). Mutagenesis studies of the phosphorylation sites of recombinant human pyruvate dehydrogenase. Site-specific regulation. *J Biol Chem.* 270: 14297–14304.
- Korotchkina LG, Patel MS (2001). Site specificity of four pyruvate dehydrogenase kinase isoenzymes toward the three phosphorylation sites of human pyruvate dehydrogenase. *J Biol Chem.* 276(40): 37223-37229.
- Koruda C, Lee MM, Haq Q, Powell DM, Manganoro TF, Donahoe PK (1990). Mullerian inhibiting substance ontogeny and its modulation by follicle-stimulating hormone in the rat testes. *Endocrinology* 127: 1825-1832.
- Krämer DK, Al-Khalili L, Guigas B, Leng Y, Garcia-Roves PM, Krook A (2007). Role of AMP kinase and PPARdelta in the regulation of lipid and glucose metabolism in human skeletal muscle. *J Biol Chem.* 282(27): 19313-19320.
- Krogsdam AM, Nielsen CA, Neve S, Holst D, Helledie T, Thomsen B, Bendixen C, Mandrup S, Kristiansen K (2002). Nuclear receptor corepressor-dependent repression of peroxisome-proliferator-activated receptor delta-mediated transactivation. *Biochem J.* 363: 157–165.
- Labarca C, Paigen K (1980). A simple, rapid, and sensitive DNA assay procedure. *Anal Biochem.* 102: 344-352.
- Lacroix M, Fritz IB (1982). The control of the synthesis and secretion of plasminogen activator by rat Sertoli cells in culture. *Mol Cell Endocrinol.* 26: 247-258.

- Lacroix M, Smith FE, Fritz IB (1977). Secretion of plasminogen activator by Sertoli cell enriched cultures. *Mol Cell Endocrinol.* 9: 227-236.
- Larsen LN, Granlund L, Holmeide AK, Skattebol L, Nebb HI, Bremer J (2005). Sulfur-substituted and alpha-methylated fatty acids as peroxisome proliferator-activated receptor activators. *Lipids* 40: 49–57.
- Le Magueresse-Battistoni B, Wolff J, Morera AM, Benahmed M (1994). Fibroblast growth factor receptor type 1 expression during rat testicular development and its regulation in cultured Sertoli cells. *Endocrinology* 135: 2404-2411.
- Leblond CP, Clermont Y (1952). Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. *Ann N Y Acad Sci.* 55: 548-573.
- Lee CH, Olson P, Hevener A, Mehl I, Chong LW, Olefsky JM, Gonzalez FJ, Ham J, Kang H, Peters JM, Evans RM (2006). PPARdelta regulates glucose metabolism and insulin sensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103(9): 3444-3449.
- Lee SS, Pineau T, Drago J, Lee EJ, Owens JW, Kroetz DL, Fernandez-Salguero PM, Westphal H, Gonzalez FJ (1995). Targeted disruption of the alpha isoforma of the peroxisome proliferator-activated receptor gene in mice results in abolishment of the pleiotropic effects of peroxisome proliferators. *Mol Cell Biol.* 15(6): 3012–3022.
- Leone TC, Weinheimer CJ, Kelly DP (1999). A critical role for the peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) in the cellular fasting response: the PPARalpha-null mouse as a model of fatty acid oxidation disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96(13): 7473-7478.
- Li Y, Xu Y, Li X, Qin Y, Hu R (2013). Effects of PPAR- $\alpha$  agonist and IGF-1 on estrogen sulfotransferase in human vascular endothelial and smooth muscle cells. *Mol Med Rep.* 8(1): 133-139.
- Lim H, Gupta RA, Ma WG, Paria BC, Moller DE, Morrow JD, DuBois RN, Trzaskos JM, Dey SK (1999). Cyclo-oxygenase-2-derived prostacyclin mediates embryo implantation in the mouse via PPARdelta. *Genes Dev.* 13: 1561–1574.
- Lim HJ, Moon I, Han K (2004). Transcriptional cofactors exhibit differential preference toward peroxisome proliferator-activated receptors alpha and delta in uterine cells. *Endocrinology* 145: 2886–2895.
- Livera G, Rouiller-Fabre V, Pairault C, Levacher C, Habert R (2002). Regulation and perturbation of testicular functions by vitamin A. *Reproduction* 124(2): 173-180.
- Louis BG, Fritz IB (1979). Follicle-stimulating hormone and testosterone independently increase the production of androgen-binding protein by Sertoli cells in culture. *Endocrinology* 104: 454-461.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 193: 265-275.
- Lu CW, Lin SC, Chen KF, Lai YY, Tsai SJ (2008). Induction of pyruvate dehydrogenase kinase-3 by hypoxia-inducible factor-1 promotes metabolic switch and drug resistance. *J Biol Chem.* 283(42): 28106-28114.
- Mandard S, Müller M, Kersten S (2004). Peroxisome proliferator-activated receptor alpha target genes. *Cell Mol Life Sci.* 61(4): 393-416.



Marshall GR, Jockenhövel F, Lüdecke D, Nieschlag E (1986). Maintenance of complete but quantitatively reduced spermatogenesis in hypophysectomized monkeys by testosterone alone. *Acta Endocrinol (Copenh.)*. 113: 424-431.

Mathur PP, Grima J, Mo MY, Zhu LJ, Aravindan GR, Calcagno K, O'Bryan M, Chung S, Mruk D, Lee WM, Silvestrini B, Cheng CY (1997). Differential expression of multiple cathepsin mRNAs in the rat testis during maturation and following lonidamine induced tissue restructuring. *Biochem Mol Biol Int*. 42: 217-233.

Mayerhofer A, Russell LD, Grothe C, Rudolf M, Gratzl M (1991). Presence and localization of a 30-kDa basic fibroblast growth factor-like protein in rodent testes. *Endocrinology* 129: 921-924.

McFate T, Mohyeldin A, Lu H, Thakar J, Henriques J, Halim ND, Wu H, Schell MJ, Tsang TM, Teahan O, Zhou S, Califano JA, Jeoung NH, Harris RA, Verma A (2008). Pyruvate dehydrogenase complex activity controls metabolic and malignant phenotype in cancer cells. *J Biol Chem*. 283(33): 22700-22708.

McIntosh AL, Atshaves BP, Hostetler HA, Huang H, Davis J, Lyuksytova OI, Landrock D, Kier AB, Schroeder F (2009). Liver type fatty acid binding protein (L-FABP) gene ablation reduces nuclear ligand distribution and peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$  activity in cultured primary hepatocytes. *Arch Biochem Biophys*. 485: 160–173.

Means AR (1970). Early effects of FSH upon testicular metabolism. *Adv Exp Biol Med*. 10: 301-309.

Means AR (1971). Concerning the mechanism of FSH action: rapid stimulation of testicular synthesis of nuclear RNA. *Endocrinology* 89: 981-989.

Means AR, Dedman JR, Tash JS, Tindall DJ, van Sickle M, Welsh MJ (1980). Regulation of the testis sertoli cell by follicle stimulating hormone. *Annu Rev Physiol*. 42: 59-70.

Means AR, Hall PF (1967). Effect of FSH on protein biosynthesis in testes of the immature rat. *Endocrinology* 81: 1151-1160.

Means AR, Huckins C (1974). Coupled events in the early biochemical actions of FSH on the Sertoli cells of the testis. *Curr Top Mol Endocrinol*. 1: 145-165.

Meldrum E, Parker PJ, Carozzi A (1991). The PtdIns-PLC superfamily and signal transduction. *Biochim Biophys Acta* 1092(1): 49-71.

Merezhinskaya N, Fishbein WN (2009). Monocarboxylate transporters: past, present, and future. *Histol Histopathol*. 24: 243-264.

Meroni SB, Cánepa DF, Pellizzari EH, Schteingart HF, Cigorruga SB (1998). Effects of purinergic agonists on aromatase and gamma-glutamyl transpeptidase activities and on transferrin secretion in cultured Sertoli cells. *J Endocrinol*. 157: 275-283.

Meroni SB, Riera MF, Pellizzari EH, Cigorruga SB (2002). Regulation of rat Sertoli cell function by FSH: possible role of phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway. *J Endocrinol*. 174(2): 195-204.

Meroni SB, Riera MF, Pellizzari EH, Galardo MN, Cigorruga SB (2004). FSH activates phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B signaling pathway in 20-day-old Sertoli cells independently of IGF-I. *J Endocrinol*. 180(2): 257-265.

- Meroni SB, Riera MF, Pellizzari EH, Schteingart HF, Cigorraga SB (2003). Possible role of arachidonic acid in the regulation of lactate production in rat Sertoli cells. *Int J Androl.* 26(5): 310-317.
- Meroni SB, Suburo AM, Cigorraga SB (2000). Interleukin-1beta regulates nitric oxide production and gamma-glutamyl transpeptidase activity in sertoli cells. *J Androl.* 21(6): 855-861.
- Minnich A, Tian N, Byan G, Bilder G (2001). A potent PPAR $\alpha$  agonist stimulates mitochondrial fatty acid  $\beta$ -oxidation in liver and skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 280: E270–E279.
- Mita M, Hall PF (1982). Metabolism of round spermatids from rats: lactate as the preferred substrate. *Biol Reprod.* 26: 445-455.
- Morales C, Clermont Y, Nadler NJ (1986). Cyclic endocytic activity and kinetics of lysosomes in Sertoli cells of the rat: a morphometric analysis. *Biol Reprod.* 34(1): 207-218.
- Moreno M, Lombardi A, Silvestri E, Senese R, Cioffi F, Goglia F, Lanni A, de Lange P (2010). PPARs: Nuclear Receptors Controlled by, and Controlling, Nutrient Handling through Nuclear and Cytosolic Signaling. *PPAR Res.* pii: 435689.
- Motojima K, Passilly P, Peters JM, Gonzalez FJ, Latruffe N (1998). Expression of putative fatty acid transporter genes are regulated by peroxisome proliferator-activated receptor alpha and gamma activators in a tissue- and inducer-specific manner. *J Biol Chem.* 273(27): 16710-16714.
- Mottillo EP, Bloch AE, Leff T, Granneman JG (2012). Lipolytic products activate peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)  $\alpha$  and  $\delta$  in brown adipocytes to match fatty acid oxidation with supply. *J Biol Chem.* 287(30): 25038-25048.
- Mruk DD, Cheng CY (2008). Anchoring junctions as drug targets: Role in contraceptive development. *Pharmacol Rev.* 60: 146–180.
- Mruk DD, Siu MK, Conway AM, Lee NP, Lau AS, Cheng CY (2003). Role of tissue inhibitor of metalloproteases-1 in junction dynamics in the testis. *J Androl.* 24: 510-523.
- Mueckler M, Thorens B (2013). The SLC2 (GLUT) family of membrane transporters. *Mol Aspects Med.* 34(2-3): 121-138.
- Mullaney BP, Skinner MK (1992). Basic fibroblast growth factor (bFGF) gene expression and protein production during pubertal development of the seminiferous tubule: follicle-stimulating hormone-induced Sertoli cell bFGF expression. *Endocrinology* 131: 2928-2934.
- Muoio DM, MacLean PS, Lang DB, Li S, Houmard JA, Way JM, Winegar DA, Corton JC, Dohm GL, Kraus WE (2002). Fatty acid homeostasis and induction of lipid regulatory genes in skeletal muscles of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha knock-out mice. Evidence for compensatory regulation by PPAR delta. *J Biol Chem.* 277(29): 26089-26097.
- Murphy HD (1965a). Sertoli cell stimulation following intratesticular injections of FSH in the hypophysectomized rat. *Proc Soc Exp Biol Med.* 118: 1202-1205.
- Murphy HD (1965b). Intratesticular assay of FSH hypophysectomized rats. *Proc Soc Exp Biol Med.* 120: 671-675.
- Nakamura M, Okinaga S, Arai K (1984). Metabolism of round spermatids: evidence that lactate is preferred substrate. *Am J Physiol.* 247: 234-242.

- Nakamura M, Okinaga S, Arai K (1986). Studies of metabolism of round spermatids: glucose as unfavorable substrate. *Biol Reprod.* 35: 927-935.
- Naruhn S, Meissner W, Adhikary T, Kaddatz K, Klein T, Watzler B, Muller-Brusselbach S, Muller R (2010). 15-Hydroxyeicosatetraenoic acid is a preferential peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta agonist. *Mol Pharmacol.* 77: 171–184.
- Naville D, Chatelain PG, Avallet O, Saez JM (1990). Control of production of insulin-like growth factor I by pig Leydig and Sertoli cells cultured alone or together. *Cell-cell interactions. Mol Cell Endocrinol.* 70: 217-224.
- Neels JG, Grimaldi PA (2014). Physiological functions of peroxisome proliferator-activated receptor  $\beta$ . *Physiol Rev.* 94: 795–858.
- Nehar D, Mauduit C, Boussouar F, Benahmed M (1997). Tumor necrosis factor- $\alpha$ -stimulated lactate production is linked to lactate dehydrogenase A expression and activity increase in porcine cultured Sertoli cells. *Endocrinology* 138(5): 1964-1971.
- Nehar D, Mauduit C, Boussouar F, Benahmed M (1998). Interleukin 1 $\alpha$  stimulates lactate dehydrogenase A expression and lactate production in cultured porcine Sertoli cells. *Biol Reprod.* 59(6): 1425-1432.
- Newington J, Pitts A, Chien A, Arseneault R, Schubert D, Cumming R (2011). Amyloid beta resistance in nerve cell lines is mediated by the Warburg effect. *PLoS One* 6(4): e19191.
- Oresti GM, García-López J, Aveldaño MI, Del Mazo J (2013). Cell-type-specific regulation of genes involved in testicular lipid metabolism: fatty acid-binding proteins, diacylglycerol acyltransferases, and perilipin 2. *Reproduction* 146(5): 471-480.
- Orth J, Christensen AK (1977). Localization of 125I-labeled FSH in the testes of hypophysectomized rats by autoradiography at the light and electron microscope levels. *Endocrinology* 101: 262-278.
- Orth JM (1982). Proliferation of Sertoli cells in fetal and postnatal rats: a quantitative autoradiographic study. *Anat Rec.* 203: 485-492.
- Orth JM (1984). The role of follicle-stimulating hormone in controlling Sertoli cell proliferation in testes of fetal rats. *Endocrinology* 115: 1248-1255.
- Parvinen M (1982). Regulation of the seminiferous epithelium. *Endocr Rev.* 3(4): 404-417.
- Patel MS, Korotchkina LD (2001). Regulation of mammalian pyruvate dehydrogenase complex by phosphorylation: complexity of multiple phosphorylation sites and kinases. *Exp Mol Med.* 33(4): 191-197.
- Pellerin L, Magistretti PJ (1994). Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91(22): 10625-10629.
- Pesce A, McKay RH, Stolzenbach F, Cahn RD, Kaplan NO (1964). The comparative enzymology of Lactic Dehydrogenases. I. Properties of the crystalline beef and chicken enzymes. *J Biol Chem.* 239: 1753-1761.
- Peters JM, Lee SST, Li W, Ward JM, Gavrilova O, Everett C, Reitman ML, Hudson LD, Gonzalez FJ (2000). Growth, adipose, brain, and skin alterations resulting from targeted disruption of the mouse peroxisome proliferator-activated receptor  $\beta$ ( $\delta$ ). *Mol Cell Biol.* 20(14): 5119-5128.

- Qian X, Mruk DD, Cheng YH, Tang EI, Han D, Lee WM, Wong EW, Cheng CY (2014). Actin binding proteins, spermatid transport and spermiation. *Semin Cell Dev Biol.* 30: 75-85.
- Randle PJ, Garland PB, Hales CN, Newsholme EA (1963). The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet.* 1(7285): 785-789.
- Rardin MJ, Wiley SE, Naviaux RK, Murphy AN, Dixon JE (2009). Monitoring phosphorylation of the pyruvate dehydrogenase complex. *Anal Biochem.* 389(2): 157-164.
- Regueira M, Artagaveytia SL, Galardo MN, Pellizzari EH, Cigorruga SB, Meroni SB, Riera MF (2015). Novel molecular mechanisms involved in hormonal regulation of lactate production in Sertoli cells. *Reproduction* 10.1530/REP-15-0093.
- Rey R, Lukas-Croisier C, Lasala C, Bedecarrás P (2003). AMH/MIS: what we know already about the gene, the protein and its regulation. *Mol Cell Endocrinol.* 211: 21-31.
- Riahi Y, Sin-Malia Y, Cohen G, Alpert E, Gruzman A, Eckel J, Staels B, Guichardant M, Sasson S (2010). The natural protective mechanism against hyperglycemia in vascular endothelial cells: roles of the lipid peroxidation product 4-hydroxydodecadienal and peroxisome proliferator-activated receptor delta. *Diabetes* 59: 808–818.
- Ribbert H (1904). Die Abscheidung intravenos injizierten gelosten Karminis in der Geweben. *Z. Allgem. Physiol.* 4: 201-214.
- Ribet C, Montastier E, Valle C, Bezaire V, Mazzucotelli A, Mairal A, Viguerie N, Langin D (2010). Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha control of lipid and glucose metabolism in human white adipocytes. *Endocrinology* 151(1): 123-133.
- Richardson LL, Kleinman HK, Dym M (1995). Basement membrane gene expression by Sertoli and peritubular myoid cells in vitro in the rat. *Biol Reprod.* 52: 320-330.
- Riera M, Pellizzari E, Regueira M, Galardo M, Meroni S, Cigorruga S (2011). Regulation of ketone bodies production in rat Sertoli cells. 36<sup>th</sup> FEBS Congress. Torino, Italia.
- Riera MF, Galardo MN, Pellizzari EH, Meroni SB, Cigorruga SB (2007). Participation of phosphatidyl inositol 3-kinase/protein kinase B and ERK1/2 pathways in interleukin-1beta stimulation of lactate production in Sertoli cells. *Reproduction* 133(4): 763-773.
- Riera MF, Galardo MN, Pellizzari EH, Meroni SB, Cigorruga SB (2009). Molecular mechanisms involved in Sertoli cell adaptation to glucose deprivation. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 297(4): E907–E914.
- Riera MF, Meroni SB, Gómez GE, Schteingart HF, Pellizzari EH, Cigorruga SB (2001). Regulation of lactate production by FSH, iL1beta, and TNFalpha in rat Sertoli cells. *Gen Comp Endocrinol.* 122: 88-97.
- Riera MF, Meroni SB, Pellizzari EH, Cigorruga SB (2003). Assessment of the roles of mitogen-activated protein kinase and phosphatidyl inositol 3-kinase/protein kinase B pathways in the basic fibroblast growth factor regulation of Sertoli cell function. *J Mol Endocrinol.* 31(2): 279-289.
- Riera MF, Meroni SB, Schteingart HF, Pellizzari EH, Cigorruga SB (2002). Regulation of lactate production and glucose transport as well as of glucose transporter 1 and lactate dehydrogenase A mRNA levels by basic fibroblast growth factor in rat Sertoli cells. *J Endocrinol.* 173: 335-343.

- Risbridger GP, Skinner MK (1992). Evaluation of the effect of peritubular cell secretions and the testicular paracrine factor P-Mod-S on Leydig cell steroidogenesis and immunoactive inhibin production. *Int J Androl.* 15(1): 73-83.
- Robinson R, Fritz IB (1981). Metabolism of glucose by Sertoli cells in culture. *Biol Reprod.* 24: 1032-1041.
- Roepstorff C, Helge JW, Vistisen B, Kiens B (2004). Studies of plasma membrane fatty acid-binding protein and other lipid-binding proteins in human skeletal muscle. *Proc Nutr Soc.* 63: 239-244.
- Russell LD (1993). Form, dimensions and cytology of mammalian Sertoli cells. In: *The Sertoli cell.* (Russell LD, Griswold MD, eds.), pp. 1-38, Cache River Press, Clearwater FL, EE.UU.
- Russell LD, Griswold MD (1993). *The Sertoli cell.* Cache River Press, Clearwater FL, EE.UU.
- Russell LD, Peterson RN (1985). Sertoli cell junctions: morphological and functional correlates. *Int Rev Cytol.* 94: 177-211.
- Sairam MR, Krishnamurthy H (2001). The role of follicle-stimulating hormone in spermatogenesis: lessons from knockout animal models. *Arch Med Res.* 32(6): 601-608.
- Sanborn BM, Steinberger A, Meistrich ML, Steinberger E (1975). Androgen binding sites in testis cell fractions as measured by a nuclear exchange assay. *J Steroid Biochem.* 6: 1459-1465.
- Sanborn BM, Wagle JR, Steinberger A, Greer-Emmert D (1986). Maturation and hormonal influences on Sertoli cell function. *Endocrinology* 118: 1700-1709.
- Sanderson LM, Boekschoten MV, Desvergne B, Müller M, Kersten S (2010). Transcriptional profiling reveals divergent roles of PPARalpha and PPARbeta/delta in regulation of gene expression in mouse liver. *Physiol Genomic.* 41(1): 42-52.
- Sanderson LM, Degenhardt T, Koppen A, Kalkhoven E, Desvergne B, Müller M, Kersten S (2009). Peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta (PPARbeta/delta) but not PPARalpha serves as a plasma free fatty acid sensor in liver. *Mol Cell Biol.* 29(23): 6257-6267.
- Sang QX, Dym M, Byers SW (1990). Secreted metalloproteinases in testicular cell culture. *Biol Reprod.* 43: 946-955.
- Santemma V, Salfi V, Casasanta N, Fabbrini A (1987). Lactate dehydrogenase and malate dehydrogenase of Sertoli cells in rats. *Arch Androl.* 19: 59-64.
- Santulli R, Sprando RL, Awoniyi CA, Ewing LL, Zirkin BR (1990). To what extent can spermatogenesis be maintained in the hypophysectomized adult rat testis with exogenously administered testosterone? *Endocrinology* 126: 95-101.
- Sar M, Lubahn DB, French FS, Wilson EM (1990). Immunohistochemical localization of the androgen receptor in rat and human tissues. *Endocrinology* 127: 3180-3186.
- Sasso-Cerri E, Giovanoni M, Hayashi H, Miraglia SM (2001). Morphological alterations and intratubular lipid inclusions as indicative of spermatogenic damage in cimetidine-treated rats. *Arch Androl.* 46(1): 5-13.
- Sato O, Kuriki C, Fukui Y, Motojima K (2002). Dual promoter structure of mouse and human fatty acid translocase/CD36 genes and unique transcriptional activation by peroxisome

proliferator-activated receptor alpha and gamma ligands. *J Biol Chem.* 277(18): 15703-15711.

Schteingart HF, Meroni SB, Cánepa DF, Pellizzari EH, Cigorruga SB (1999). Effects of basic fibroblast growth factor and nerve growth factor on lactate production, gamma-glutamyl transpeptidase and aromatase activities in cultured Sertoli cells. *Eur J Endocrinol.* 141: 539-545.

Schteingart HF, Rivarola MA, Cigorruga SB (1989). Hormonal and paracrine regulation of gamma-glutamyl transpeptidase in rat Sertoli cells. *Mol Cell Endocrinol.* 67: 73-80.

Sertoli E (1865). Dell'esistenza di particolari cellule ramificate nei canalicoli seminiferi del testicolo umano. *Il Morgagni* 7: 31-39.

Setchell BP (2008). Blood-testis barrier, junctional and transport proteins and spermatogenesis. In: Cheng, CY., editor. *Molecular Mechanisms in Spermatogenesis.* Austin, TX: Landes Bioscience/ Springer Science. p. 212-233.

Setchell BP, Waites GM (1975). The blood-testis barrier, in *The Handbook of Physiology, Section 7 Endocrinology, Volume V, Male Reproductive System* (Hamilton).

Seth A, Steel JH, Nichol D, Pocock V, Kumaran MK, Fritah A, Mobberley M, Ryder TA, Rowleron A, Scott J, Poutanen M, White R, Parker M (2007). The transcriptional corepressor RIP140 regulates oxidative metabolism in skeletal muscle. *Cell Metab.* 6: 236–245.

Shan LX, Bardin CW, Hardy MP (1997). Immunohistochemical analysis of androgen effects on androgen receptor expression in developing Leydig and Sertoli cells. *Endocrinology* 138: 1259-1266.

Shan LX, Zhu LJ, Bardin CW, Hardy MP (1995). Quantitative analysis of androgen receptor messenger ribonucleic acid in developing Leydig cells and Sertoli cells by in situ hybridization. *Endocrinology* 136: 3856-3862.

Sharpe RM, Turner KJ, McKinnell C, Groome NP, Atanassova N, Millar MR, Buchanan DL, Cooke PS (1999). Inhibin B levels in plasma of the male rat from birth to adulthood: effect of experimental manipulation of Sertoli cell number. *J Androl.* 20: 94-101.

Shiratsuchi A, Kawasaki Y, Ikemoto M, Arai H, Nakanishi Y (1999). Role of class B scavenger receptor type I in phagocytosis of apoptotic rat spermatogenic cells by Sertoli cells. *J Biol Chem.* 274: 5901-5908.

Silverstein RL, Febbraio M (2009). CD36, a scavenger receptor involved in immunity, metabolism, angiogenesis, and behavior. *Sci Signal.* 2(72): re3.

Simoni M, Gromoll J, Nieschlag E (1997). The follicle-stimulating hormone receptor: biochemistry, molecular biology, physiology, and pathophysiology. *Endocr Rev.* 18: 739-773.

Skinner MK, Fritz IB (1985). Testicular peritubular cells secrete a protein under androgen control that modulates Sertoli cell functions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 82: 114-118.

Skinner MK, Griswold MD (1980). Sertoli cells synthesize and secrete transferrin-like protein. *J Biol Chem.* 255: 9523-9525.

Skinner MK, Griswold MD (1982). Secretion of testicular transferrin by cultured Sertoli cells is regulated by hormones and retinoids. *Biol Reprod.* 27: 211-221

Skinner MK, Griswold MD (1983). Sertoli cells synthesize and secrete a ceruloplasmin-like protein. *Biol Reprod.* 28: 1225-1229.

Skinner MK, Griswold MD (2004). *Sertoli cell Biology*. Elsevier, UK. pp 488 Print Book ISBN :9780124170476.

Slongo ML, Zampieri M, Onisto M (2002). Expression of matrix metalloproteases (MMP-2, MT1 -MMP) and their tissue inhibitor (TIMP-2) by rat sertoli cells in culture: implications for spermatogenesis. *Biol Chem.* 383: 235-239.

Smith EP, Hall SH, Monaco L, French FS, Wilson EM, Conti M (1989). A rat Sertoli cell factor similar to basic fibroblast growth factor increases c-fos messenger ribonucleic acid in cultured Sertoli cells. *Mol Endocrinol.* 3: 954-961.

Steinberger A, Hintz M, Heindel JJ (1978). Changes in cyclic AMP responses to FSH in isolated rat Sertoli cells during sexual maturation. *Biol Reprod.* 19: 566-572.

Steinberger A, Jakubowiak A (1993). Sertoli cell culture: Historical perspectiva end review of methods. In: *The Sertoli cell.* (Russell LD, Griswold MD, eds.), pp. 156-179, Cache River Press, Clearwater, FL.

Storch J, Corsico B (2008). The emerging functions and mechanisms of mammalian fatty acid-binding proteins. *Annu Rev Nutr.* 28: 73-95.

Storey SM, McIntosh AL, Huang H, Martin GG, Landrock KK, Landrock D, Payne HR, Kier AB, Schroeder F (2012). Loss of intracellular lipid binding proteins differentially impacts saturated fatty acid uptake and nuclear targeting in mouse hepatocytes. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 303: G837–G850.

Stremmel W, Lotz G, Strohmeyer G, Berk PD (1985). Identification, isolation, and partial characterization of a fatty acid binding protein from rat jejunal microvillous membranes. *J Clin Invest.* 75: 1068–1076.

Tan NS, Shaw NS, Vinckenbosch N, Liu P, Yasmin R, Desvergne B, Wahli W, Noy N (2002). Selective cooperation between fatty acid binding proteins and peroxisome proliferator-activated receptors in regulating transcription. *Mol Cell Biol.* 22: 5114–5127.

Tanaka T, Yamamoto J, Iwasaki S, Asaba H, Hamura H, Ikeda Y, Watanabe M, Magoori K, Ioka RX, Tachibana K, Watanabe Y, Uchiyama Y, Sumi K, Iguchi H, Ito S, Doi T, Hamakubo T, Naito M, Auwerx J, Yanagisawa M, Kodama T, Sakai J (2003). Activation of peroxisome proliferator-activated receptor delta induces fatty acid beta-oxidation in skeletal muscle and attenuates metabolic syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100(26): 15924-15929.

Teboul L, Febbraio M, Gaillard D, Amri EZ, Silverstein R, Grimaldi PA (2001). Structural and functional characterization of the mouse fatty acid translocase promoter: activation during adipose differentiation. *Biochem J.* 360(2): 305-312.

Termine JD, Kleinman HK, Whitson SW, Conn KM, McGarvey ML, Martin GR (1981). Osteonectin, a bone-specific protein linking mineral to collagen. *Cell* 26: 99-105.

Thomas K, Sung DY, Chen X, Thompson W, Chen YE, McCarrey J, Walker W, Griswold M (2011). Developmental patterns of PPAR and RXR gene expression during spermatogenesis. *Front Biosci (Elite Ed).* 3: 1209-1220.

Thorens B, Weir GC, Leahy JL, Lodish HF, Bonner-Weir S (1990). Reduced expression of the liver/beta-cell glucose transporter isoforma in glucose-insensitive pancreatic beta cells of diabetic rats. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87(17): 6492-6496.

- Toebosch AM, Robertson DM, Klaij IA, de Jong FH, Grootegoed JA (1989). Effects of FSH and testosterone on highly purified rat Sertoli cells: inhibin alpha-subunit mRNA expression and inhibin secretion are enhanced by FSH but not by testosterone. *J Endocrinol.* 122: 757-762.
- Tsuruta JK, O'Brien DA, Griswold MD (1993). Sertoli cell and germ cell cystatin C: stage-dependent expression of two distinct messenger ribonucleic acid transcripts in rat testes. *Biol Reprod.* 49: 1045-1054.
- Ueno H, Mori H (1990). Morphometrical analysis of Sertoli cell ultrastructure during the seminiferous epithelial cycle in rats. *Biol Reprod.* 43: 769-776.
- Uppenberg J, Svensson C, Jaki M, Bertilsson G, Jendeborg L, Berkenstam A (1998). Crystal structure of the ligand binding domain of the human nuclear receptor PPARgamma. *J Biol Chem.* 273: 31108–31112.
- van der Lee KA, Vork MM, De Vries JE, Willemsen PH, Glatz JF, Reneman RS, Van der Vusse GJ, Van Bilsen M (2000). Long-chain fatty acid-induced changes in gene expression in neonatal cardiac myocytes. *J Lipid Res.* 41(1): 41-47.
- Vanden Heuvel JP (1999). Peroxisome proliferator-activated receptors: a critical link among fatty acids, gene expression and carcinogenesis. *J Nutr.* 129(2S Suppl): 575S-580S.
- Verhoeven G, Cailleau J (1988). Follicle-stimulating hormone and androgens increase the concentration of the androgen receptor in Sertoli cells. *Endocrinology* 122: 1541-1550.
- Vernon RB, Sage H (1989). The calcium-binding protein SPARC is secreted by Leydig and Sertoli cells of the adult mouse testis. *Biol Reprod.* 40: 1329-1340.
- Vogl A, Vaid K, Guttman J (2008). The Sertoli cell cytoskeleton. In: Cheng, CY., editor. *Molecular Mechanisms in Spermatogenesis.* Austin, TX: Landes Bioscience/Springer Science p. 186-211.
- Von Kolliker RA (1841). *Beitrage zur kenntnis der geschlechtsuerhaltnisse und der samenflussigkeit wirbelloser tiere.* Berlin.
- Wang H, Wang H, Xiong W, Chen Y, Ma Q, Ma J, Ge Y, Han D (2006). Evaluation on the phagocytosis of apoptotic spermatogenic cells by Sertoli cells in vitro through detecting lipid droplet formation by Oil Red O staining. *Reproduction* 132(3): 485-492.
- Wang Y, Sternfeld L, Yang F, Rodriguez JA, Ross C, Hayden MR, Carriere F, Liu G, Hofer W, Schulz I (2009). Enhanced susceptibility to pancreatitis in severe hypertriglyceridaemic lipoprotein lipase-deficient mice and agonist-like function of pancreatic lipase in pancreatic cells. *Gut* 58: 422–430.
- Wang YX, Lee CH, Tjep S, Yu RT, Ham J, Kang H, Evans RM, (2003). Peroxisome-proliferator-activated receptor delta activates fat metabolism to prevent obesity. *Cell* 113(2): 159-170.
- Wang Z, Iwasaki Y, Zhao LF, Nishiyama M, Taguchi T, Tsugita M, Kambayashi M, Hashimoto K, Terada Y (2009). Hormonal regulation of glycolytic enzyme gene and pyruvate dehydrogenase kinase/phosphatase gene transcription. *Endocr J.* 56(8): 1019-1030.
- Wright WW, Luzarraga ML (1986). Isolation of cyclic protein-2 from rat seminiferous tubule fluid and Sertoli cell culture medium. *Biol Reprod.* 35: 761-772.
- Wright WW, Musto NA, Mather JP, Bardin CW (1981). Sertoli cells secrete both testis-specific and serum proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 78: 7565-7569.



Wu P, Blair PV, Sato J, Jaskiewicz J, Popov KM & Harris RA (2000). Starvation increases the amount of pyruvate dehydrogenase kinase in several mammalian tissues. *Arch Biochem Biophys.* 381: 1-7.

Wu P, Sato J, Zhao Y, Jaskiewicz J, Popov KM, Harris RA (1998). Starvation and diabetes increase the amount of pyruvate dehydrogenase kinase isoenzyme 4 in rat heart. *Biochem J.* 329 (Pt1): 197-201.

Wu X, Freeze HH (2002). GLUT14, a duplicon of GLUT3, is specifically expressed in testis as alternative splice forms. *Genomics* 80: 553-557.

Xiao X, Mruk DD, Wong EW, Lee WM, Han D, Wong CK, Cheng CY (2014). Differential effects of c-Src and c-Yes on the endocytic vesicle-mediated trafficking events at the Sertoli cell blood-testis barrier: an in vitro study. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 307(7): E553-E562.

Xie P, Zhang AT, Wang C, Azzam MM, Zou XT (2012). Molecular cloning, characterization, and expression analysis of fatty acid translocase (FAT/CD36) in the pigeon (*Columba livia domestica*). *Poult Sci.* 91(7): 1670-1679.

Xiong W, Wang H, Wu H, Chen Y, Han D (2009). Apoptotic spermatogenic cells can be energy sources for Sertoli cells. *Reproduction* 137(3): 469-479.

Xu HE, Lambert MH, Montana VG, Parks DJ, Blanchard SG, Brown PJ, Sternbach DD, Lehmann JM, Wisely GB, Willson TM, Kliewer SA, Milburn MV (1999). Molecular recognition of fatty acids by peroxisome proliferator-activated receptors. *Mol Cell.* 3: 397-403.

Yang Y, Chen M, Loux TJ, Harmon CM (2007). Regulation of FAT/CD36 mRNA gene expression by long chain fatty acids in the differentiated 3T3-L1 cells. *Pediatr Surg Int.* 23(7): 675-683

Zanatta L, Zamoner A, Zanatta AP, Bouraïma-Lelong H, Delalande C, Bois C, Carreau S, Silva FR. (2011). Nongenomic and genomic effects of 1 $\alpha$ ,25(OH) $_2$  vitamin D3 in rat testis. *Life Sci.* 89(15-16): 515-523.

Zimmermann R, Strauss JG, Haemmerle G, Schoiswohl G, Birner-Gruenberger R, Riederer M, Lass A, Neuberger G, Eisenhaber F, Hermetter A, Zechner R (2004). Fat Mobilization in Adipose Tissue Is Promoted by Adipose Triglyceride Lipase. *Science* 306(5700): 1383-1386.