

**PARTICIPACIÓN DEL PPAR γ EN LA REGULACIÓN DEL METABOLISMO
ENERGÉTICO DE LA CÉLULA DE SERTOLI**

Trabajo Final de Grado
de la alumna

AGOSTINA GORGA

Este trabajo ha sido presentado como requisito
para la obtención del título de

Licenciado en Genética

Carrera: Licenciatura en Genética

Escuela de Ciencias Agrarias, Naturales y Ambientales.
Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires.

Pergamino, 25 de Febrero de 2016

Agradecimientos

Quiero agradecer en primer lugar a mis papás, Mariana y Horacio, mis pilares en el mundo, mis ganas de vivir, mis ejemplos a seguir.

A mis hermanas que siempre me alentaron a seguir adelante; Meli mi amiga y mi segunda mamá, y Lu, mi compañera, mi hermanita por siempre. Sin su apoyo incondicional en todo momento (y sobre todo cuando creía que no iba a lograrlo) este resultado no hubiera sido posible.

A mis abuelos Lolo y Pocha, mi debilidad!! Gracias por estar siempre cerca.

A Fer y Sandra, mi familia en Buenos Aires, gracias por hacer que no me faltara nada en este año y medio! Y por permitirme lograr mi objetivo.

A Silvi, Fer, Noe, Eli, Marian, Maria del Carmen y Merce. Gracias en primer lugar por permitirme ser parte de este hermoso grupo. Gracias por enseñarme todo lo que se y más! Por la predisposición, la paciencia y el apoyo de siempre!! Infinitamente gracias!!!

A Joaco y Gustavo. Gracias por compartir el CEDIE conmigo, por ayudarme y enseñarme.

A mis amigas, las de Los Toldos y las que me dio la UNNOBA. Gracias por estar siempre!! Por escucharme, aconsejarme e incentivarme siempre! En especial a Na, Dai y Sabi que me acompañan desde el primer momento en este camino (y vamos por mas!!).

A la UNNOBA, por darme la oportunidad de ser una profesional. A mis profesores, que con gran dedicación me guiaron y me dieron las herramientas para que hoy lograra llegar a la meta.

Introducción.....	1
CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES DE LA CÉLULA DE SERTOLI.....	2
CARACTERÍSTICAS FUNCIONALES DE LA CÉLULA DE SERTOLI.....	3
1) <i>Soporte estructural</i>.....	4
2) <i>Barrera de permeabilidad selectiva</i>.....	4
3) <i>Movimiento de células germinales</i>.....	5
4) <i>Actividad fagocítica</i>.....	5
5) <i>Provisión de nutrientes y factores regulatorios</i>.....	6
5.1) <i>Producción de lactato y mecanismos bioquímicos involucrados</i>.....	7
REGULACIÓN HORMONAL DE LA CÉLULA DE SERTOLI.....	9
Regulación por FSH y andrógenos.....	9
Regulación paracina/autocrina.....	10
METABOLISMO ENERGÉTICO DE LA CÉLULA DE SERTOLI.....	11
METABOLISMO DE ÁCIDOS GRASOS.....	13
1) Transporte de ácidos grasos a través de la membrana plasmática.....	14
2) Activación de ácidos grasos.....	14
3) Síntesis de TAGs.....	15
4) Formación de gotas lipídicas.....	16
REGULACIÓN DEL METABOLISMO LIPIDICO POR RECEPTORES ACTIVADOS POR PROLIFERADORES DE PEROXISOMAS (PPAR).....	18
Hipótesis.....	22
Objetivo General.....	22
Objetivos Específicos.....	22
Materiales y Métodos.....	23

-MATERIALES	23
-MÉTODOS	23
Aislamiento y cultivo de células de Sertoli	23
Extracción de ARN total y síntesis de ADN copia	25
Determinación de los niveles de ARNm por RT-PCR cuantitativa (RT-qPCR)	25
Caracterización de la expresión de las isoformas de GPATs y PLINs por RT-PCR	26
Determinación por Western Blot de los niveles de p-PDC	29
Determinación del contenido de TAGs	31
Determinación de gotas lipídicas	31
Determinación del consumo de glucosa	32
Ensayo de incorporación de 2-desoxi-D-glucosa (2-DOG)	32
Determinación de la actividad de lactato deshidrogenasa (LDH)	33
Determinación de lactato	33
Transfección y ensayo de gen reportero luciferasa	34
Determinación de la viabilidad celular	34
Determinación de ADN	35
Análisis estadístico	35
-DISEÑO EXPERIMENTAL	35
<i>Validación de RSG como herramienta para evaluar la activación de PPARγ en células de Sertoli</i>	35
1) Estudio de la regulación por activación de PPARγ de los mecanismos moleculares que participan en la síntesis de TAGs y formación de gotas lipídicas en la célula de Sertoli	36
<i>a) Caracterización de la expresión de isoformas de GPATs y PLINs en</i>	

<i>células de Sertoli</i>	36
<i>b) Regulación de la expresión de FAT/CD36, GPATs, DGAT1 y PLINs por RSG</i>	37
<i>c) Regulación del contenido de TAGs y gotas lipídicas por RSG</i>	37
2) Estudio de la regulación por activación de PPARγ de los mecanismos moleculares involucrados en la producción de lactato por las células de Sertoli	37
<i>a) Regulación del consumo de glucosa, de la producción de lactato, de la incorporación de glucosa y de la actividad LDH</i>	37
<i>b) Regulación de la expresión de GLUT1, GLUT2, PFKFB3, PKM2 y LDH A por RSG</i>	38
<i>c) Regulación del estado de fosforilación del PDC por RSG</i>	38
Resultados	39
<i>Regulación por activación de PPARγ de los mecanismos moleculares que participan en la síntesis de TAGs y en la formación de gotas lipídicas en la célula de Sertoli</i>	41
❖ <i>Regulación de la expresión del transportador de ácidos grasos FAT/CD36 por activación de PPARγ</i>	42
❖ <i>Caracterización de la expresión de las isoformas de GPAT en células de Sertoli</i>	43
❖ <i>Regulación de la expresión de las isoformas de GPATs por activación de PPARγ</i>	43
❖ <i>Regulación de la expresión de DGAT1 por activación de PPARγ</i>	45
❖ <i>Regulación del contenido de TAGs por activación de PPARγ</i>	45
❖ <i>Caracterización de la expresión de las isoformas de PLIN en células de Sertoli</i>	46

❖ <i>Regulación de la expresión de las isoformas de PLINs por activación de PPARγ.....</i>	47
❖ <i>Regulación del contenido de gotas lipídicas por activación de PPARγ.....</i>	49
Regulación por activación de PPARγ de los mecanismos moleculares involucrados en la producción de lactato por las células de Sertoli.....	50
❖ <i>Regulación del consumo de glucosa por activación de PPARγ.....</i>	50
❖ <i>Regulación de la entrada de glucosa y expresión de GLUT1 y GLUT2 por activación de PPARγ.....</i>	51
❖ <i>Regulación de la expresión de PFKFB3 y PKM2 por activación de PPARγ...</i>	52
❖ <i>Regulación de los niveles de p-PDC por activación de PPARγ.....</i>	54
❖ <i>Regulación de la actividad de LDH y de la expresión de LDH A por activación de PPARγ.....</i>	55
❖ <i>Regulación de la producción de lactato por activación de PPARγ.....</i>	56
Discusión.....	58
Conclusiones.....	76
Bibliografía.....	77

Introducción

El testículo de los mamíferos es un órgano complejo encargado de dos funciones esenciales para la conservación de la especie: la síntesis y secreción de testosterona y la producción de un número suficiente de espermatozoides. Está compuesto por dos compartimientos que están relacionados estructural y funcionalmente: el compartimiento intersticial y el compartimiento tubular. En el compartimiento intersticial o inter-tubular se encuentran células de Leydig –responsables de la producción de andrógenos–, fibroblastos, macrófagos, linfocitos y mastocitos embebidos en una matriz conectiva laxa en la que además se observa la presencia de vasos sanguíneos de variado calibre, nervios y vasos linfáticos (Fawcett y col., 1973). El compartimiento tubular es un sector avascularizado del testículo y está rodeado por una capa de células mioideas denominadas peritubulares. Continuando hacia el interior del túbulo seminífero se halla la membrana basal y apoyadas sobre la misma se encuentran las células de Sertoli.

La existencia de una barrera hemato-testicular divide al compartimiento tubular o túbulo seminífero en un compartimiento basal, conteniendo espermatogonias y espermatocitos meióticos hasta el estadio de preleptotene, y uno adluminal, que contiene espermatocitos y espermátides en distintos estadios de maduración. Como consecuencia del establecimiento de 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 el aporte de nutrientes, factores de crecimiento y asimismo para la eliminación de productos de desecho. Este hecho determina la importancia fundamental de la célula de Sertoli en el desarrollo de una espermatogénesis normal.

CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES DE LA CÉLULA DE SERTOLI

La descripción histológica de estas células se remonta al año 1865 cuando Enrico Sertoli puntualizó la existencia en el túbulo seminífero de una célula con características particulares que luego llevaría su nombre. La denominó “cellula ramificata” y describió un extenso citoplasma que se extendía entre las células germinales en desarrollo y la presencia de gotas lipídicas características (Sertoli, 1865).

La célula de Sertoli posee una arquitectura columnar y se extiende desde la membrana basal hasta la luz tubular. Presenta numerosas prolongaciones laterales y apicales que le otorgan un aspecto arbóreo y que dan albergue a las células espermatogénicas, conformando así un epitelio cilíndrico simple peculiar. Esta célula posee un extenso citoplasma y un núcleo con ubicación basal, muchas veces indentado, eucromático y con uno o dos nucléolos prominentes. En el citoplasma se observa un retículo endoplasmático y un aparato de Golgi peri- y supranuclear muy desarrollados, lo que sugiere una alta capacidad de esta célula para procesar y secretar proteínas. La ausencia de gránulos de secreción en el citoplasma sugiere que las proteínas no son almacenadas dentro de la célula sino que se secretan inmediatamente luego de su síntesis. Cabe mencionar que estudios de microscopía electrónica demuestran una distribución desigual de las organelas en el citoplasma. Estas observaciones probablemente reflejen un funcionamiento regional de la célula de Sertoli que estaría relacionado con necesidades particulares de las células germinales con las que contacta.

Existen otras características morfológicas de la célula de Sertoli que también se relacionan con su funcionalidad (Figura 1). Entre dichas características merecen mencionarse la presencia de: 1) un citoesqueleto elaborado que permite el sostén de las células germinales, 2) los complejos de especialización ectoplásmica apical y tubulobulbar formados por filamentos de actina y cisternas del retículo endoplasmático que también se

asocian con la función de sostén, 3) numerosos lisosomas y vacuolas que participan en el proceso de fagocitosis y digestión de células germinales en degeneración y de cuerpos residuales y 4) las uniones especializadas entre células de Sertoli vecinas que participan en la formación de la barrera hemato-testicular.

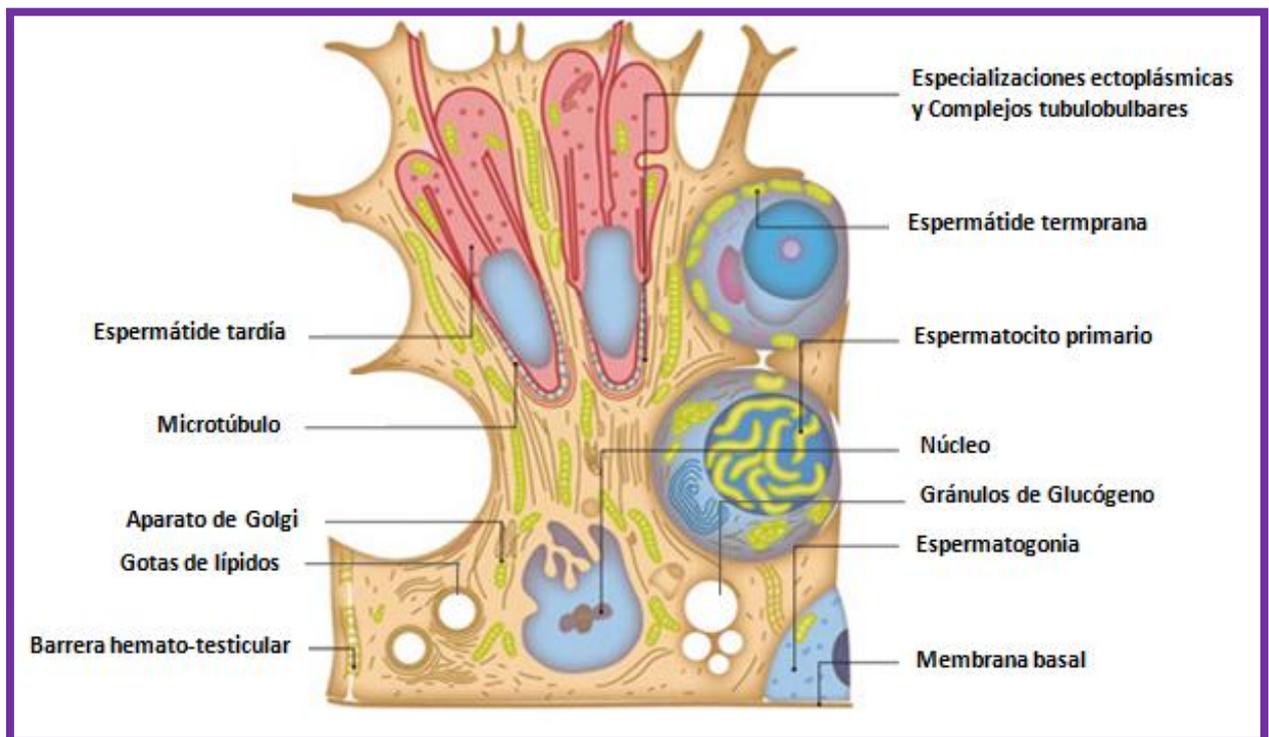


FIGURA 1. El esquema ilustra la ultraestructura de una célula de Sertoli. Se destacan: Aparato de Golgi, Microtúbulos, Núcleo, Membrana basal, Gotas de lípidos, Gránulos de glucógeno, Especializaciones ectoplásmicas y Complejos tubulobulbares. Se pueden observar también células germinales en íntimo contacto con la célula de Sertoli como: Espermátide temprana, Espermátide tardía, Espermatocito 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 células de Sertoli ejercen funciones esenciales sobre el mantenimiento de las células germinales que están relacionadas, entre otros aspectos, con que estas células: 1) proveen soporte estructural; 2) crean una barrera de permeabilidad selectiva; 3) participan en el movimiento de las células germinales; 4) poseen actividad fagocítica y 5) tienen una gran actividad secretoria mediante la cual proporcionan nutrientes y factores regulatorios

a las células germinales en desarrollo. Puede concluirse que la célula de Sertoli ejerce múltiples funciones especializadas que realiza en forma simultánea con el objeto de mantener a las células germinales en desarrollo. En los siguientes párrafos se comentarán brevemente algunos de estos aspectos.

1) *Soporte estructural*

Una característica destacada de la célula de Sertoli es su citoesqueleto prominente que es uno de los más sofisticados de los descritos en distintos tipos celulares (Vogl y col., 2008). Los filamentos de actina, los filamentos intermedios y los microtúbulos tienen una distribución característica que cambia con los ciclos del epitelio seminífero. Cada uno de estos componentes está concentrado o relacionado a uniones intercelulares. Numerosos estudios morfológicos mostraron que dicho 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 sitios en la membrana en el contacto célula-célula y célula-matriz extracelular, d) del posicionamiento, anclaje y movimiento de las distintas células germinales y e) de la liberación de las espermatídes maduras en la espermiación.

2) *Barrera de permeabilidad selectiva*

El establecimiento de la barrera hemato-testicular determina una división del epitelio seminífero en compartimientos separados no sólo desde el punto de vista físico sino también fisiológico. En este contexto, la composición en iones, aminoácidos, proteínas, hidratos de carbono, lípidos y vitaminas del fluido tubular difiere considerablemente de la del plasma sanguíneo y constituye el medio adecuado para el desarrollo de la espermatogénesis. Este fluido tubular es generado por las células de Sertoli, las cuales secretan eficientemente productos necesarios para la diferenciación de

las células germinales. La barrera hemato-testicular crea además una barrera inmunológica ya que previene la entrada de inmunoglobulinas y linfocitos al compartimiento adluminal. Este último hecho asegura que el sistema inmune del organismo no reconozca antígenos presentes en la superficie de las células germinales haploides.

Otra característica particular de la barrera hemato-testicular es que la misma posee una naturaleza dinámica ya que debe abrirse periódicamente para permitir el pasaje de los espermátocitos preleptoténicos/leptoténicos desde el compartimiento basal hacia el compartimiento adluminal. Este proceso de transposición requiere que las uniones celulares se desarmen y se vuelvan a armar (Lui y col., 2003).

3) *Movimiento de células germinales*

Las células germinales carecen de la arquitectura característica de células que migran como la que poseen los fibroblastos, por lo que el movimiento de las mismas hacia la luz tubular que acompaña el proceso de diferenciación es activamente controlado por las células de Sertoli (Russell, 1977). Cabe destacar que en el movimiento de las células germinales están involucrados tres procesos diferentes: 1) la transposición, que comprende el pasaje de un espermátocito 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 una espermátide madura a la luz tubular.

4) *Actividad fagocítica*

En cuanto a la capacidad fagocítica las células de Sertoli tienen un comportamiento semejante a los macrófagos. Los cuerpos residuales liberados por las espermátides durante la espermiación y las células germinales apoptóticas que degeneran durante la

espermatogénesis son fagocitados por la célula de Sertoli (Kerr y de Kretser, 1974; Shiratsuchi y col., 1999). Esta función fagocítica es esencial para el mantenimiento de la integridad del epitelio seminífero que de otra forma se colmaría de células en degeneración y cuerpos residuales. Otra particularidad de la fagocitosis en las células de Sertoli es que la misma resulta en la formación de numerosas gotas lipídicas, que son características de estas células, las que proveen sustratos energéticos -como los ácidos grasos- para la producción de ATP (Xiong y col., 2009).

5) *Provisión de nutrientes y factores regulatorios*

El microentorno que propicia el desarrollo de la espermatogénesis es generado por la célula de Sertoli y a su vez es mantenido por la presencia de la barrera hemato-testicular. La célula de Sertoli secreta una gran variedad y cantidad de sustancias -iones, aminoácidos, proteínas, vitaminas- tanto al compartimiento basal como al adluminal.

Entre las proteínas producidas por las células de Sertoli se han identificado algunas idénticas y otras similares a las proteínas presentes en el plasma, así como también muchas proteínas específicas del testículo (Wright y col., 1981). Cada una de estas proteínas cumple funciones muy diversas tales como proteínas de transporte, proteasas, inhibidores de proteasas, glucoproteínas de la matriz extracelular, hormonas, factores de crecimiento, etc. (Griswold, 1988).

Con respecto a las proteínas de transporte, la proteína fijadora de andrógenos (ABP) fue una de las primeras proteínas en ser identificadas como producto de secreción de la célula de Sertoli (Sanborn y col., 1975). Se postula que la función de la ABP en el testículo estaría relacionada a su capacidad de regular los niveles de andrógeno libre. Por otra parte, la alta capacidad de la ABP para transportar andrógenos en la luz tubular y su pasaje a la luz epididimaria sugiere que esta proteína es esencial para el aporte de andrógenos al tejido epididimario.

Otra de las proteínas de transporte producidas por la célula de Sertoli, importante desde el punto de vista fisiológico, es la transferrina. Esta proteína, con capacidad de unir hierro es secretada hacia el compartimiento adluminal (Skinner y Griswold, 1980). Las células germinales presentes en dicho compartimiento incorporan la transferrina y utilizan el hierro para la síntesis de diversas hemoproteínas (Sylvester y Griswold, 1994).

Por otro lado, la célula de Sertoli secreta proteínas con actividad de proteasas y de inhibidores de proteasas. La secreción de este tipo de proteínas ha sido relacionada con los procesos de reestructuración o remodelación del túbulo seminífero que ocurren durante el proceso de transposición y de espermiación (Mruk y Cheng, 2004).

Si bien la mayoría de las proteínas secretadas por la célula de Sertoli tienen efectos dentro de la gónada existen otras, tales como la hormona anti mülleriana (AMH) y las inhibinas, que son secretadas a la circulación sistémica y actúan como mediadores endócrinos en otros tejidos.

Además de proteínas, la célula de Sertoli secreta al medio extracelular sustancias nutritivas que van a ser utilizadas por las células germinales que se encuentran más allá de la barrera hemato-testicular. Entre ellas el lactato ha sido una de las más estudiadas, y se tratará con mayor detalle en los siguientes párrafos.

5.1) Producción de lactato y mecanismos bioquímicos involucrados.

La primera evidencia de que el lactato es un factor indispensable para la supervivencia de las células germinales proviene de estudios en donde se observó que espermatoцитos paquiténicos y espermátides redondas en cultivo incubados con lactato presentaban una mayor incorporación de uridina o de leucina marcadas con tritio que aquellos incubados en presencia de glucosa (Jutte y col., 1981). Además, los autores observaron que la ausencia de lactato producía una disminución en la síntesis de ARN y de proteínas y que las células germinales perdían su vitalidad. Por otro lado, Robinson y Fritz (1981)

evaluaron los productos provenientes de la metabolización de glucosa, marcada con ^{14}C , por cultivos de células de Sertoli aisladas a partir de testículos de ratas de 20 días de edad. La mayor proporción de la marca estaba presente en los aniones, cuyo máximo exponente era el lactato, mientras que sólo una pequeña cantidad aparecía en el CO_2 y menos aún en el glucógeno y los lípidos. Asimismo, Grootegoed y colaboradores (1986) estudiaron la utilización de piruvato marcado por la célula de Sertoli y observaron que sólo un bajo porcentaje del metabolito era oxidado completamente a CO_2 mientras que la mayor parte era convertida a lactato. Teniendo en cuenta estos estudios, se concluyó que la glucosa es rápidamente metabolizada por la célula de Sertoli a lactato y que solamente un pequeño porcentaje del producto de la glucólisis es oxidado a través del ciclo de Krebs.

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 regulación de enzimas claves para el flujo glucolítico como la fosfofrutoquinasa-1 (PFK-1) y la piruvato quinasa (PK), c) la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH), que cataliza la conversión de piruvato a lactato, d) la regulación del complejo piruvato deshidrogenasa (PDC) y e) la exportación del lactato a través de transportadores de monocarboxilatos (MCTs). En numerosos estudios se ha observado que aquellas hormonas que incrementan la producción de lactato regulan uno o varios de los mecanismos mencionados para contribuir al aumento de la producción del hidroxiaácido (Riera y col., 2001; Riera y col., 2002; Riera y col., 2003; Galardo y col., 2008; Regueira y col., 2015)

REGULACIÓN HORMONAL DE LA CÉLULA DE SERTOLI

Las gonadotrofinas hipofisarias LH y FSH son los principales agentes regulatorios de la célula de Sertoli. Dicha regulación se ejerce en forma directa (FSH) o en forma indirecta (LH) a través de los andrógenos secretados por la célula de Leydig. Además, una gran variedad de péptidos producidos en la gónada es capaz de regular el funcionamiento de la célula de Sertoli.

Regulación por FSH y andrógenos

La FSH es la hormona principal en la regulación de las funciones de la célula de Sertoli. Las acciones biológicas de la FSH comienzan luego de la interacción con su receptor específico en la membrana plasmática. Cabe mencionar que en el testículo, dichos receptores están presentes solamente en la célula de Sertoli (Simoni y col., 1997).

Durante el período fetal, neonatal y prepuberal, la FSH estimula la proliferación de las células de Sertoli. Este proceso de proliferación en el cual participa la FSH 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 (Orth, 1982; 1984).

La FSH también desempeña un papel muy importante en la regulación del proceso de diferenciación terminal de la célula de Sertoli que ocurre cuando la misma ha cesado en su proliferación. Dicho proceso de diferenciación coincide temporalmente con el inicio de la primera división meiótica e involucra la adquisición por parte de la célula de Sertoli de las capacidades necesarias para mantener el desarrollo de la espermatogénesis. En cultivos de células de Sertoli se ha observado que FSH regula la producción de lactato y diversos mecanismos involucrados en dicha producción (Riera y col., 2001). Asimismo la

hormona es capaz de regular la producción de diversas proteínas tales como: proteína ligadora de andrógenos (ABP) (Fritz y col., 1976; Louis y Fritz, 1979), transferrina (Skinner y Griswold, 1982), activador del plasminógeno (Lacroix y Fritz, 1982), inhibina (Toebosch y col., 1989), hormona anti Mülleriana (AMH) (Kuroda y col., 1990), factores de crecimiento (Naville y col., 1990; Mullaney y Skinner, 1992; Gnessi y col., 1997; Tadokoro y col., 2002), y factores de transcripción tales como Dmrt, C/EBP y GATA-1 (Grønning y col., 1999; Chen y Heckert, 2001; Zhang y col., 2002).

Por otro lado, los andrógenos juegan un papel central en el desarrollo y mantenimiento de los caracteres sexuales secundarios y asimismo en la espermatogénesis. Las primeras evidencias de su rol en la espermatogénesis provienen de estudios realizados en animales adultos hipofisectomizados donde se observó que la administración de testosterona era capaz de mantener la espermatogénesis cuando se administraba inmediatamente luego de la hipofisectomía. Estudios de inmunohistoquímica y de hibridación in situ realizados sobre cortes de testículo adulto demostraron que el receptor de andrógenos se expresa en las células de Sertoli, en las células de Leydig y en las células peritubulares, por lo que la acción androgénica sobre la espermatogénesis es indirecta a través de la célula de Sertoli. En esta última célula la expresión del receptor de andrógenos aumenta con el desarrollo sexual (Rey y col., 2009). En la rata, la expresión del receptor de andrógenos se detecta a partir de los 20 días de edad y aumenta hasta alcanzar un máximo en la vida adulta.

Regulación paracrina/autocrina

Una gran variedad de péptidos que se producen localmente en el testículo regulan la funcionalidad de la célula de Sertoli. Entre ellos cabe mencionar a: 1) factores de crecimiento tales como EGF, PDGF, TGF α y β , NGF, bFGF e IGFs, 2) citoquinas tales como IL-1, IL-6 y TNF α , 3) neuropéptidos tales como GHRH, péptido activador de la

adenilatociclasa pituitaria (PACAP), sustancia P y β endorfina y 4) péptidos vasoactivos tales como como endotelina-1 y factor natriurético atrial. Una extensa revisión de los sitios de producción y de las acciones de estos péptidos en la gónada ha sido realizada por Gnessi y colaboradores (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 como nucleótidos/nucleósidos (Meroni y col., 1998; Galardo y col., 2010), prostaglandinas (Matzkin y col., 2012), vitamina D (Zanatta y col., 2011), ácido retinoico (Livera y col., 2002), endocannabinoides (Grimaldi y col., 2013), etc. Estos mediadores intratesticulares producen el ajuste fino de la funcionalidad de la célula de Sertoli.

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). Surge entonces el interrogante acerca de cuál es la fuente de energía utilizada por 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 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”.

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. En este contexto, la síntesis de triacilglicéridos (TAGs) y su almacenamiento en gotas de lípidos sería un mecanismo

fundamental para la homeostasis energética del túbulo seminífero, reservando energía fácilmente disponible para el funcionamiento adecuado de la célula de Sertoli.

METABOLISMO DE ÁCIDOS GRASOS

Los ácidos grasos son fundamentales para diversos procesos celulares y, como es conocido, constituyen la principal fuente energética para algunos tejidos. Dichos compuestos pueden ser almacenados como lípidos simples (TAGs) 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 (Katz y Messineo, 1981; Corpeleijn y col., 2008; 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. Dicho metabolismo incluye por un lado, la incorporación de los ácidos grasos a lípidos simples y complejos que serán almacenados en las gotas de lípidos y por otro lado, la degradación de los mismos con la consiguiente obtención de energía para la célula. En los siguientes párrafos se resumen muy brevemente las etapas esenciales para la síntesis de TAGs y la formación de gotas lipídicas.

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 transporte facilitado. Se han descrito varios tipos de proteínas de membrana que facilitan la entrada de los mismos entre los cuales se encuentra la proteína transmembrana CD36, proteína translocasa de ácidos grasos (FAT/CD36). Es una glicoproteína de 88 kDa, perteneciente a la familia de receptores *scavengers* de clase B (Silverstein y Febbraio, 2009; Glatz y col., 2010; Degrace-Passilly y Besnard, 2012; Kazantzis y Stahl, 2012). Se ha demostrado la presencia de FAT/CD36 en la célula de Sertoli y se ha postulado, además de su conocido rol como transportador, 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

Una vez dentro de la célula, los ácidos grasos deben ser activados para su posterior utilización, independientemente de la vía metabólica a la que serán destinados. La activación se lleva a cabo por una familia de Acil-CoA sintetasas que esterifican el ácido graso con la coenzima A (CoA) formando el acil-CoA correspondiente, reacción que es irreversible y consume dos moléculas de ATP. El acil-CoA resultante se une a las proteínas que unen acil-CoAs (ACBP) o a las proteínas de unión de ácidos grasos citoplasmáticas (FABPc), proteínas que además de unir ácidos grasos, también tienen capacidad de unir el ácido graso activado (Storch y Corsico, 2008). 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) Síntesis de TAGs

La síntesis de TAGs juega un papel fundamental en múltiples procesos biológicos celulares tales como absorción intestinal de grasas, almacenamiento energético, secreción de lípidos en la leche materna, atenuación de la lipotoxicidad generada por ácidos grasos libres y señales de transducción. La síntesis *de novo* de TAGs en la mayoría de los tejidos consiste en la acilación sucesiva del esqueleto de glicerol-3-fosfato en sus tres átomos de carbono. La primera acilación, en el carbono 1 es catalizada por la enzima glicerol-fosfato-acil-transferasa (GPAT) y resulta en la formación de ácido lisofosfatídico. Existen cuatro isoformas de GPAT que se expresan diferencialmente en distintos tejidos. La expresión de las mismas aumenta considerablemente en situaciones que requieren la síntesis de TAGs como en animales alimentados con dietas ricas en hidratos de carbono luego del ayuno o en la diferenciación de fibroblastos a adipocitos (Wendel y col., 2009). Son claves en la regulación del inicio de la síntesis de TAGs. En particular, GPAT1 y GPAT2 se localizan en la membrana mitocondrial y compiten con la enzima carnitina palmitoil-transferasa 1 (CPT1) por los acil-CoAs que serán destinados a la síntesis de lípidos o a la β -oxidación mitocondrial respectivamente. La segunda acilación es catalizada por la enzima acil-glicerol-fosfato-aciltransferasa (AGPAT), generándose ácido fosfatídico. Luego una fosfatasa específica del ácido fosfatídico (PAP/lipin) elimina el fosfato dando como producto al diacilglicerol (Coleman y Mashek, 2011). Finalmente, la enzima diacilglicerol-acil-transferasa (DGAT) es la encargada de catalizar la tercera acilación del diacilglicerol para dar como resultado los TAGs. Existen dos isoformas de DGAT (DGAT1 y DGAT2). A pesar de catalizar la misma reacción, las isoformas de DGAT se distinguen por sus propiedades catalíticas, regulación fisiológica y

fenotipos que resultan de los animales transgénicos nulos (KO). Ambas enzimas se encuentran localizadas en el retículo endoplasmático y su expresión es alta en tejidos que se especializan en la síntesis de TAGs (Shi y Cheng, 2009).

4) Formación de gotas lipídicas

Los TAGs son los encargados de almacenar eficientemente los ácidos grasos en el interior celular cuando la oferta de los mismos supera su demanda. Su almacenamiento se produce en organelas denominadas gotas lipídicas. Si bien tradicionalmente las gotas lipídicas fueron consideradas simplemente como un compartimento intracelular destinado al almacenamiento lipídico, en la actualidad se postula que juegan un rol fundamental en la homeostasis lipídica celular. Son organelas sorprendentemente complejas. Están formadas por un centro de lípidos neutros, principalmente TAGs, rodeado de una monocapa de fosfolípidos y proteínas asociadas específicas que varían de acuerdo a las distintas condiciones metabólicas y los distintos tipos celulares (Ducharme y Bickel, 2008).

La formación de gotas lipídicas es un proceso sincronizado, gradual y progresivo que se origina en el retículo endoplasmático y que se desencadena por la presencia de ácidos grasos. Se inicia con la llegada de los ácidos grasos, su activación y la síntesis de TAGs en el retículo endoplasmático (Takeuchi y Reue, 2009). Se genera un núcleo de TAGs que se expande progresivamente. Cuando este núcleo de TAGs crece se acomoda entre las dos hojas de la bicapa de lípidos de la membrana del retículo, formando un glóbulo. La curvatura de la membrana resultante es estabilizada por lípidos específicos y recluta proteínas del retículo endoplasmático que estabilizan el glóbulo y marcan el inicio de la biogénesis de la gota lipídica. La transición del glóbulo a gota lipídica ocurre rápidamente con la síntesis de nuevos lípidos neutros catalizada por las distintas enzimas que se localizan en las cercanías y forman complejos proteicos en el sitio de ensamblaje. También se generan fosfolípidos que favorecen el remodelado de la membrana y reclutan

proteínas específicas. Las gotas lipídicas nacientes se expanden reclutando nuevos glóbulos de TAGs que se generan en el resto de la superficie del retículo endoplasmático. Nuevos fosfolípidos se generan en las zonas vecinas para soportar la expansión de la gota lipídica a la cual se anclan distintas proteínas estructurales que favorecen su estabilidad, impidiendo el acceso de las lipasas a los sitios de nucleación. Así la gota de lípido naciente se expande progresivamente y se mueve hacia regiones centrales de la célula para formar la gota de lípido madura (Wilfling y col., 2014).

El descubrimiento de la familia de las proteínas perilipinas (PLINs) ha sido un gran progreso en el estudio del rol de las gotas lipídicas en la homeostasis lipídica celular (Bickel y col., 2009). Existen 5 perilipinas (PLIN1-5) que se clasifican en dos grupos de acuerdo a su estabilidad en ausencia de gotas lipídicas: a) las PLIN 1 y 2 que están siempre unidas a las gotas lipídicas y se degradan en ausencia de las mismas y b) las PLIN 3, 4 y 5 que pueden estar unidas a las gotas lipídicas o libres en el citoplasma. Presentan una distribución tejido específica. Se conoce que PLIN1 y PLIN4 son expresadas principalmente en adipocitos, mientras que PLIN2 y PLIN3 son ubicuas siendo PLIN2 la forma predominante en hígado. Por otro lado, PLIN5 se expresa principalmente en corazón, músculo esquelético e hígado en ayuno. Al momento del inicio de este trabajo, solo se ha demostrado la presencia de PLIN2 en la célula de Sertoli (Okumura, 2011).

Se ha demostrado que la célula de Sertoli presenta numerosas gotas lipídicas y que luego de la fagocitosis de células germinales apoptóticas y de cuerpos residuales se incrementa el número y tamaño de las mismas (Wang y col., 2006). Teniendo en cuenta estas observaciones y considerando que las células de Sertoli utilizan a los ácidos grasos como principal fuente energética, el almacenamiento de TAGs en gotas lipídicas resulta esencial para asegurar la disponibilidad de ácidos grasos necesaria para mantener el metabolismo energético de la célula de Sertoli.

En este contexto, el estudio de la expresión y regulación de FAT/CD36 - transportador de ácidos grasos-, de las GPATs y DGATs -enzimas que participan en la formación de TAGs-, y de las PLINs -proteínas que regulan la formación, estabilidad y acceso de lipasas a las gotas lipídicas-, resulta muy interesante para un conocimiento más completo de la fisiología de la célula de Sertoli.

REGULACIÓN DEL METABOLISMO LIPÍDICO POR RECEPTORES ACTIVADOS POR PROLIFERADORES DE PEROXISOMAS (PPAR)

La regulación del metabolismo lipídico es fundamental para asegurar un correcto balance energético. Entre los factores de transcripción que regulan la expresión de genes relacionados con el metabolismo lipídico se encuentran los receptores activados por proliferadores de peroxisomas (*peroxisome proliferator activated receptors*, PPARs). Dichos receptores son ligando dependiente y pertenecen a la superfamilia de receptores nucleares que heterodimerizan con el receptor de retinoides RXR. 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 α , PPAR β/δ y PPAR γ 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 B₄, la oleiletanolamina y la glicerofosfatidilcolina son ligandos

específicos del PPAR α (Devchand y col., 1996; Fu y col., 2003; Chakravarthy y col., 2009), derivados del ácido araquidónico como el 15-hidroxieicosatetraenoico y productos de lipoperoxidación como el 4-hidroxinonenal, el 4-hidroxiperoxinonenal y el 4-hidroxiperoxinonenal hidroxidodeca-(2E, 6Z)-dienal, como así también la prostaciclina (PGI₂) derivada de la reacción catalizada por la ciclo-oxigenasa 2, son ligandos específicos del PPAR β/δ (Coleman y col., 2007; Naruhn y col., 2010; Riahi y col., 2010), mientras que la prostaglandina J₂ (PGJ₂) es un potente activador del PPAR γ (Fajas y col., 2001).

En ausencia de ligando el heterodímero PPAR:RXR se encuentra unido al ADN en los elementos de respuesta a PPARs (PPRE) 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 α del PPAR γ (PGC1 α), entre otros. Estos co-activadores permiten el reclutamiento de la maquinaria de transcripción y de esta manera regulan la expresión génica (Wang y col., 2003; Lim y col., 2004; Guan y col., 2005).

Las tres isoformas de PPARs presentan una distribución tejido específica, lo que hace predecir funciones definidas para cada una de ellas. El PPAR α , expresado mayoritariamente en hígado, músculos esquelético y cardíaco, es capaz de regular genes relacionados con la oxidación de ácidos grasos tales como CPT1 y las acil-CoA deshidrogenasas de cadena larga y media (LCAD y MCAD, respectivamente) (Gulick y

col., 1994; Mandard y col., 2004). Por lo tanto, se lo considera uno de los factores de transcripción relacionados con procesos catabólicos. El PPAR β/δ 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 β/δ mostraron la capacidad del receptor para regular la utilización de ácidos grasos como fuente de energía (Muio y col., 2002) aumentando la expresión de genes relacionados con el transporte y metabolismo de ácidos grasos tales como FAT/CD36, FABP (proteína de unión a los ácidos grasos), acil-CoA sintetasa, CPT1, MCAD (Neels y Grimaldi, 2014). Estudios más recientes, ubican al PPAR β/δ en el eje de la regulación metabólica, ya que regula distintos caminos dependiendo del tejido y del estado metabólico del organismo (Lee y col., 2006; Burkart y col., 2007).

Por último, el PPAR γ se expresa predominantemente en tejido adiposo y en sistema inmune. Existen dos variantes, el PPAR γ 1 y el PPAR γ 2 las cuales se originan a partir de dos sitios distintos de iniciación de la transcripción del mismo gen (Fajas y col., 1997). Originalmente se lo describió como el factor de transcripción que dirige la diferenciación de adipocitos (Tontonoz y col., 1995; Lowell, 1999). Más adelante se demostró que regula vías que participan en el control de la entrada, transporte, almacenamiento y disponibilidad de lípidos (Walczak y Tontonoz, 2002) y es en general el PPAR que ha sido relacionado con los procesos anabólicos (Lehrke y Lazar, 2005). En la actualidad, además de su acreditado rol en la diferenciación del adipocito y en el metabolismo lipídico, el PPAR γ también es reconocido por su rol crucial para controlar la compleja red de genes involucrados en la homeostasis de la glucosa y la sensibilización a la insulina (Nielsen y col., 2008; Ahmadian y col., 2013). En este contexto cabe mencionar que agonistas PPAR γ como las glitazonas han sido ampliamente utilizadas para el tratamiento de pacientes con diabetes mellitus tipo 2 (Spiegelman, 1998; Picard y Auwerx, 2002).

Particularmente poco se conoce acerca de la regulación por activación de PPARs en células de Sertoli. Recientemente se ha demostrado que la activación de PPAR α y PPAR β/δ aumenta la oxidación de ácidos grasos y la expresión de genes vinculados con el transporte y metabolismo de los mismos como el FAT/CD36, CPT1, LCAD y MCAD. Además se ha observado que sólo la activación del PPAR β/δ aumenta la producción de lactato como consecuencia de un aumento en la disponibilidad de piruvato. En este contexto se demostró que la activación de PPAR β/δ aumenta los niveles de PDC fosforilado y la expresión de PDK1 y PDK4, enzimas encargadas de dicha modificación (Regueira y col., 2014). Con respecto al PPAR γ , se ha observado que su expresión aumenta con la edad del animal, siendo máxima a los 20 días de edad (Thomas y col., 2011). El mismo trabajo utilizando microarreglos muestra que la sobreexpresión de PPAR γ regula la expresión de miles de genes. Un grupo importante de los mismos fueron categorizados en procesos biológicos relacionados a vías metabólicas de lípidos e hidratos de carbono lo que sugiere un rol importante del PPAR γ en la regulación del metabolismo energético de la célula de Sertoli. Sin embargo, la posible participación de la activación de PPAR γ en la regulación de la expresión de genes que participan específicamente en el transporte de ácidos grasos, en la síntesis de TAGs y en la formación de gotas lipídicas así como también en la producción de lactato, metabolito esencial para las células germinales, no ha sido aún estudiada en la célula de Sertoli.

De lo expuesto en la introducción, se desprende que el estudio de nuevos mecanismos moleculares que participan en la síntesis de TAGs y formación de gotas lipídicas así como aquellos que controlan la producción de lactato, contribuirá al entendimiento de la regulación del metabolismo energético de la célula de Sertoli, fundamental para un normal desarrollo de la espermatogénesis.

Por ello, nos hemos planteado la siguiente hipótesis y respectivos objetivos:

Hipótesis

La activación del PPAR γ participa en el mantenimiento de un adecuado equilibrio energético en la célula de Sertoli regulando mecanismos moleculares involucrados en el metabolismo lipídico como la síntesis de TAGs y formación de gotas lipídicas y en el metabolismo de hidratos de carbono como la producción de lactato.

Objetivo General

Estudiar la participación del PPAR γ en los mecanismos que operan en el túbulo seminífero para un adecuado metabolismo energético. Este objetivo se encuadra dentro de un objetivo mayor del Laboratorio de Biología Celular Gonadal del Centro de Investigaciones Endocrinológicas, Dr César Bergadá, que es elucidar los mecanismos moleculares involucrados en el funcionamiento de las células del túbulo seminífero que conducen a una espermatogénesis normal.

Objetivos Específicos

- ✓ Estudiar la regulación por activación de PPAR γ de los mecanismos moleculares que participan en la síntesis de TAGs y formación de gotas lipídicas en la célula de Sertoli.
- ✓ Estudiar la regulación por activación de PPAR γ de los mecanismos moleculares involucrados en la producción de lactato por las células de Sertoli.

Materiales y Métodos

-MATERIALES

La Rosiglitazona, activador farmacológico de PPAR γ , fue provista por Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE.UU.). El compuesto radioactivo 2-[1,2-³H]-desoxi-D-glucosa (2-DOG marcada con tritio) fue obtenido en New England Nuclear Co. (Boston, MA, EE.UU.). El anticuerpo anti-Fosfo-Piruvato Deshidrogenasa-E1 α (Ser293) (p-PDC) fue adquirido en Novus Biologicals (Littleton, CO, EE.UU.), el anti- β -tubulina en Sigma-Aldrich (T8328, St. Louis, MO, EE.UU.), y los anticuerpos secundarios anti-Inmunoglobulina de conejo y de ratón conjugados con peroxidasa en Cell Signaling Technology (Boston, MA, EE.UU.). Los cebadores para la determinación de ARNm por RT-PCR cuantitativa fueron adquiridos en Eurofines MWG Operon (Huntsville, AL, EE.UU.). Los medios de cultivo utilizados y todos los demás reactivos y drogas fueron adquiridos en Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE.UU.). Las ratas de 20 días de edad fueron provistas por el bioterio del Instituto de Biología y Medicina Experimental (IByME) (Buenos Aires, Argentina) y fueron sacrificadas por asfixia con CO₂ siguiendo los procedimientos del National Institute of Health (NIH) Guide for Care and Use of Laboratory Animals.

Los plásmidos utilizados fueron, pGL3-Basic/pRL-TK (Promega Corporation, Madison, EE.UU.) y pGL3PPREx3TK-LUC gentilmente cedido por el Dr. Evans (La Jolla, CA, EE.UU.) (Forman y col., 1995).

-MÉTODOS

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 CO₂. 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 desoxirribonucleasa 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 y 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 pocillos, en frascos de 25 cm² o en

portaobjetos multicámara de 8 pocillos a una densidad de 5 $\mu\text{g ADN/cm}^2$. Las células fueron cultivadas en estufa humidificada a 34 °C en atmósfera de CO₂ 5%:aire 95%. Las células se dejaron adherir por 48 horas en las condiciones descritas y luego se reemplazó el medio por medio completo.

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 pocillos según la técnica desarrollada por Chomczynski y Sacchi (1987) 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 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 (desoxirribonucleótidos trifosfato) y la enzima transcriptasa reversa MMLV (Moloney Murine Leukemia Virus) (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 .

Determinación de los niveles de ARNm por RT-PCR cuantitativa (RT-qPCR): La cuantificación por RT-qPCR fue realizada utilizando el equipo *StepOne Real Time PCR System* (Applied Biosystems, Warrington, Reino Unido). La mezcla de reacción fue preparada usando 10 μl de SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), cebadores sentido y antisentido específicos en concentraciones 400 ó 900 nM según el gen analizado, 3 μl de la dilución de ADNc de cada muestra en un volumen final de reacción de 20 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 hibridación 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 disociación. Los datos fueron normalizados con hipoxantina fosforibosil transferasa 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 variación 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 diseñados para cada gen analizado.

Caracterización de la expresión de las isoformas de GPATs y PLINs por RT-PCR:

Para la evaluación de la expresión de las distintas isoformas de GPATs y PLINs, las monocapas de células de Sertoli obtenidas luego de 96 horas de cultivo fueron tratadas por 2 minutos con buffer Tris 20 mM, pH 7,4 (tratamiento hipotónico) y posteriormente lavadas con medio de cultivo (Schteingart y col., 1989). A continuación, se realizó una evaluación microscópica de las mismas donde se puede observar que el tratamiento hipotónico permite la obtención de una monocapa de células de Sertoli libres de células germinales (Figura 1). Adicionalmente se evaluó la presencia de LDH C (isoforma de LDH

solo presente en células germinales) por RT-PCR en los extractos celulares. La Figura 2 muestra que no se detecta LDH C en las preparaciones de células de Sertoli luego del tratamiento hipotónico. Estas preparaciones de monocapas de células de Sertoli libres de células germinales fueron utilizadas para realizar los estudios correspondientes.

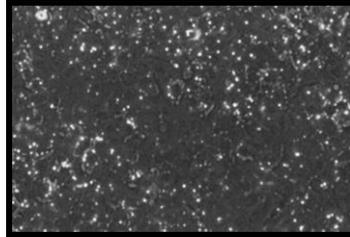


Figura 1. **Microfotografía en contraste de fase de la monocapa de células de Sertoli después del tratamiento hipotónico.** Microfotografía de la monocapa de células de Sertoli tomada al día 5 de cultivo (X100).

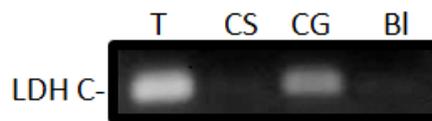


Figura 2. **Expresión de LDH C.** Se realizó un análisis por RT-PCR de la expresión de LDH C. Se utilizó ADNc proveniente de testículo (T), de células de Sertoli luego de tratamiento hipotónico (CS) y de células germinales (CG) aisladas de ratas de 31 días de edad. Blanco de reacción (BI).

El ARN total fue extraído de la monocapa de células de Sertoli como se describió anteriormente y a partir del ADNc obtenido, se realizó una PCR utilizando los cebadores específicos para cada gen que se indican en la Tabla 1.

La mezcla de reacción para la PCR incluía 2 μ l de ADNc, 0,5 μ l de dNTPs 10 mM, 1 μ l de cebadores sentido 10 μ M, 1 μ l de cebadores antisentido 10 μ M, 5 μ l de 5x Colorless GoTaq Reaction Buffer, 15,25 μ l de H₂O libre de nucleasas, y 0,25 μ l de la enzima GoTaq ADN Polimerasa (5 U/ μ l) (Promega, Madison, WI, EE.UU.).

El programa de amplificación utilizado fue: desnaturalización inicial a 95°C por 2 minutos, 30 ciclos de desnaturalización a 95°C por 45 segundos, hibridización a 60°C por 45 segundos y extensión a 72°C por 1 minuto/kb, seguido por un ciclo de extensión final a 72°C durante 5 minutos.

Los productos de PCR y un marcador de pares de bases (50bp ladder plus, Dongsheng Biotech, Guangdong, China) fueron separados electroforéticamente en un gel de agarosa 1,5% P/V conteniendo bromuro de etidio (0,15 µg/ml, Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.). El producto de PCR se visualizó como una única banda del tamaño esperado. Se realizaron controles negativos y positivos de amplificación.

	Cebadores
FAT/CD36	Sentido: 5'-ACCAGGCCACATAGAAAGCA-3'
	Antisentido: 5'-CACCAATAACGGCTCCAGTAA-3'
GPAT1	Sentido: 5'-TGCCCAATTCATCAGAATAC-3'
	Antisentido: 5'-TGGGATACTGGGGTTGAAAA-3'
GPAT2	Sentido: 5'-GAAGTCCAACCCTCAAATGC-3'
	Antisentido: 5'-TCTTCATCCCAAAGCCTGAG-3'
GPAT3	Sentido: 5'-TGGTGAAAACCTTGGAGTGG-3'
	Antisentido: 5'-GCTGGGCTTTTGAGAACTGAC-3'
GPAT4	Sentido: 5'-CGTGGGCTACCTTGAGAATG-3'
	Antisentido: 5'-ATGATTCCGTTGGTGTAGGG-3'
DGAT1	Sentido: 5'-TTCATCTTTGCTCCTACTTTGTG-3'
	Antisentido: 5'-GTGAAAAGAGCATCTCAAG-3'
PLIN1	Sentido: 5'-GATCTGGGATTCTGCTTTGC-3'
	Antisentido: 5'-CTGGAGCACATTCTCCTGTTC-3'
PLIN2	Sentido: 5'-TCTGAACCAGCCAACATCTG-3'
	Antisentido: 5'-CACCACCCCTGAGACTGTG-3'
PLIN3	Sentido: 5'-TAGCCTGATGGAATCTGTGAAAC-3'
	Antisentido: 5'-GCTTAGATGGGTCCTTTTC-3'
PLIN4	Sentido: 5'-TCAAAAGGCAAGACCCTGAG-3'
	Antisentido: 5'-TACATCCTTTGTGGAGCACTTAG-3'
PLIN5	Sentido: 5'-ATTCCTGCCCATGACTGA-3'
	Antisentido: 5'-ACGCACAAAGTAGCCCTG-3'

GLUT1	Sentido: 5'-GGAGTGTCCGGTTTAGGTTGC-3'
	Antisentido: 5'-GCTGTGAAACGGAGAATGGA-3'
GLUT2	Sentido: 5'-TGCTGGAAGAAGCGTATCAG-3'
	Antisentido: 5'-TGAGTGTGGTTGGAGCAATC-3'
PFKFB3	Sentido: 5'-CACCCCTTCCTGTCCTTTGTTC-3'
	Antisentido: 5'-GCATCTTCGTTGCTGTATTCG-3'
PKM2	Sentido: 5'-AGGCTGCCATCTACCACTTG-3'
	Antisentido: 5'-CACTGCAGCACTTGAAGGAG-3'
LDHA	Sentido: 5'-TCATCGTCTCAAACCCAGTG-3'
	Antisentido: 5'-ATGAACTCCCAGCCTTTCTC-3'
HPRT1	Sentido: 5'-AGTTCTTTGCTGACCTGCTG-3'
	Antisentido: 5'-TTTATGTCCCCCGTTGACTG-3'

Tabla 1. Secuencias de cebadores sentido y antisentido específicos para cada gen estudiado en este trabajo.

Determinación por Western Blot de los niveles de p-PDC: Las monocapas celulares cultivadas en placas de 6 pocillos 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 1 mM, 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, 2β-mercaptoetanol 8% V/V, azul de bromofenol 0,008% P/V), incubados por 5 minutos a 100°C y luego colocados inmediatamente en hielo. A continuación, se sembraron 45 µl de las muestras 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 Trans-Blot (Bio-Rad, Hercules, CA, EE.UU.).

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 anti-p-PDC Novus Biologicals (Littleton, CO, EE.UU) en una dilución 1/4000 en TBS-T con BSA 5% P/V; o con anti- β -tubulina de Sigma-Aldrich (T8328, St. Louis, MO, EE.UU.) en una dilución 1/1000 en TBS-T con leche en polvo descremada 5% P/V.

Finalizada la incubación con el primer anticuerpo, las membranas fueron lavadas 3 veces por 5 minutos cada vez con TBS-T y posteriormente incubadas por 1 hora a temperatura ambiente con un anticuerpo secundario anti-Inmunoglobulina de conejo conjugado con peroxidasa (Cell Signaling Technology, Boston, MA, EE.UU.) en una dilución 1/4000 en TBS-T con leche descremada 5% P/V, para detectar p-PDC, o con un anticuerpo secundario anti-Inmunoglobulina de ratón conjugado con peroxidada (Cell Signaling Technology, Boston, MA, EE.UU.) en una dilución 1/2000 en TBS-T con leche descremada 5% P/V, para detectar β -tubulina. 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 del kit comercial 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 β -tubulina fueron utilizados como control de carga proteica en las distintas calles. Los resultados fueron expresados como veces de variación respecto del basal de la relación p-PDC/ β -tubulina.

Determinación del contenido de TAGs: Las células de Sertoli provenientes de cultivos realizados en frascos de 25 cm² fueron obtenidas por tratamiento de las monocapas celulares con una solución de Tripsina 0,05% P/V – EDTA 0,02% P/V en PBS durante 2 minutos. Al finalizar la incubación se agregó un volumen adecuado de Inhibidor de tripsina de soja en PBS para obtener una concentración final de 0,04%. Las células recuperadas por centrifugación a 800xg durante 5 minutos se resuspendieron en PBS a un volumen final de 100 μ l y se homogeneizaron por disrupción con ultrasonido (Ultrasonic Cell Disruptor & Homogenizer SONIFIER™ 150). El contenido de TAGs en los homogeneizados celulares fue determinado utilizando un kit comercial TG Color de Wiener Lab (Rosario, Argentina). Brevemente, 10 μ l de homogeneizado fueron mezclados con 1 ml de solución conteniendo buffer Good (pH 6,8), clorofenol, lipoprotein lipasa, glicerol kinasa, glicerol fosfato oxidasa, peroxidasa, adenosina trifosfato y 4-aminofenazona. La reacción se dejó desarrollar por 5 minutos a 37°C en un baño con agitación y luego se determinó la absorbancia a 505 nm. Los resultados se expresaron como μ g TAGs/ μ g ADN.

Determinación de gotas lipídicas: Se utilizó la técnica descrita por Wang y colaboradores (2006) levemente modificada. Las monocapas celulares sembradas en

portaobjetos multicámara de 8 pocillos (Lab-Tek, Naperville, IL, USA) fueron fijadas en formaldehído 10% por 40 minutos. Luego de un lavado con PBS se tiñeron con una solución de Oil Red O (ORO, Sigma) (solución saturada de ORO en isopropanol:agua 3:2) por 30 minutos. Luego se lavaron con alcohol 70% por 5 segundos para eliminar la tinción inespecífica. Finalmente, las monocapas fueron lavadas con agua, teñidas con hematoxilina por 5 minutos y montadas en glicerol:PBS (9:1) para su posterior observación microscópica.

Determinación del consumo de glucosa: El consumo de glucosa fue evaluado en el medio de cultivo proveniente de monocapas de células de Sertoli cultivadas en placas de 24 pocillos en medio libre de rojo fenol utilizando el kit comercial glicemia enzimática de Wiener Lab (Rosario, Argentina). Brevemente, 10 μ l de medio fueron mezclados con 1 ml de solución conteniendo glucosa oxidasa, peroxidasa, 4-aminofenazona, buffer fosfato pH 7,0 y 4-hidroxibenzoato. La reacción se dejó desarrollar por 5 minutos a 37°C en un baño con agitación y luego se determinó la absorbancia a 505 nm. Los resultados se expresaron como μ g glucosa consumida/ μ g ADN.

Ensayo de incorporación de 2-desoxi-D-glucosa (2-DOG): El ensayo de incorporación de 2-DOG a la célula fue realizado sobre monocapas de células de Sertoli cultivadas en placas de 24 pocillos como se describió en Riera y colaboradores (2001). Las células fueron lavadas dos veces a temperatura ambiente con PBS que contenía CaCl_2 1 mM y MgCl_2 1 mM (PBS Ca^{2+} y Mg^{2+}). Las monocapas se incubaron con [^3H]-2-desoxi-D-glucosa (2-DOG marcada con tritio) 1 $\mu\text{Ci/ml}$ (25,7 Ci/mmol) en PBS Ca^{2+} y Mg^{2+} por 30 minutos a 34°C. La incorporación inespecífica se determinó en incubaciones paralelas realizadas en presencia de un exceso ($\times 10000$) de 2-DOG no marcada. Finalizada la incubación, las células fueron lavadas dos veces con PBS Ca^{2+} y Mg^{2+} frío y recogidas en una solución de

desoxicolato de sodio 0,4% P/V en hidróxido de sodio 0,5 M. Se agregó líquido centellante (Optiphase Hisafe 3, Perkin Elmer Inc., Waltham, MA, EE.UU.) y se determinó la radioactividad incorporada en un contador de centelleo líquido (Rack Beta Liquid Scintillation Counter, Pharmacia, Wallac OY, Finlandia). Las incubaciones fueron realizadas por triplicado. Cultivos paralelos mantenidos en las mismas condiciones experimentales fueron utilizados para la determinación de ADN. Los resultados se expresaron como dpm/ μ g ADN.

Determinación de la actividad de lactato deshidrogenasa (LDH): La actividad de LDH fue evaluada en monocapas de células de Sertoli cultivadas en placas de 24 pocillos. Las monocapas previamente lavadas con PBS fueron lisadas por ultrasonido (Ultrasonic Cell Disruptor & Homogenizer SONIFIER™ 150). Se tomaron alícuotas para la determinación de ADN y el lisado celular remanente fue centrifugado a 15800xg por 10 minutos. El sobrenadante obtenido fue utilizado para determinar la actividad de LDH.

La actividad de LDH se determinó con un kit comercial (Randox Laboratories, Crumlin, Reino Unido) que utiliza un método espectrofotométrico con piruvato como sustrato de la enzima y NADH como coenzima. La concentración de NADH se evaluó por determinación de la absorbancia a 340 nm. Los resultados se expresan como mUI/ μ g ADN.

Determinación 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 pocillos utilizando un kit comercial (826-UV, Sigma-Aldrich) cuya técnica está basada en la conversión de lactato a piruvato por la enzima LDH usando β -nicotinamida adenina dinucleótido oxidado (β -NAD⁺) como coenzima. En primer lugar, el medio de cultivo fue desproteinizado por tratamiento con ácido perclórico 8% P/V por 5 minutos en hielo y

luego centrifugado a 1600xg por 10 minutos. El sobrenadante obtenido fue utilizado para la determinación de lactato. Brevemente, 55 μ l de sobrenadante fueron mezclados con 280 μ l de solución de reacción que contenía coenzima β -NAD⁺ 2,8 mM y enzima LDH 20 UI/ml disueltas en solución reguladora de glicina e hidracina (pH 9,2). La reacción se dejó desarrollar por 15 minutos a 37°C en un baño con agitación y la cantidad de β -nicotinamida adenina dinucleótido reducido (NADH) producido, que es igual a la cantidad de lactato presente en la muestra, se determinó como el aumento en la absorbancia a 340 nm. Los resultados se expresaron en μ g lactato/ μ g ADN.

Transfección y ensayo de gen reportero luciferasa: Células de Sertoli sembradas en placas de cultivo de 24 pocillos fueron cotransfectadas con los plásmidos pGL3PPREx3TK-LUC o pGL3-Basic/pRL-TK usando Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.) según las instrucciones del fabricante. Finalizado el tiempo de incubación las monocapas de células de Sertoli previamente lavadas con PBS fueron expuestas a una solución de lisis. Los extractos celulares obtenidos fueron incubados en presencia de los sustratos específicos de las enzimas luciferasa Firefly y luciferasa Renilla (Dual-Luciferase Reporter System, Promega Corporation), y la actividad luciferasa fue determinada en un luminómetro (Junior LB9509, Berthold Technologies, BadWildbad, Alemania). Los resultados se expresan como la relación de la actividad luciferasa Firefly/luciferasa Renilla en unidades arbitrarias.

Determinación de la viabilidad celular: La viabilidad celular fue evaluada por un método colorimétrico que utiliza como reactivo al compuesto de tetrazolio, MTS (3-[4,5-dimetiltiazol-2-yl]-5-[4-sulfofenil]-2H-tetrazolio). La actividad de las enzimas mitocondriales permite la reducción del MTS al compuesto soluble MTS-formazán. La cantidad de MTS-formazán formada es directamente proporcional al número de células vivas. Para las

determinaciones se utilizó un kit comercial (Cell Titer 96 Aqueous non-Radiative Cell Proliferation Assay, Promega, Madison, WI, EE.UU.). El reactivo de MTS fue agregado a las placas de cultivo de 96 pocillos por 2 horas a 34 °C en estufa gaseada. Luego se leyó la absorbancia a 492 nm para determinar la cantidad de MTS-formazán formado.

Determinación de ADN: Se utilizó la técnica fluorométrica descrita por Labarca y Paigen (1980). Este método se basa en el aumento de fluorescencia que se produce cuando el bisbenzimidazol (Hoesch 33258) se une a las moléculas de ADN. Los resultados obtenidos se compararon contra una curva estándar de ADN de timo de ternera.

Análisis estadístico: El estudio estadístico de los resultados se realizó utilizando análisis de varianza de una vía (ANOVA), seguido por test de Tukey-Kramer para la comparación de múltiples grupos. Probabilidades <0,05 fueron consideradas estadísticamente significativas. Se utilizó para el análisis el programa estadístico GraphPad InStat (GraphPad Software, La Jolla, CA, EE.UU.).

-DISEÑO EXPERIMENTAL

Se utilizó como modelo experimental cultivos de células de Sertoli aisladas de animales de 20 días. En la rata a esta edad ya se ha formado la barrera hemato-testicular, las células de Sertoli no tienen capacidad mitogénica, se encuentran en proceso de diferenciación terminal y se considera que son capaces de sostener la espermatogénesis.

Validación de RSG como herramienta para evaluar la activación de PPAR γ en células de Sertoli

Para analizar la participación de la activación de PPAR γ en la regulación de la funcionalidad de la célula de Sertoli se utilizó la rosiglitazona (RSG), activador

farmacológico del mencionado PPAR ampliamente utilizado para dilucidar el rol fisiológico del factor de transcripción en distintos tipos celulares. Antes de comenzar los estudios se evaluó el efecto de RSG sobre la viabilidad celular y la capacidad para aumentar la actividad transcripcional de los PPARs utilizando un plásmido que contiene sitios PPRE.

Para evaluar la viabilidad celular, las células de Sertoli fueron incubadas con RSG 1 μ M y 10 μ M durante 48 horas y finalizados los tratamientos se realizó el ensayo de viabilidad sobre la monocapa celular.

Para evaluar la actividad transcripcional de PPARs, las células de Sertoli fueron cotransfectadas con los plásmidos pGL3PPREx3TK-LUC/pRL-TK o pGL3-Basic/pRL-TK en proporción 9:1. Luego de 24 horas el medio de cultivo fue reemplazado y las células se mantuvieron en condiciones basales o incubadas con RSG 10 μ M por 24 horas. Finalizado el tiempo de incubación las monocapas de células de Sertoli previamente lavadas con PBS fueron expuestas a una solución de lisis. Los extractos celulares obtenidos fueron utilizados para la determinación de la actividad luciferasa Firefly y luciferasa Renilla.

1) Estudio de la regulación por activación de PPAR γ de los mecanismos moleculares que participan en la síntesis de TAGs y formación de gotas lipídicas en la célula de Sertoli

a) Caracterización de la expresión de isoformas de GPATs y PLINs en células de Sertoli.

Se aislaron y cultivaron células de Sertoli de ratas de 20 días de edad. Luego de 96 horas de cultivo se realizó el tratamiento hipotónico, se extrajo ARN total y se analizó la expresión por RT-PCR de las distintas isoformas de GPATs y PLINs utilizando cebadores específicos para cada isoforma. Se utilizaron como controles positivos de expresión ADNc

de hígado para GPAT1-4; de riñón para GPAT4 y de músculo esquelético y de testículo para PLIN1-5.

b) Regulación de la expresión de FAT/CD36, GPATs, DGAT1 y PLINs por RSG

Cultivos de células de Sertoli de ratas de 20 días de edad fueron mantenidos en condiciones basales o incubados por 24 ó 48 horas con RSG 1 y 10 μM . Una vez finalizadas las incubaciones se extrajo el ARN total, se sintetizó el ADNc y se determinaron los niveles de ARNm por RT-qPCR.

c) Regulación del contenido de TAGs y gotas lipídicas por RSG

Cultivos de células de Sertoli de ratas de 20 días de edad fueron mantenidos en condiciones basales o incubados por 48 horas con RSG 10 μM . Una vez finalizado el tratamiento se analizó en la monocapa celular el contenido de TAGs mediante una técnica colorimétrica y la presencia de gotas lipídicas mediante la tinción con Oil Red O.

2) Estudio de la regulación por activación de PPAR γ de los mecanismos moleculares involucrados en la producción de lactato por las células de Sertoli

a) Regulación del consumo de glucosa, de la producción de lactato, de la incorporación de glucosa y de la actividad de LDH.

Células de Sertoli fueron mantenidas en condiciones basales o incubadas por 48 horas con RSG 1 y 10 μM . Finalizado el período de incubación, se recogió el medio de cultivo para la determinación del consumo de glucosa y de la producción de lactato. Las monocapas celulares se destinaron para realizar el ensayo de incorporación de 2-DOG marcada con tritio, la medición de la actividad de LDH y la medición de ADN.

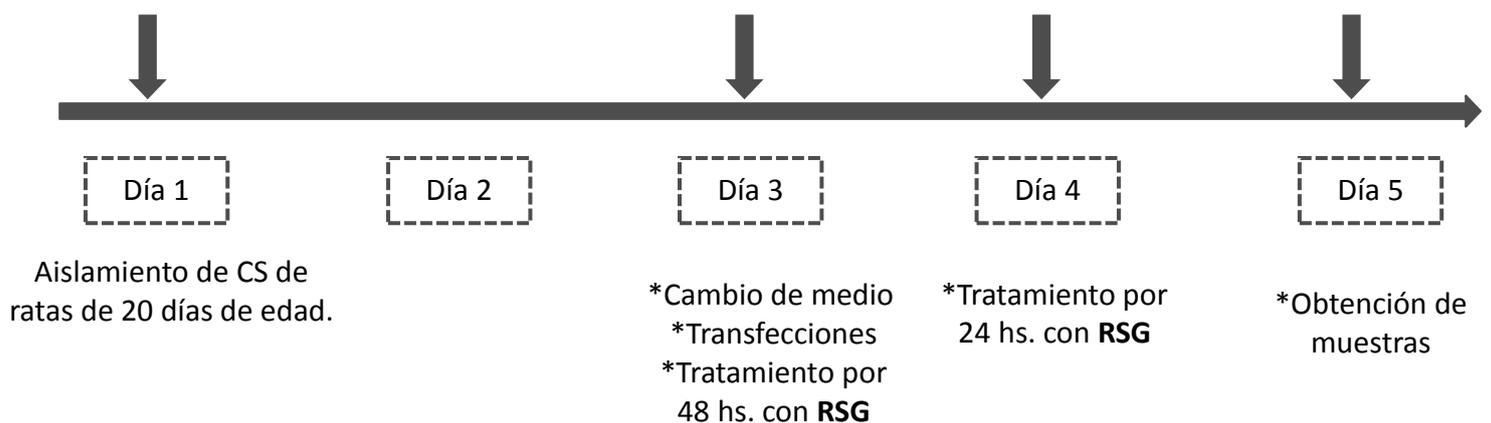
b) Regulación de la expresión de GLUT1, GLUT2, PFKFB3, PKM2 y LDH A por RSG

Cultivos de células de Sertoli de 20 días de edad fueron mantenidos en condiciones basales o incubados por 24 ó 48 horas con RSG 1 y 10 μ M. Una vez finalizados los tratamientos se extrajo el ARN total, se sintetizó el ADNc y se determinaron los niveles de ARNm por RT-qPCR.

c) Regulación del estado de fosforilación del PDC por RSG

Cultivos de células de Sertoli de 20 días de edad fueron mantenidos en condiciones basales o incubadas por 48 horas con RSG 1 y 10 μ M. Una vez finalizada la incubación, las células fueron expuestas a una solución reguladora de lisis y se determinaron los niveles de p-PDC y β -tubulina por Western Blot.

A continuación se muestra un esquema general del diseño experimental que fue utilizado para realizar este trabajo, indicando las actividades realizadas día por día.



Resultados

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. La glucosa está destinada a producir lactato para el mantenimiento de las células germinales, mientras que los ácidos grasos están principalmente destinados a la obtención de ATP para cubrir las demandas energéticas propias de la célula de Sertoli. En este contexto metabólico, el estudio de mecanismos involucrados en el almacenamiento de ácidos grasos, tales como la síntesis de TAGs y la formación de gotas lipídicas, y en la producción de lactato, resulta de sumo interés para comprender en profundidad cómo se regula el metabolismo energético en las células de Sertoli. Los factores de transcripción de la familia de los PPARs han sido íntimamente relacionados con el metabolismo de lípidos e hidratos de carbono en distintos tejidos. En nuestro laboratorio hemos demostrado la participación de PPAR α y PPAR β/δ en la regulación del metabolismo energético de la célula de Sertoli. Sin embargo, el rol del PPAR γ aún no ha sido evaluado.

En esta tesina se utilizó como modelo experimental cultivos de células de Sertoli aisladas de ratas de 20 días de edad. A esta edad, las células de Sertoli han dejado de dividirse, han formado la barrera hemato-testicular y han iniciado un proceso de diferenciación terminal. Por otro lado, en el túbulo seminífero las espermatogonias han entrado en meiosis y se observan los primeros espermatoцитos meióticos.

Para analizar la participación de PPAR γ en la regulación de la funcionalidad de la célula de Sertoli se utilizó rosiglitazona (RSG), activador farmacológico del mencionado PPAR ampliamente utilizado para dilucidar el rol fisiológico del factor de transcripción en distintos tipos celulares. Inicialmente, se evaluó la viabilidad de las células de Sertoli luego de 48 horas de incubación con 1 y 10 μ M de RSG. En ningún caso el tratamiento modificó la viabilidad celular (Tabla1).

	Absorbancia 492 nm.
Basal	0,409 ± 0,028
RSG 1 µM	0,400 ± 0,034
RSG 10 µM	0,366 ± 0,051

TABLA 1. **Efecto de RSG sobre la viabilidad celular.** Las células fueron mantenidas en condiciones basales o incubadas con RSG 1 µM y 10 µM durante 48 hs. Finalizada la incubación se realizó el ensayo de viabilidad celular. Los resultados representan la $X \pm DS$ de incubaciones realizadas por sextuplicado de un experimento representativo de tres.

Para validar la utilización de dicha droga en nuestro modelo experimental, se evaluó a continuación el efecto de RSG sobre la actividad transcripcional de PPARs. Para ello, cultivos de células de Sertoli, previamente cotransfectados con 1) un plásmido que contiene el ADNc de la luciferasa-firefly bajo el control de un promotor mínimo de Timidina Kinasa (TK) seguido de una zona enhancer que posee tres copias de la secuencia del elemento de respuesta a PPARs (PPRE) y el plásmido pRL-TK o 2) el plásmido vacío y el plásmido pRL-TK, fueron mantenidos en condiciones basales o incubados con RSG (10 µM) por 24 horas. Finalizada la incubación se determinó la actividad de la enzima luciferasa-firefly que fue normalizada por la actividad de la enzima luciferasa-renilla codificada por el plásmido pRL-TK. La Figura 1 muestra que la RSG aumenta la actividad luciferasa, indicando que la RSG es capaz de aumentar la actividad transcripcional de PPARs. Por lo tanto, la RSG resulta una herramienta válida para analizar los efectos de la activación de PPARy en la regulación de la funcionalidad de la célula de Sertoli.

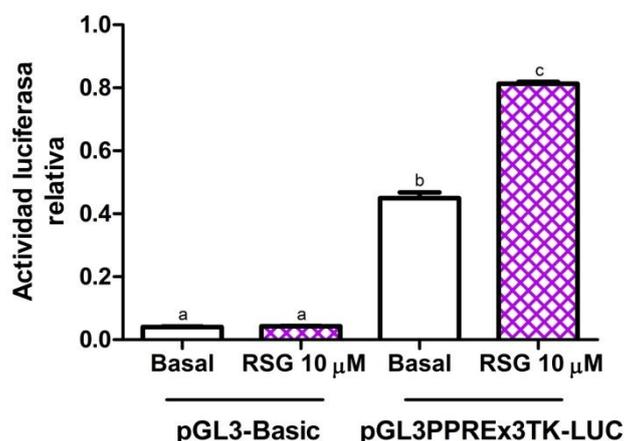


FIGURA 1. **Actividad luciferasa.** Las células cotransfectadas con los plásmidos pGL3PPREx3TK-LUC o pGL3-Basic/pRL-TK fueron mantenidas en condiciones basales o estimuladas por 24 hs. en ausencia o presencia de RSG 10 μ M. En todos los casos las células permanecieron en cultivo hasta el día 5 y las incubaciones se realizaron por triplicado. Los extractos celulares obtenidos fueron utilizados para determinar la actividad luciferasa. Los resultados se expresan como la relación de la actividad luciferasa Firefly/luciferasa Renilla en unidades arbitrarias ($X \pm DS$) de un experimento representativo de tres. Distintas letras indican diferencias significativas; $p < 0,05$.

Regulación por activación de PPAR γ de los mecanismos moleculares que participan en la síntesis de TAGs y en la formación de gotas lipídicas en la célula de Sertoli.

Evaluamos la participación de la activación del PPAR γ en los mecanismos involucrados en la síntesis de TAGs y en la formación de gotas lipídicas. Para ello, los cultivos de células de Sertoli fueron incubados por 24 y 48 horas con dosis variables de RSG (1 y 10 μ M) y se evaluó la expresión de los genes FAT/CD36, GPATs, DGAT1 y PLINs.

❖ *Regulación de la expresión del transportador de ácidos grasos FAT/CD36 por activación de PPAR γ*

Como se mencionó en la introducción, al inicio de este trabajo de tesis se conocía la expresión de FAT/CD36 en células de Sertoli. Nos propusimos evaluar si dicha expresión se regulaba por activación de PPAR γ . La Figura 2a muestra los resultados obtenidos luego de la incubación con RSG 10 μ M por 24 y 48 horas, mientras que la Figura 2b muestra los resultados obtenidos luego de la incubación por 48 horas con RSG 1 y 10 μ M. Se observó que el tratamiento con RSG 1 y 10 μ M aumenta la expresión de FAT/CD36 luego de 48 horas de incubación.

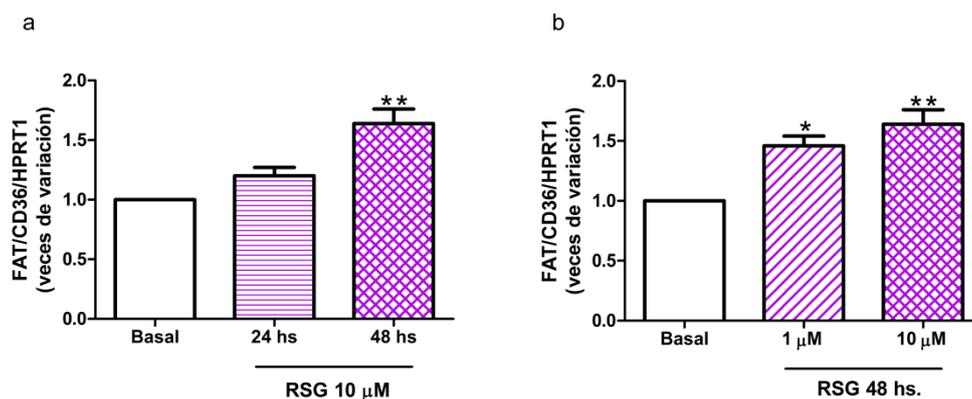


FIGURA 2. **Efecto de RSG sobre la expresión de FAT/CD36.** Las células de Sertoli fueron mantenidas en condiciones basales o incubadas **(a)** con RSG 10 μ M por 24 ó 48 hs. o **(b)** con RSG 1 μ M ó 10 μ M por 48 hs. Se determinaron los niveles de ARNm de FAT/CD36 y de HPRT1 por RT-qPCR. Los resultados se expresaron como veces de variación con respecto al Basal de la relación de las cantidades relativas de FAT/CD36/HPRT1 de tres experimentos independientes ($X \pm DS$) (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ vs Basal).

❖ *Caracterización de la expresión de las isoformas de GPAT en células de Sertoli*

Dado que la expresión de las isoformas de la enzima glicerol-fosfato-acil-transferasa (GPAT1-GPAT4) no había sido evaluada hasta el momento en célula de Sertoli, se procedió a caracterizar la expresión de las mismas en este tipo celular. Se realizó un análisis de RT-PCR utilizando cebadores específicos para cada isoforma en particular. La Figura 3 muestra que las cuatro isoformas de GPAT se expresan en células de Sertoli.



FIGURA 3. **Caracterización de la expresión de las isoformas de GPAT.** Se realizó un análisis por RT-PCR de la expresión de las isoformas de GPAT. Se utilizó ADNc proveniente de células de Sertoli (CS) aisladas de ratas de 20 días de edad y de células germinales (CG) aisladas de ratas de 31 días de edad. ADNc de hígado (H) y de riñón (R) se utilizaron como controles positivos. Blanco de reacción (BI).

❖ *Regulación de la expresión de las isoformas de GPATs por activación de PPAR γ*

Una vez caracterizada la expresión de las isoformas de GPAT en la célula de Sertoli, nos propusimos evaluar si su expresión es regulada por activación de PPAR γ . La Figura 4 muestra los resultados obtenidos luego de incubar a las células de Sertoli con RSG 1 μ M ó 10 μ M durante 24 ó 48 horas. Se observó un aumento significativo en los niveles de ARNm de GPAT1 luego de 24 y 48 horas de tratamiento con RSG 10 μ M. No se observaron variaciones para ninguna de las demás isoformas estudiadas.

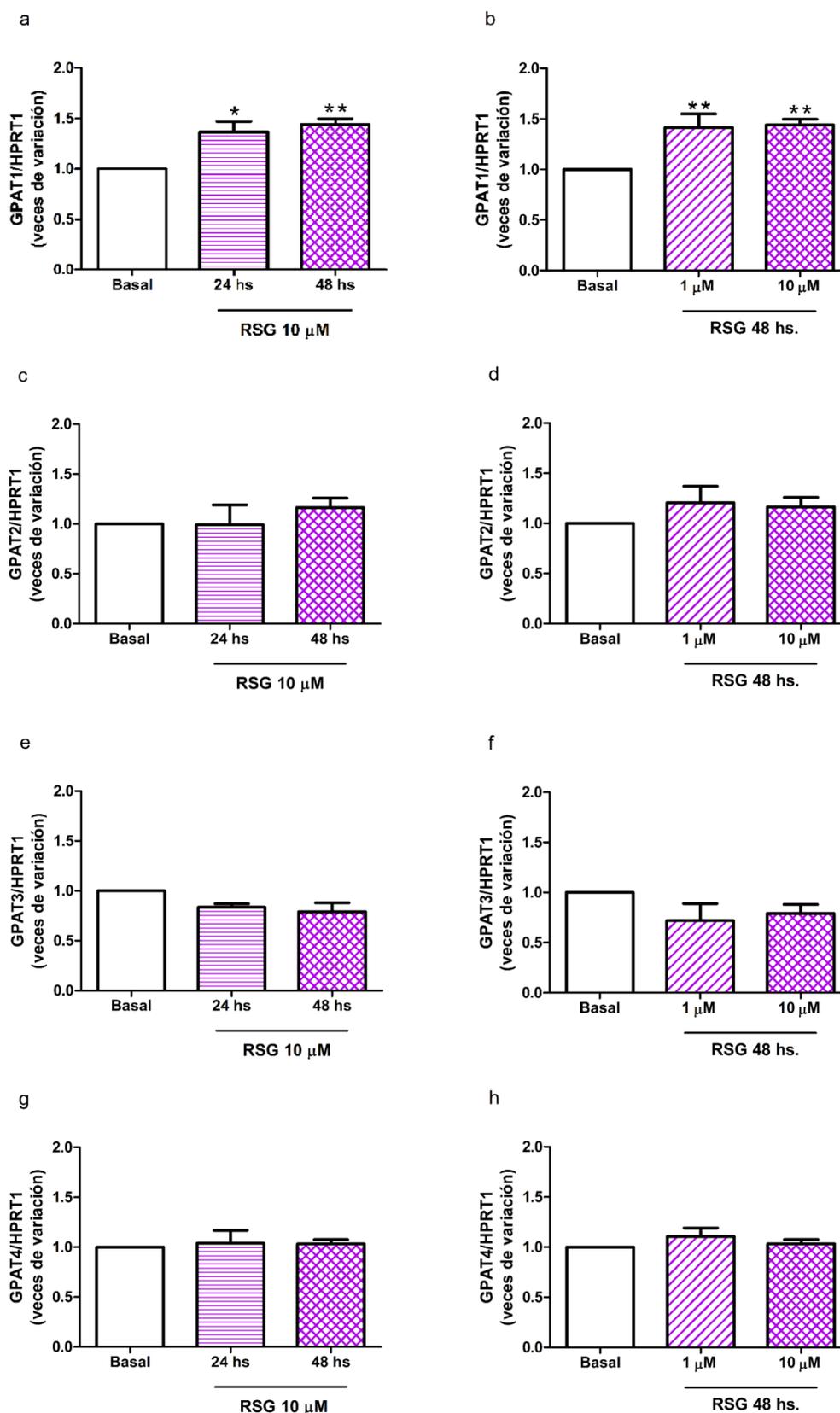


FIGURA 4. Efecto de RSG sobre la expresión de GPATs. Las células de Sertoli fueron mantenidas en condiciones basales o incubadas (a, c, e, g) con RSG 10 μ M por 24 ó 48 hs. o (b, d, f, h) con RSG 1 μ M ó 10 μ M durante 48 hs. Se determinaron por RT-qPCR los niveles de ARNm de GPAT1, GPAT2, GPAT3, GPAT4 y de HPRT1. Los resultados se expresaron como veces de variación con respecto al Basal de la relación de las cantidades relativas de GPAT/HPRT1 de tres experimentos independientes ($X \pm DS$) (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ vs Basal).

❖ Regulación de la expresión de DGAT1 por activación de PPAR γ

Con respecto a la expresión de las isoformas de la enzima diacilglicerol-acil-transferasa (DGAT1 y DGAT2), enzimas encargadas del último paso en la síntesis de triglicéridos, se había demostrado que las células de Sertoli expresaban DGAT1 pero no DGAT2 (Oresti y col., 2013). Nos propusimos evaluar si su expresión es regulada por activación de PPAR γ . La Figura 6 muestra los resultados obtenidos luego de incubar a las células de Sertoli con RSG 1 μ M ó 10 μ M durante 24 ó 48 horas. No se observaron variaciones en la regulación de la expresión de DGAT1 en ninguna de las condiciones estudiadas.

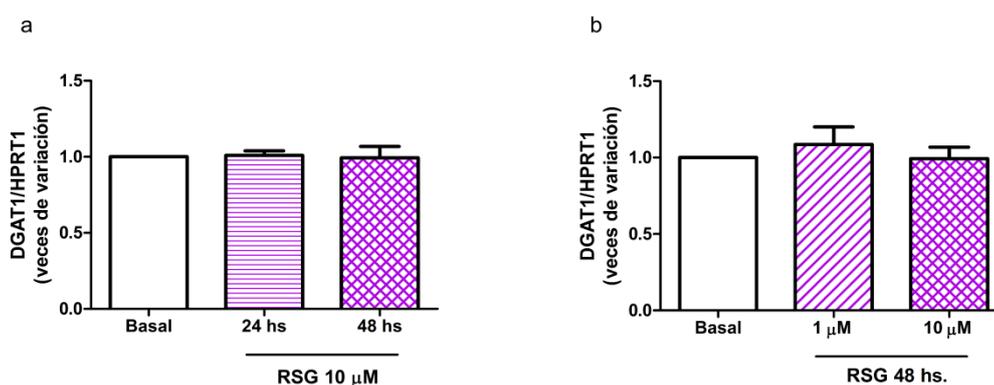


FIGURA 6. **Efecto de RSG sobre la expresión de DGAT1.** Las células de Sertoli fueron mantenidas en condiciones basales o incubadas (a) con RSG 10 μ M por 24 ó 48 hs. o (b) con RSG 1 μ M ó 10 μ M durante 48 hs. Se determinaron por RT-qPCR los niveles de ARNm de DGAT1 y de HPRT1. Los resultados se expresaron como veces de variación con respecto al Basal de la relación de las cantidades relativas de DGAT1/HPRT1 de tres experimentos independientes ($X \pm DS$).

❖ Regulación del contenido de TAGs por activación de PPAR γ

Considerando que la RSG aumenta la expresión de genes relacionados con la síntesis de TAGs, decidimos evaluar si el tratamiento con la droga aumenta el contenido de TAGs en la monocapa de células de Sertoli. En la Figura 7 puede observarse que el tratamiento por 48 horas con RSG 10 μ M aumenta el contenido de TAGs en la monocapa celular.

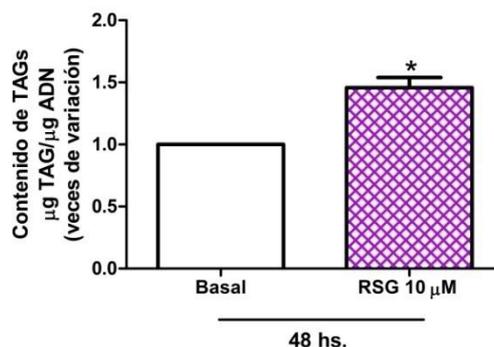


FIGURA 7. **Efecto de RSG sobre el contenido de TAGs.** Las células de Sertoli fueron mantenidas en condiciones basales, o incubadas con RSG 10 μ M durante 48 hs. Las incubaciones se realizaron por triplicado y finalizado el período de incubación se cuantificaron los TAGs en la monocapa celular. Los resultados se expresan como veces de variación con respecto al basal de la relación μ g TAG/ μ g ADN. El gráfico muestra la $X \pm DS$ de tres experimentos independientes (* $p < 0,05$ vs Basal).

❖ *Caracterización de la expresión de las isoformas de PLIN en células de Sertoli*

Al momento de iniciarse este trabajo sólo se había demostrado la expresión de PLIN2 en células de Sertoli (Oresti y col., 2013). Por lo tanto se decidió caracterizar la expresión de las PLINs en este tipo celular. Se realizó un análisis de RT-PCR utilizando cebadores específicos para cada PLIN en particular. La Figura 8 muestra que las células de Sertoli además de PLIN2, expresan PLIN 1, 3 y 4.



FIGURA 8. **Caracterización de la expresión de las isoformas de PLIN.** Se realizó un análisis por RT-PCR de la expresión de las isoformas de PLIN (1-5). Se utilizaron ADNc provenientes de células de Sertoli (CS) aisladas de ratas de 20 días de edad, de células germinales (CG) aisladas de ratas de 31 días de edad, y de testículos (T) de rata adulta. ADNc de músculo esquelético (M) se utilizó como control positivo. Blanco de reacción (BI).

❖ *Regulación de la expresión de las isoformas de PLIN por activación de PPAR γ*

Una vez caracterizadas las PLINs que se expresan en la célula de Sertoli, nos propusimos evaluar si su expresión es regulada por activación de PPAR γ . La Figura 9 muestra los resultados obtenidos luego de incubar a las células de Sertoli con RSG 1 μ M ó 10 μ M durante 24 ó 48 horas. Se observó un aumento significativo en los niveles de ARNm de PLIN1 luego de 24 y 48 horas de tratamiento con RSG 10 μ M. Asimismo, se observó un aumento de la expresión de PLIN2 y PLIN3 luego de 24 y 48 horas de incubación con RSG 10 μ M, efecto que también se observó con el tratamiento por 48 horas con la dosis de 1 μ M. Con respecto a la expresión de PLIN4, no se observaron modificaciones en los niveles de expresión en ninguna de las condiciones experimentales estudiadas.

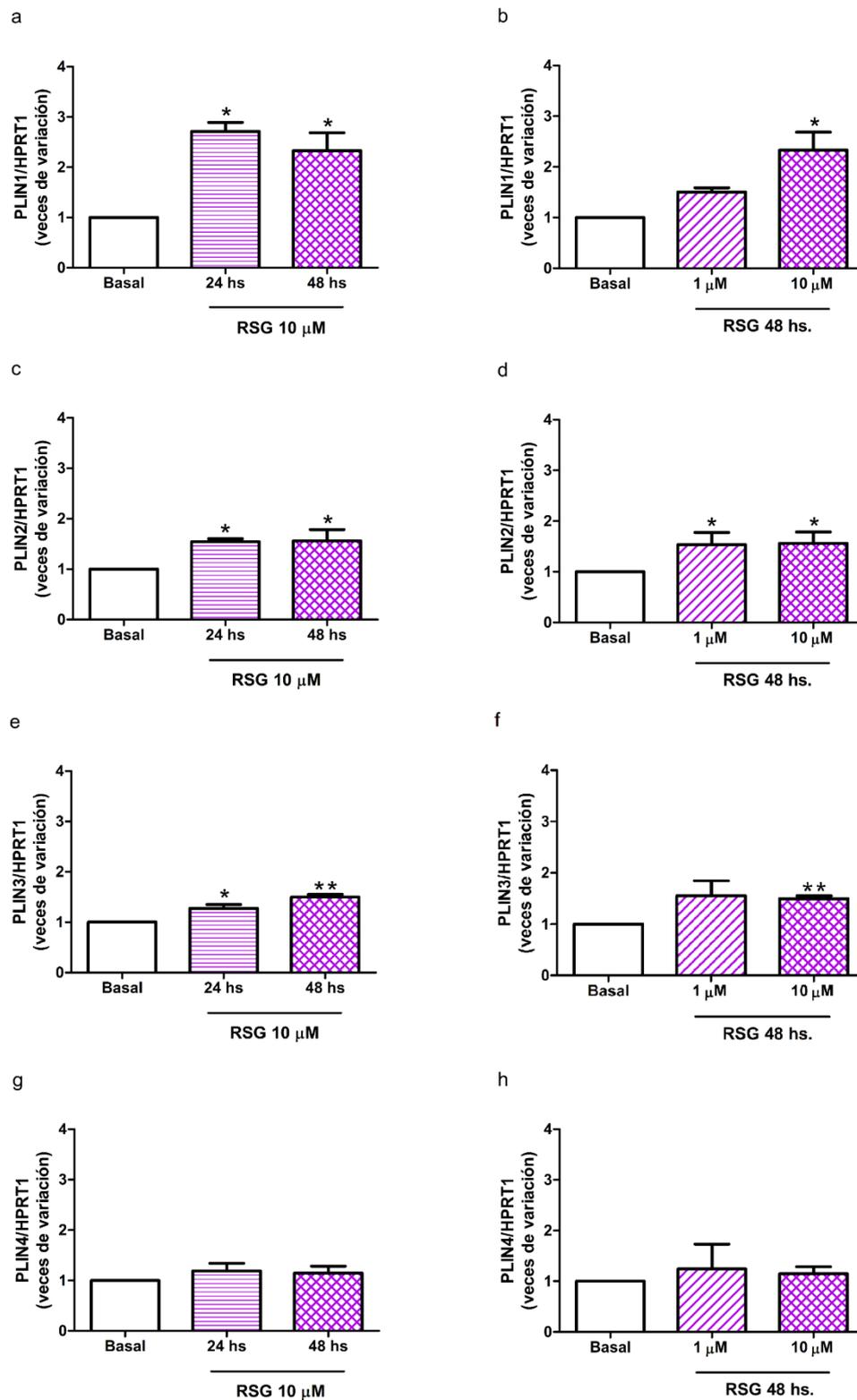


FIGURA 9. Efecto de RSG sobre la expresión de PLINs. Las células de Sertoli fueron mantenidas en condiciones basales o incubadas (a, c, e, g, i) con RSG 10 μM por 24 ó 48 hs. o (b, d, f, h, j) con RSG 1 μM ó 10 μM durante 48 hs. Se determinaron por RT-qPCR los niveles de ARNm de PLIN1, PLIN2, PLIN3 y PLIN4 y de HPRT1. Los resultados se expresaron como veces de variación con respecto al Basal de la relación de las cantidades relativas de PLIN/HPRT1 de tres experimentos independientes (X±DS) (*p<0,05; **p<0,01 vs Basal).

❖ *Regulación del contenido de gotas lipídicas por activación de PPAR γ*

Considerando que la RSG aumenta el contenido de TAGs y la expresión de genes relacionados con la formación de gotas lipídicas, decidimos evaluar su efecto sobre el contenido de gotas lipídicas en la monocapa celular. En la Figura 10 puede observarse que el tratamiento por 48 horas con RSG 10 μ M aumenta la cantidad de gotas lipídicas en la monocapa de células de Sertoli.

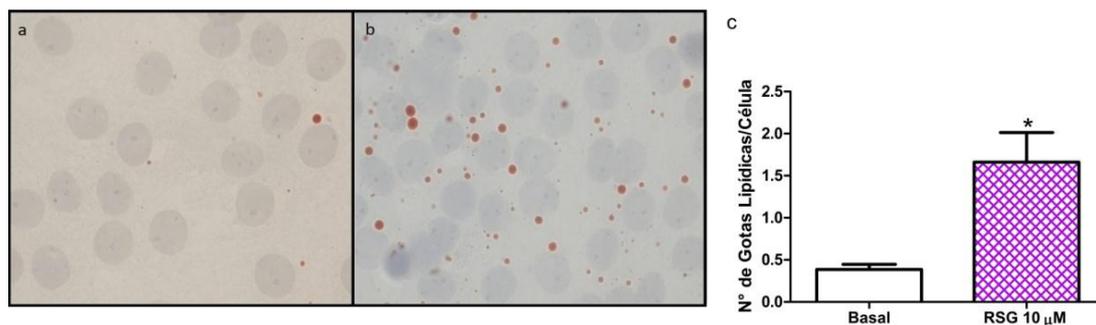


FIGURA 10. **Efecto de RSG sobre el contenido de gotas lipídicas.** Las células de Sertoli fueron mantenidas en condiciones basales o incubadas con RSG 10 μ M durante 48 hs. **(a)** y **(b)** Las fotografías muestran imágenes representativas de las monocapas de células de Sertoli luego de la tinción con una solución saturada de Oil Red O. **(c)** Cuantificación de gotas lipídicas, contando las gotas presentes en al menos 100 células por campo en 3 campos independientes para cada condición experimental. Los resultados se expresan como número de gotas lipídicas/célula ($X \pm DS$) de un experimento representativo de tres (* $p < 0,05$ vs Basal).

En su conjunto, los resultados obtenidos en esta primera parte del trabajo indican que la activación de PPAR γ regula la expresión de distintos genes que promueven el almacenamiento de ácidos grasos como TAGs aumentando la acumulación de los mismos en gotas de lípidos. Este proceso resulta de gran importancia en una célula que utiliza los ácidos grasos como principal fuente energética, como lo hace la célula de Sertoli.

Regulación por activación de PPAR γ de los mecanismos moleculares involucrados en la producción de lactato por las células de Sertoli.

Como se mencionó en la introducción, la producción de lactato por la célula de Sertoli es fundamental para proveer de energía a las células germinales en desarrollo y, por otro lado, la activación de PPAR γ regula la expresión de genes relacionados con el metabolismo de los hidratos de carbono en distintos tipos celulares. Consecuentemente, nuestro segundo objetivo fue evaluar si la activación de PPAR γ participa también en la regulación de distintos mecanismos moleculares involucrados en la producción de lactato en la célula de Sertoli.

❖ *Regulación del consumo de glucosa por activación de PPAR γ*

Dado que se ha demostrado que la activación de PPAR γ regula el metabolismo de hidratos de carbono en distintos tipos celulares, inicialmente evaluamos si RSG modula el consumo de glucosa por la célula de Sertoli. La Figura 11 muestra que el tratamiento por 48 horas con RSG 10 μ M produjo un aumento en el consumo de glucosa en las células de Sertoli.

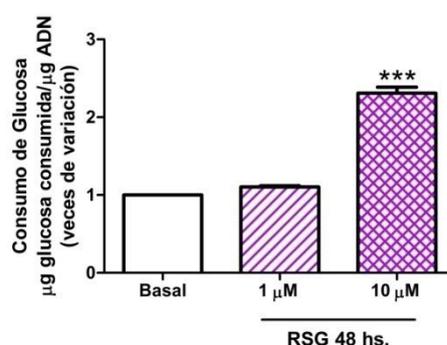


FIGURA 11. **Efecto de RSG sobre el consumo de glucosa.** Las células de Sertoli fueron mantenidas en condiciones basales o incubadas con RSG 1 μ M ó 10 μ M durante 48 hs. Las incubaciones se realizaron por triplicado y finalizado el período de incubación se determinó el consumo de glucosa. Los resultados se expresan como veces de variación con respecto al basal de la relación μ g glucosa consumida/ μ g ADN ($X \pm DS$; $n = 3$; *** $p < 0,001$ vs Basal).

❖ *Regulación de la entrada de glucosa y expresión de GLUT1 y GLUT2 por activación de PPAR γ*

El primer paso en la metabolización de la glucosa es su entrada a la célula la cual es mediada por transporte facilitado a través de los transportadores de glucosa (GLUTs). Evaluamos si la activación de PPAR γ regula la incorporación del monosacárido. La Figura 12 muestra que el tratamiento con RSG 10 μ M por 48 horas aumenta la incorporación de glucosa a la célula.

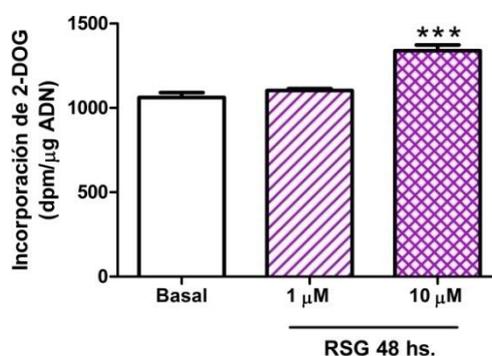


FIGURA 12. **Efecto de RSG sobre la incorporación de glucosa.** Las células fueron mantenidas en condiciones basales o incubadas con RSG 1 ó 10 μ M durante 48 hs. Finalizado el período de incubación se realizó el ensayo de incorporación de 2-DOG sobre la monocapa celular. Las incubaciones se realizaron por triplicado y los resultados se expresan como dpm/ μ g ADN ($X \pm DS$) de un experimento representativo de tres (***) $p < 0,001$ vs Basal).

Evaluamos a continuación la regulación por activación de PPAR γ de la expresión de los transportadores de glucosa GLUT1 y GLUT2 que podrían estar involucrados en el aumento de la incorporación de glucosa observado. Los niveles de ARNm de GLUT1 no fueron modificados en ninguna de las condiciones experimentales analizadas (Figura 13a y b). Por otro lado, las Figuras 13c y d muestran que la dosis de RSG 10 μ M incrementa la expresión de GLUT2 tanto a las 24 como a las 48 horas.

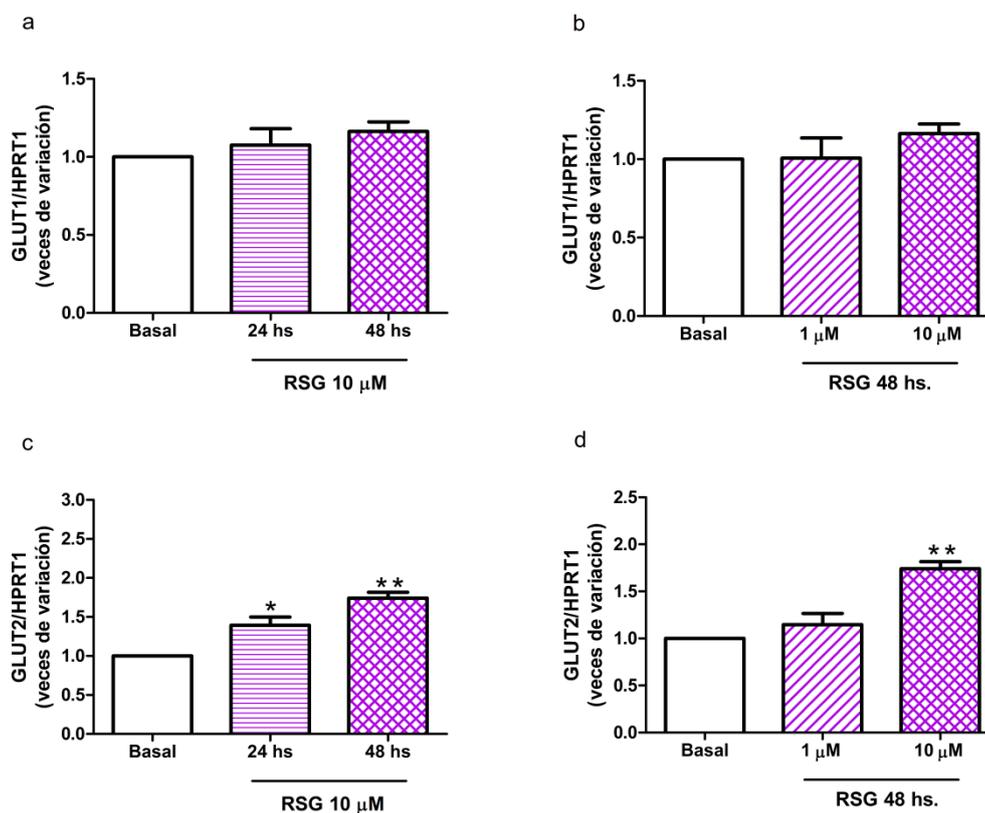


FIGURA 13. **Efecto de RSG sobre la expresión de GLUT1 y GLUT2.** Las células de Sertoli fueron mantenidas en condiciones basales o incubadas (a, c) con RSG 10 μ M por 24 ó 48 hs. o (b, d) con RSG 1 μ M ó 10 μ M durante 48 hs. Se determinaron mediante RT-qPCR los niveles de ARNm de GLUT1, GLUT2 y de HPRT1. Los resultados se expresaron como veces de variación con respecto al Basal de la relación de las cantidades relativas de GLUT/HPRT1 de tres experimentos independientes ($X \pm DS$) (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ vs Basal).

❖ Regulación de la expresión de PFKFB3 y PKM2 por activación de PPAR γ

El flujo glucolítico puede ser regulado por la expresión de distintas enzimas que participan en la vía glucolítica. La PFKFB y la PK son enzimas claves en la regulación de esta vía. Se analizaron los niveles de expresión de PFKFB3 y PKM2, isoformas de ambas enzimas que presentan sitio PPRE y que son de alta expresión testicular.

La Figura 14 muestra que no se observaron variaciones significativas en los niveles de expresión de PFKFB3 luego del tratamiento de las células con RSG con ninguna de las dosis ni tiempos analizados.

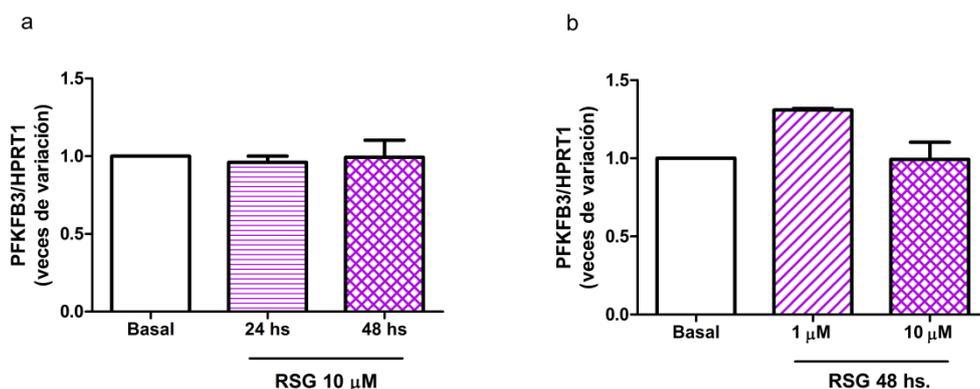


FIGURA 14. **Efecto de RSG sobre la expresión de PFKFB3.** Las células de Sertoli fueron mantenidas en condiciones basales o incubadas **(a)** con RSG 10 μ M por 24 ó 48 hs. o **(b)** con RSG 1 μ M ó 10 μ M durante 48 hs. Se determinaron los niveles de ARNm de la enzima PFKFB3 y de HPRT1 por RT-qPCR. Los resultados se expresaron como veces de variación con respecto al Basal de la relación de las cantidades relativas de PFKFB3/HPRT1 de tres experimentos independientes ($X \pm DS$).

La Figura 15 muestra que tampoco se observaron variaciones significativas en los niveles de expresión de PKM2 luego del tratamiento de las células con RSG con ninguna de las dosis ni tiempos estudiados.

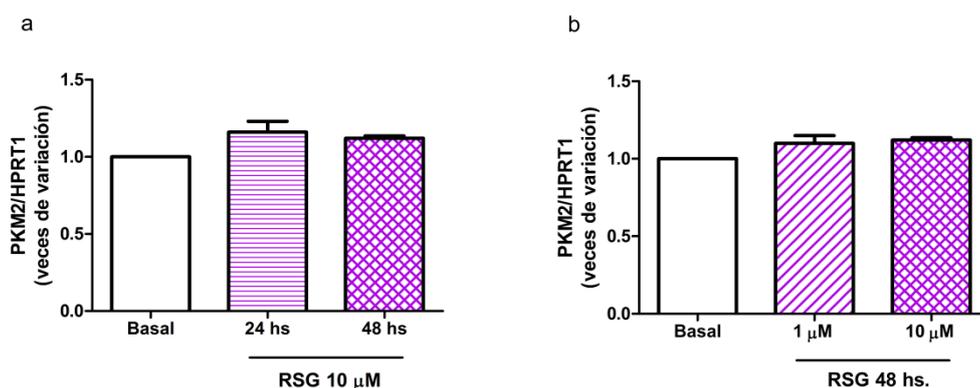


FIGURA 15. **Efecto de RSG sobre la expresión de PKM2.** Las células de Sertoli fueron mantenidas en condiciones basales o incubadas **(a)** con RSG 10 μ M por 24 ó 48 hs. o **(b)** con RSG 1 μ M ó 10 μ M durante 48 hs. Se determinaron los niveles de ARNm de la enzima PKM2 y de HPRT1 por RT-qPCR. Los resultados se expresaron como veces de variación con respecto al Basal de la relación de las cantidades relativas de PKM2/HPRT1 de tres experimentos independientes ($X \pm DS$).

❖ *Regulación de los niveles de p-PDC por activación de PPAR γ*

El complejo piruvato deshidrogenasa (PDC) cataliza la conversión irreversible de piruvato en acetil-CoA, por lo que su actividad determinará de forma indirecta los niveles de piruvato disponibles para ser convertidos a lactato. La actividad del PDC es regulada por fosforilación, se encuentra inactivo cuando está fosforilado. Por lo tanto, un aumento en los niveles de PDC fosforilado (p-PDC) correlaciona con una mayor disponibilidad de piruvato. Analizamos entonces la regulación de los niveles de p-PDC por activación de PPAR γ . La Figura 16 muestra que los tratamientos con RSG 1 μ M y 10 μ M por 48 horas no modificaron los niveles de p-PDC en la célula de Sertoli.

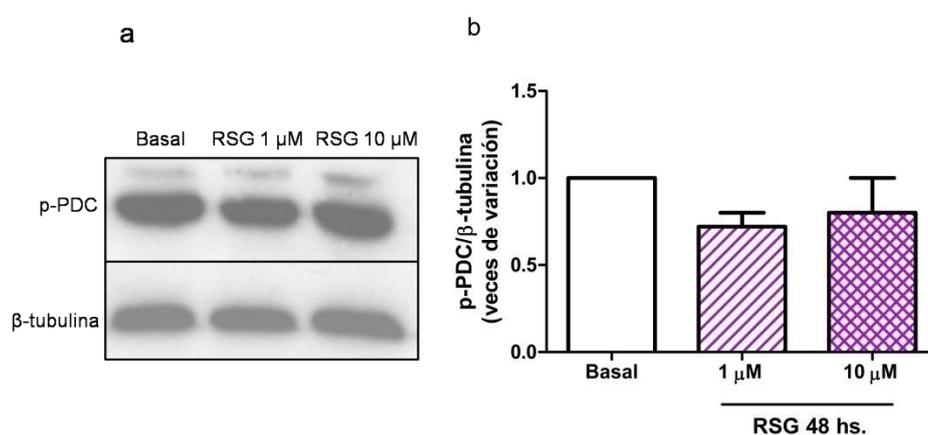


FIGURA 16. **Efecto de RSG sobre los niveles de p-PDC.** Las células de Sertoli fueron mantenidas en condiciones basales o incubadas con RSG 1 μ M ó 10 μ M durante 48 hs. Finalizada la incubación se obtuvieron extractos celulares que fueron utilizados para determinar los niveles de proteínas p-PDC y β -tubulina por Western Blot. **(a)** Se muestra un experimento representativo de tres realizados. **(b)** En el gráfico de barras, los resultados se expresan como veces de variación con respecto del Basal de la relación p-PDC/ β -tubulina de tres experimentos independientes ($\bar{X} \pm DS$).

❖ *Regulación de la actividad de LDH y de la expresión de LDH A por activación de PPAR γ*

Finalmente, la conversión de piruvato a lactato es catalizada por la enzima LDH. Se ha demostrado que un aumento en la expresión de la subunidad A de la LDH correlaciona con un aumento en la producción de lactato en la célula de Sertoli. Analizamos entonces la posible regulación de este último paso en la producción de lactato por activación de PPAR γ . La Tabla 2 muestra que la actividad de LDH no se modificó con el tratamiento con RSG 10 μ M por 48 horas. Asimismo, la Figura 17 muestra que no se observaron variaciones significativas en los niveles de expresión de la subunidad A de LDH luego del tratamiento de las células con RSG con ninguna de las dosis ni tiempos estudiados.

	Actividad LDH (mUI/μg ADN)
Basal	22,53 \pm 0,6
RSG 1 μM	22,48 \pm 0,4
RSG 10 μM	22,52 \pm 0,7

Tabla 2. **Efecto de RSG sobre la actividad de LDH.** Las células de Sertoli fueron mantenidas en condiciones basales o incubadas con RSG 1 μ M ó 10 μ M durante 48 hs. Las incubaciones se realizaron por triplicado y finalizado el período de incubación se determinó la actividad de LDH en la monocapa celular. Los resultados se expresan como mUI/ μ g ADN ($X \pm DS$) de un experimento representativo de tres.

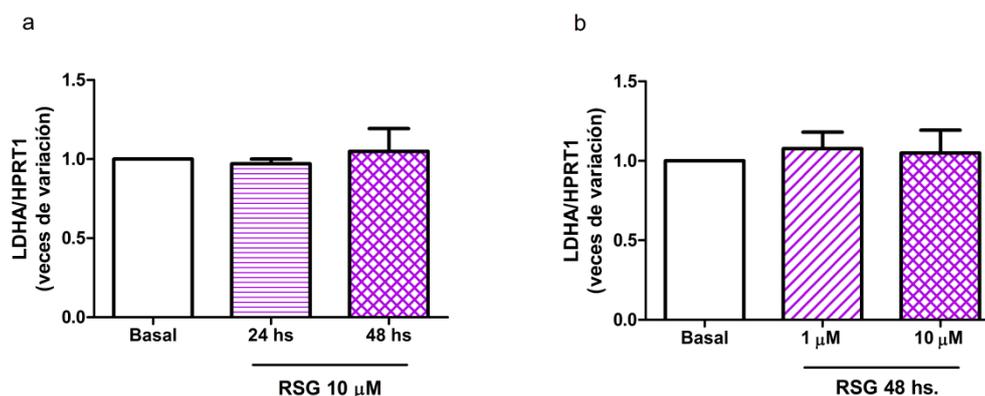


FIGURA 17. **Efecto de RSG sobre la expresión de LDHA.** Las células de Sertoli fueron mantenidas en condiciones basales o incubadas **(a)** con RSG 10 µM por 24 ó 48 hs. o **(b)** con RSG 1 µM ó 10 µM durante 48 hs. Se determinaron por RT-qPCR los niveles de ARNm de la subunidad A de la enzima LDH y de HPRT1. Los resultados se expresaron como veces de variación con respecto al Basal de la relación de las cantidades relativas de LDHA/HPRT1 de tres experimentos independientes ($X \pm DS$).

❖ *Regulación de la producción de lactato por activación de PPAR γ*

Considerando que RSG regula mecanismos involucrados en la producción de lactato, decidimos evaluar si la activación de PPAR γ conducía a un aumento en los niveles del hidroxácido. La Figura 18 muestra que el tratamiento por 48 horas con RSG 10 µM produjo un aumento en la producción de lactato en las células de Sertoli.

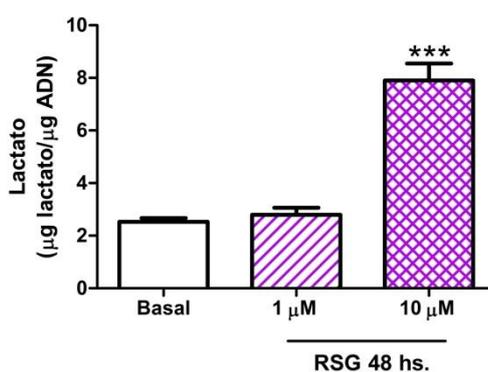


FIGURA 18. **Efecto de RSG sobre la producción de lactato.** Las células de Sertoli fueron mantenidas en condiciones basales o incubadas con RSG 1 µM ó 10 µM durante 48 hs. Las incubaciones se realizaron por triplicado. Finalizada la incubación se determinó el lactato producido en el medio condicionado. Los resultados se expresan como µg lactato/µg ADN ($X \pm DS$) de un experimento representativo de tres (***) $p < 0,001$ vs Basal).

En su conjunto, los resultados obtenidos en esta segunda parte del trabajo indican que la activación de PPAR γ regula la producción de lactato aumentando la entrada de glucosa a la célula y la expresión de GLUT2. Dada la importancia del lactato como nutriente para las células germinales en desarrollo, la regulación por PPAR γ de este proceso resultaría fundamental para el normal desarrollo de la espermatogénesis.

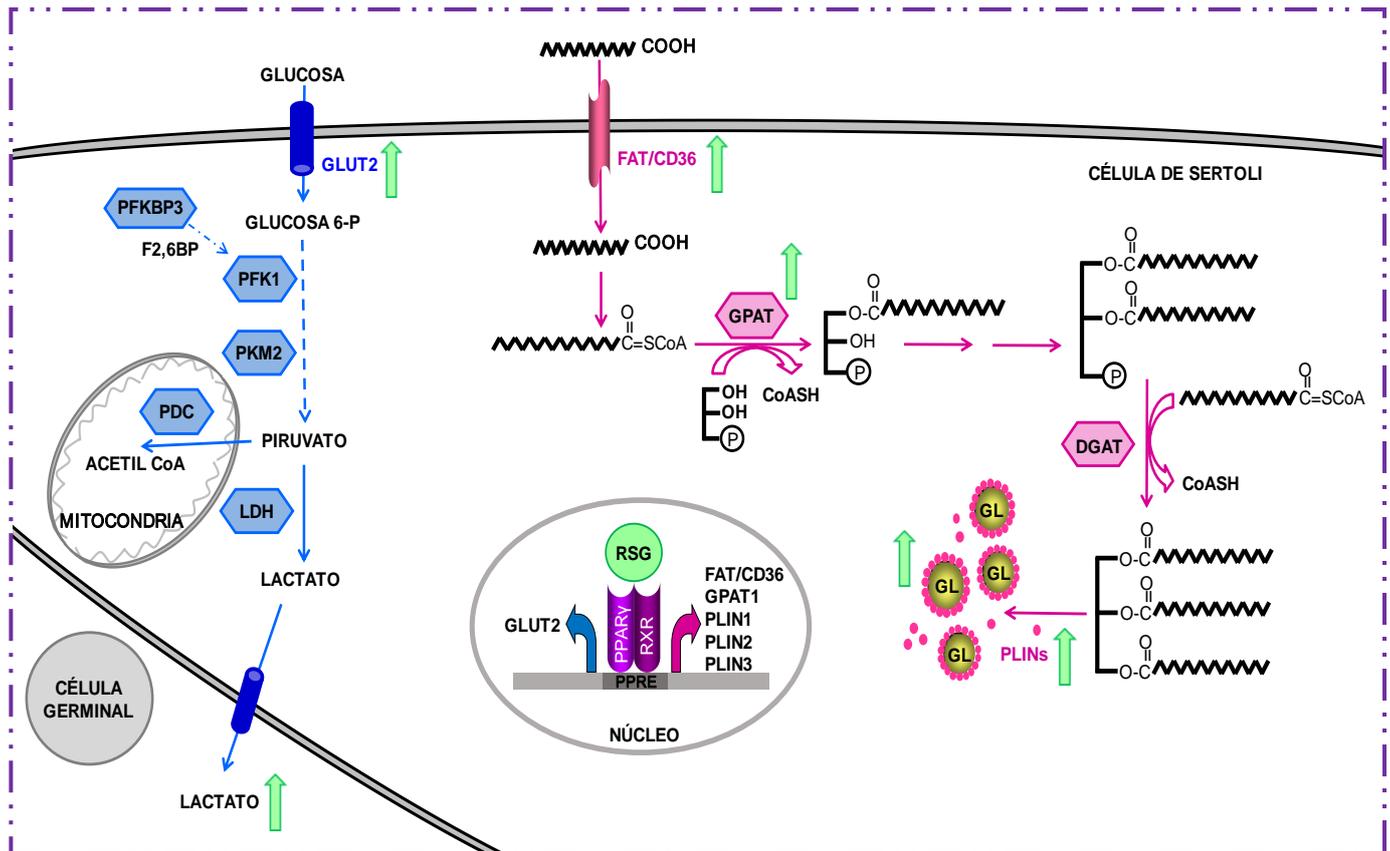


Figura 19. Esquema del modelo propuesto para los mecanismos moleculares involucrados en la regulación por PPAR γ del metabolismo energético de la célula de Sertoli. La activación del PPAR γ promueve la transcripción de FAT/CD36, GPAT1 y PLIN1-3, produciendo un aumento en el contenido de TAGs y gotas lipídicas (camino metabólico representado en rosa). Simultáneamente, la activación de PPAR γ aumenta la expresión de GLUT2 y la entrada de glucosa a la célula, resultando en un aumento en la producción de lactato (camino metabólico representado en azul). Gotas de lípidos (GL)

Discusión

La espermatogénesis solamente es posible en presencia de una célula de Sertoli capaz de brindar el adecuado soporte físico y nutricional a las células germinales en desarrollo. Como se mencionó en la introducción, 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 espermatozoides y espermátides (Boussouar y Benahmed, 2004) y los ácidos grasos constituyen el principal sustrato energético para satisfacer los requerimientos de la propia célula de Sertoli. Al respecto, Xiong y colaboradores (2009) demostraron que en células de Sertoli en cultivo la inhibición de la oxidación de ácidos grasos disminuye los niveles de ATP intracelulares, reforzando trabajos anteriores de Jutte y colaboradores (1985) que habían demostrado que el palmitato puede ser oxidado a CO_2 y cuerpos cetónicos. En este contexto metabólico, el estudio de mecanismos involucrados en el almacenamiento de ácidos grasos, tales como la síntesis de TAGs y la formación de gotas lipídicas, así como de aquellos que participan en la producción de lactato, resulta de sumo interés para comprender en profundidad cómo se regula el metabolismo energético en las células de Sertoli. El entendimiento de dicho metabolismo aportará información para comprender trastornos de la fertilidad masculina que no han podido ser aclarados hasta el momento.

Como se mencionó en la introducción, los factores de transcripción de la familia de los PPARs están relacionados con la regulación del metabolismo lipídico en distintos tipos celulares. En particular en la célula de Sertoli, se ha demostrado la presencia de las tres isoformas de PPARs. Además se demostró que la sobreexpresión de PPAR γ regula la expresión de un grupo importante de genes relacionados a vías metabólicas de lípidos e hidratos de carbono (Thomas y col., 2011). Estas evidencias sugieren un rol importante

del PPAR γ en la regulación del metabolismo energético de la célula de Sertoli. El objetivo de este trabajo fue analizar si la activación del PPAR γ participa en el mantenimiento de un adecuado metabolismo energético de la célula de Sertoli regulando mecanismos moleculares involucrados en la síntesis de TAGs y su almacenamiento en gotas lipídicas y en la producción de lactato.

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 a PPAR γ pertenecen a la familia de las glitazonas, drogas utilizadas para el tratamiento de la Diabetes Mellitus tipo 2. Entre ellas se encuentran rosiglitazona, pioglitazona, troglitazona y GW7845. Estas drogas además de ser utilizadas en el tratamiento de diversas patologías han sido muy útiles para esclarecer el papel de PPAR γ en el metabolismo de distintos tipos celulares (Jeninga y col., 2009; Bonofiglio y col., 2013; Haakonsson y col., 2013; Astakhova y col., 2015). En este trabajo utilizamos la rosiglitazona (RSG) en dosis 1 y 10 μ M, dosis que han sido ampliamente utilizadas en la literatura mencionada. En nuestro modelo experimental, la RSG no modificó la viabilidad celular y aumentó la actividad transcripcional de PPARs, hechos que nos permitieron utilizarla como herramienta para evaluar la participación de PPAR γ en el metabolismo energético de la célula de Sertoli.

El primer objetivo de este trabajo fue analizar la regulación por activación de PPAR γ de mecanismos que participan en el metabolismo lipídico de la célula de Sertoli, en particular aquellos mecanismos involucrados en la síntesis de TAGs y en la formación de gotas lipídicas. Como se mencionó en la introducción, la entrada de ácidos grasos a la célula es mediada en parte por el transportador de ácidos grasos FAT/CD36. Dado que los ácidos grasos constituyen la base para la síntesis de TAGs, analizamos en primer lugar si la activación de PPAR γ aumentaba la expresión de FAT/CD36. Las células de Sertoli incubadas con el agonista PPAR γ presentaron un aumento en la expresión de

FAT/CD36. Numerosos trabajos han observado un aumento en la expresión de FAT/CD36 por agonistas PPAR γ en otros tejidos. En este sentido, Motojima y colaboradores (1998) demostraron que la activación de PPAR γ en adipocito aumenta la expresión del transportador. Asimismo, Teboul y colaboradores (2001) demostraron que el promotor de FAT/CD36 tiene dos sitios PPRE, hallazgo que explica molecularmente el aumento de la expresión de FAT/CD36 por activación de PPAR γ durante la diferenciación del adipocito. De esta forma, el aumento de la expresión de FAT/CD36 en la célula de Sertoli como consecuencia de la activación de PPAR γ se explicaría por una acción directa sobre los sitios PPRE en el promotor del gen. Esta regulación positiva en la expresión de FAT/CD36 también se observó cuando las células de Sertoli fueron tratadas con agonistas PPAR α y PPAR β/δ (Regueira y col., 2014). 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 que son removidas por fagocitosis durante el proceso de espermiación, por lo que 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. Una vez dentro de la célula, estos ácidos grasos serían activados a sus acil-CoAs correspondientes para iniciar la síntesis de TAGs.

El primer paso en la síntesis de TAGs es la esterificación del acil-CoA con el glicerol fosfato para dar ácido lisofosfatídico, reacción es catalizada por la enzima glicerol 3-fosfato aciltransferasa (GPAT). La síntesis de ácido lisofosfatídico es el primer paso en la síntesis de todos los glicerolípidos. Existen cuatro isoformas de GPATs (GPAT1-GPAT4), todas capaces de iniciar la síntesis de TAGs. Si bien se había demostrado la

expresión de GPAT2, GPAT3 y GPAT4 en distintas células testiculares, al momento de iniciar el presente trabajo no se conocían las isoformas de GPAT presentes específicamente en la célula de Sertoli. Con respecto a la GPAT2, se ha demostrado que su expresión es muy abundante en testículo, unas 50 veces más que en tejidos lipogénicos. Sin embargo, se encontró principalmente localizada en espermatocitos y se le atribuyó un rol antiapoptótico en las células germinales (Cattaneo y col., 2012). Esta isoforma está principalmente encargada de la esterificación de ácido araquidónico, ácido graso para el cual se ha demostrado un efecto apoptótico sobre las células germinales. De esta manera la esterificación del ácido araquidónico protegería a las células germinales del efecto apoptótico del mismo. Con respecto a GPAT3, su expresión ha sido demostrada en testículo, sin analizar específicamente su distribución celular (Cao y col., 2006). Con respecto a GPAT4, se ha demostrado mediante técnicas de RT-qPCR que su expresión aumenta en el testículo con la edad del animal, efecto que se atribuye a la presencia de células germinales postmeióticas. Sin embargo, es posible detectar GPAT4 desde la primera semana de vida, cuando la meiosis aún no ha comenzado, lo que indicaría que también se expresaría en células de Sertoli (Qiu y col., 2009). En este trabajo, utilizando la técnica de RT-PCR, observamos que las cuatro isoformas de GPATs se expresan en células de Sertoli. Considerando que la expresión de GPAT2 y de GPAT4 es muy alta en células germinales, cabría la posibilidad de que la presencia observada en células de Sertoli se deba a una pequeña contaminación del cultivo celular con la población germinal. Cabe señalar que las monocapas de células de Sertoli utilizadas para estos ensayos recibieron previamente un tratamiento hipotónico con el objeto de eliminar las escasas células germinales contaminantes y que, además, no se observó expresión de LDHC -isoenzima de LDH presente sólo en células germinales haploides (Markert y col., 1975)- en las mencionadas preparaciones celulares. Estas observaciones descartan la posible contaminación de los cultivos de células de Sertoli con células germinales y

ratifica que existe expresión de GPAT2 y GPAT4 en células de Sertoli. Se ha propuesto a la reacción catalizada por las GPATs como el paso limitante en la síntesis de glicerolípidos regulando el flujo de ácidos grasos hacia la vía sintética. En el proceso de formación de gotas lipídicas es necesaria una coordinada síntesis de glicerolípidos a saber: fosfolípidos que aseguren la formación de la monocapa lipídica que las recubre y TAGs que formarán el centro de las mismas. Se ha postulado que una coordinación de la actividad de las distintas GPATs sería fundamental para la síntesis de fosfolípidos y TAGs (Takeuchi y Reue, 2009). Sin embargo el rol específico de cada GPAT en la síntesis de TAGs y fosfolípidos no ha sido estudiado en detalle. De todos modos cabe especular que la presencia de las cuatro isoformas de GPATs en células de Sertoli proveerán de la batería lipídica necesaria para la formación de gotas de lípidos fundamentales para su metabolismo energético.

Con respecto a la regulación de la expresión de las distintas isoformas de GPATs, se ha demostrado que GPAT1, de localización mitocondrial, presenta máxima actividad en células que tienen alta capacidad en síntesis de TAGs, tales como adipocitos y hepatocitos, y la misma es modulada consistentemente con la síntesis de TAGs de dichas células. En este contexto, se ha observado que su actividad disminuye luego de 48 horas de ayuno y que se recupera cuando los animales ayunados son tratados con sacarosa (Lewin y col., 2001). Asimismo se ha observado que la insulina aumenta la expresión de GPAT1 en hígado (Gonzalez-Baro y col., 2007). GPAT2 también es de localización mitocondrial pero si bien es capaz de iniciar la síntesis de TAGs, no reemplaza a GPAT1 en su función ni es regulada por ayuno/saciedad, al menos en el hígado (Wendel y col., 2009). GPAT3 y GPAT4 se localizan en el retículo endoplasmático. La expresión de GPAT3 aumenta durante la diferenciación del adipocito y se ha observado que en animales obesos, su expresión aumenta por tratamiento con RSG (Cao y col., 2006). También se ha observado que el tratamiento de ratas con RSG por 7 días aumenta la

expresión y actividad de GPAT1 y GPAT3 en depósitos de grasa visceral y subcutánea (Festuccia y col., 2009a). En cambio, en grasa parda sólo aumenta la expresión de GPAT3 (Festuccia y col., 2009b). GPAT4 es muy abundante en tejidos lipogénicos en particular en la glándula mamaria, donde juega un rol fundamental en la síntesis de lípidos de la leche (Beigneux y col., 2006). Una vez caracterizadas las isoformas de GPAT presentes en la célula de Sertoli, decidimos analizar si existe regulación de la expresión de las mismas por activación de PPAR γ . En este contexto observamos que el tratamiento con RSG aumentó únicamente la expresión de GPAT1. Cabe recordar que GPAT1 ha sido relacionada íntimamente con la síntesis de TAGs. Como se mencionó GPAT1 se encuentra en la membrana mitocondrial externa y juega un papel fundamental en el destino de los acil-CoAs de la célula (Lewin y col., 2004). Curiosamente en la misma localización subcelular también se encuentra la carnitina palmitoil-transferasa 1 (CPT1), enzima encargada de la entrada del acil-CoA a la mitocondria para su posterior oxidación. Se ha postulado que en la membrana mitocondrial GPAT1 y CPT1 compiten por los acil-CoAs y definen su destino a vías sintéticas o degradativas (Hammond y col., 2005). En la célula de Sertoli, un aumento en la expresión de GPAT1 por activación de PPAR γ podría contribuir a una mayor utilización de ácidos grasos para la síntesis de lípidos que llevaría a una mayor formación de gotas lipídicas.

El paso final en la síntesis de TAGs es la esterificación del tercer acil-CoA al diacilglicerol. Esta reacción es catalizada por la enzima diacilglicerol-acil-transferasa (DGAT) de la cual existen dos isoformas DGAT1 y DGAT2 (Shi y Cheng, 2009). Ambas enzimas se encuentran localizadas en el retículo endoplasmático. Su expresión es alta en tejidos que se especializan en la síntesis de TAGs. Si bien ambas enzimas catalizan la misma reacción, se distinguen funcionalmente por sus diferencias en las propiedades catalíticas y su regulación fisiológica. Este hecho se pone en evidencia en los fenotipos diferentes de los ratones KO para cada una de ellas. El animal KO para DGAT1 presenta

una disminución del tejido adiposo y resistencia a desarrollar obesidad inducida por la dieta que va acompañada por un aumento en el gasto energético (Chen y col., 2003). Por el contrario, el KO para DGAT2 presenta muerte neonatal y anomalías en la formación de la piel. Este fenotipo letal no puede ser compensado por DGAT1, lo que indica el rol diferencial de cada DGAT en la síntesis endógena de TAGs y sugiere la presencia de distintos pool de TAGs (Stone y col., 2004). DGAT1 se expresa altamente en intestino delgado, tejido adiposo, glándulas mamarias, testículos, timo, músculo esquelético, bazo, corazón y piel (Cases y col., 1998), mientras que la mayor expresión de ARNm de DGAT2 se observa en hígado, tejido adiposo, glándulas mamarias, testículos, leucocitos periféricos y corazón (Cases y col., 2001). Particularmente se ha estudiado la expresión de ambas DGATs en testículo. Dicha expresión varía con el desarrollo testicular y con el tipo celular. En células de Sertoli de ratón se ha observado que sólo se expresa DGAT1, siendo DGAT2 altamente expresada en células germinales (Oresti y col., 2013).

Con respecto a la regulación de la expresión de DGATs, se conoce que la expresión de DGAT1 aumenta con la diferenciación del adipocito (Cases y col., 1998). En este contexto, se ha observado que ratas tratadas por 7 días con RSG presentan mayores niveles de ARNm de DGAT1 y DGAT2 en la grasa subcutánea (Festuccia y col., 2009a). Por otro lado, en la grasa visceral y grasa parda el mismo tratamiento sólo aumenta la expresión de DGAT1 (Festuccia y col., 2009a; Festuccia y col., 2009b). Otros autores muestran que en tejido adiposo de humanos y ratones tratados con RSG también aumenta la expresión de DGAT1 (Ranganathan y col., 2006). Estos antecedentes bibliográficos sugieren que la expresión de DGATs podría estar regulada por activación de PPAR γ . Curiosamente, al evaluar la regulación de la expresión de DGAT1 por activación de PPAR γ , observamos que el tratamiento con RSG no modificó los niveles de ARNm de dicha enzima. Estos resultados indican que en célula de Sertoli, la expresión de DGAT1 no depende de la activación de PPAR γ . Los mecanismos que regulan su expresión aún

no se han analizado en células de Sertoli aunque se podría especular que las hormonas que favorecen el trofismo celular, como la FSH, podrían participar en esta regulación.

Finalmente decidimos evaluar el efecto de la activación de PPAR γ sobre el contenido de TAGs en la monocapa de células de Sertoli. Los resultados obtenidos muestran que el tratamiento con RSG aumenta los niveles de TAGs. El aumento producido por la RSG de la expresión del transportador de ácidos grasos FAT/CD36 y de la GPAT1, enzima encargada de iniciar la síntesis de TAGs, podría explicar estos hallazgos sugiriendo un rol importante de la activación de PPAR γ en la síntesis de lípidos en la célula de Sertoli, que podría conducir a una mayor formación de gotas de lípidos.

El proceso de formación de gotas lipídicas comprende la acción coordinada de una serie de proteínas cuyo estudio constituye un campo muy fértil en la actualidad. La familia de las perilipinas (PLINs) ha sido íntimamente relacionada con la formación y estabilidad de las gotas lipídicas. Existen cinco isoformas de PLINs. Todas comparten la habilidad de unirse a gotas lipídicas, ya sea de manera constitutiva o en respuesta a estímulos metabólicos específicos. Cuando se localizan en la superficie de las gotas lipídicas pueden interactuar con la maquinaria celular necesaria para la biogénesis de las mismas o pueden regular el acceso de otras proteínas encargadas de la degradación de los TAGs presentes en su interior (Wolins y col., 2006). Las distintas PLINs difieren en tamaño, expresión en los distintos tejidos, afinidad por las gotas lipídicas, estabilidad en el citoplasma y regulación transcripcional. Además difieren en su preferencia por el secuestro de TAGs o ésteres de colesterol en la gota lipídica, lo que enfatiza más aun la diversidad de funciones de las PLINs (Hsieh y col., 2012). PLIN1 es un marcador de la diferenciación del adipocito y presenta preferencias por el almacenamiento de TAGs. Los ratones KO para PLIN1 son fértiles y, si bien comen con normalidad, son delgados y presentan una disminución del tejido adiposo y resistencia a la obesidad inducida por la dieta (Martinez-Botas y col., 2000). PLIN2 es de expresión ubicua pero predominante en

hepatocitos donde cumpliría la misma función que PLIN1 en adipocito. Los animales KO para PLIN2 presentan una función del tejido adiposo normal, sin embargo tienen poca acumulación de TAGs en hígado y son resistentes a la esteatosis hepática inducida por la dieta grasa (Chang y col., 2006). Las gotas de lípidos en estos animales son pocas y pequeñas. Se ha descrito un rol de PLIN2 en la formación de gotas lipídicas ya que su expresión aumenta cuando las células reciben sobrecarga de ácidos grasos (Grasselli y col., 2010). PLIN3 es una proteína ubicua que es estable en el citoplasma y se asocia a la superficie de la gota lipídica naciente, organizando así el empaquetamiento de TAGs recién sintetizados para maximizar el almacenamiento de energía en el caso de exceso de nutrientes (Wolins y col., 2001). PLIN4 se expresa principalmente en tejidos especializados en el almacenamiento de lípidos. Es de localización citoplasmática y se transloca a la superficie de las gotas lipídicas cuando las células tienen una sobrecarga de ácidos grasos (Wolins y col., 2003). PLIN5 se expresa en tejidos que presentan altos niveles de oxidación de ácidos grasos como el corazón, el músculo esquelético y el hígado en ayuno. Se relocaliza en las gotas lipídicas en el hígado en ayuno y su expresión es estimulada por activación de PPAR β/δ (Bindesbøll y col., 2013). En su conjunto, las PLINs organizan la formación y la estabilidad de las gotas de lípidos.

Hasta el momento de comenzar este trabajo, en la célula de Sertoli sólo se había estudiado la presencia de PLIN2. En este trabajo, utilizando la técnica de RT-PCR, observamos que salvo PLIN5, el resto de las PLINs se expresan en células de Sertoli. Como se mencionó, las distintas PLINs son utilizadas para distintos eventos en la formación de gotas lipídicas, proceso que ha sido estudiado en detalle en el adipocito. Cuando comienza la síntesis de TAGs en el retículo endoplasmático, PLIN3 y PLIN4 comienzan a localizarse en las gotas lipídicas nacientes. Luego de un tiempo se empieza a detectar PLIN2 en la superficie que posteriormente es reemplazada por PLIN1 en la gota lipídica madura. Así, la formación de la gota lipídica se presenta como una

maduración ordenada a partir de una gota naciente con cambios progresivos en las proteínas que cubren su superficie a medida que crece hasta formar una gota lipídica madura (Wolins y col., 2006). La célula de Sertoli presenta numerosas gotas lipídicas que sirven de reserva de ácidos grasos, principal fuente energética de este tipo celular. En este sentido es lógico especular que la célula de Sertoli presente una amplia variedad de PLINs que le permita formar eficientemente gotas lipídicas que almacenen TAGs, con el objeto de disponer de ácidos grasos para satisfacer sus requerimientos energéticos cuando sea necesario.

Con respecto a la regulación de la expresión de PLINs por activación de PPAR γ , dicha regulación ha sido demostrada en diversos tipos celulares. La expresión de PLIN1 en adipocitos depende de PPAR γ (Arimura y col., 2004). Asimismo, se ha observado que la expresión de PLIN1 aumenta en la grasa subcutánea, pero no en la visceral ni en músculo, luego del tratamiento con RSG de ratas diabéticas (Kim y col., 2007). Estos hallazgos intentan explicar la redistribución de la grasa y el efecto sensibilizante a la insulina de la RSG. Se ha observado que la expresión de PLIN2, PLIN4 y PLIN5 también depende de la activación de PPARs (Bickel y col., 2009). Se ha localizado un sitio PPRE en los genes que codifican para PLIN1, 2, 4 y 5. Por el contrario, la expresión de PLIN3 no sería regulada directamente por PPARs ya que no posee un sitio PPRE en su promotor.

Habiendo caracterizado las PLINs presentes en la célula de Sertoli, evaluamos a continuación su posible regulación por activación de PPAR γ . Nuestros resultados indican que la expresión de PLIN1, PLIN2 y PLIN3 es estimulada por RSG. En el contexto de la regulación de la expresión de PLINs, estudios en testículos sometidos a hipertermia mostraron que la expresión de PLIN2 y PLIN3 aumenta durante la injuria, coincidentemente con el aumento de las gotas de lípidos en células de Sertoli (Liu y col., 2012). Los autores especulan que esas gotas lipídicas provienen de la fagocitosis de las células germinales que han entrado en apoptosis por el aumento en la temperatura y le

atribuyen un rol importante en el almacenamiento de energía para la recuperación luego de la injuria. Nuestros resultados indican que en la célula de Sertoli, la activación de PPAR γ también sería un mecanismo que aumenta la expresión de diversas PLINs que podrían estar participando en la formación de las gotas de lípidos. La regulación de la expresión de PLINs por activación de PPAR γ sería un mecanismo fisiológico de la célula de Sertoli para el almacenamiento de energía para cubrir las demandas energéticas de su propio metabolismo.

Finalmente, decidimos analizar si la regulación de diversos genes implicados en la formación de gotas lipídicas por activación de PPAR γ culmina verdaderamente en la formación de gotas de lípidos. Para ello, se evaluó su presencia en las monocapas de células de Sertoli luego del tratamiento con RSG. El análisis microscópico demostró que la activación de PPAR γ aumenta el contenido de gotas de lípidos en la célula de Sertoli. Este contenido se correlaciona además con el aumento en la concentración de TAGs en las monocapas celulares. El aumento del almacenamiento de lípidos por activación de PPAR γ ha sido observado en otros tipos celulares tales como adipocitos, músculo esquelético y cardiomiocitos. En adipocitos, esta regulación es fundamental para evitar la formación de grasa ectópica en otros tejidos, la cual correlaciona con una resistencia a la insulina (Chao y col., 2000). En músculo, las gotas lipídicas son esenciales como fuente de sustratos energéticos durante el ejercicio (Walther y Farese, 2012). En corazón, se ha postulado que el aumento de gotas lipídicas estimulado por activación de PPAR γ protege a la célula cardíaca de la lipotoxicidad (Bosma y col., 2014). Como se mencionó en la introducción, se ha demostrado que la célula de Sertoli contiene abundantes gotas lipídicas. Además, se ha observado que las mismas varían con los estadios de la espermatogénesis, siendo máximas en los estadios post espermiación, cuando se produce la fagocitosis de los cuerpos residuales (Kerr y De Kretser, 1975). Estas variaciones se correlacionan con un aumento en los niveles de ATP por lo que se ha

postulado que estas gotas lipídicas son fuente de ácidos grasos para obtener energía (Xiong y col., 2009). Asimismo, se ha visto que las gotas lipídicas de la célula de Sertoli varían con el entorno hormonal (Ghosh y col., 1992). Todas estas evidencias permiten especular un rol fundamental de las gotas lipídicas en el funcionamiento testicular. En particular en la célula de Sertoli, la regulación de la formación de gotas lipídicas por activación de PPAR γ participaría en el mantenimiento del equilibrio energético del túbulo seminífero.

Como consecuencia del establecimiento de la barrera hemato-testicular, la célula de Sertoli crea el microambiente óptimo para el desarrollo de las células germinales que se encuentran en el compartimiento adluminal del tubo seminífero. Una de las funciones más importantes que cumple la célula de Sertoli para el mantenimiento de las células germinales es la provisión de nutrientes entre los que se encuentra el lactato. Cabe recordar que la célula de Sertoli metaboliza activamente la glucosa siendo la mayoría de este azúcar convertido a lactato y no oxidado vía el ciclo de Krebs (Robinson y Fritz, 1981). Por otra parte se sabe, por experimentos realizados *in vivo* e *in vitro*, que las células germinales utilizan lactato como fuente energética (Jutte y col., 1981; Courtens y Ploen, 1999). Estas observaciones llevaron a establecer el concepto de que uno de los papeles preponderantes de la célula de Sertoli es la producción de lactato (Boussouar y Benahmed, 2004). Considerando que esta función nutricional es fundamental para la espermatogénesis y que la activación de PPAR γ es capaz de regular distintos mecanismos relacionados con el metabolismo de los hidratos de carbono en distintos tejidos (Nielsen y col., 2008; Ahmadian y col., 2013), en la segunda parte de este trabajo nos propusimos evaluar la regulación por activación de PPAR γ de mecanismos que participan en el metabolismo glucolítico de la célula de Sertoli, en particular aquellos mecanismos involucrados en la producción de lactato.

Inicialmente evaluamos si la activación de PPAR γ regulaba el consumo de glucosa

en la célula de Sertoli. Observamos que el tratamiento con RSG aumentó el consumo de glucosa, resultados que sugieren que el PPAR γ está involucrado en el metabolismo de los hidratos de carbono en las células de Sertoli. Como se mencionó en la introducción, en nuestro laboratorio hemos analizado un conjunto de mecanismos moleculares utilizados por FSH, citoquinas y factores de crecimiento que participan en la regulación de la producción de lactato, metabolito final de la vía glucolítica en la célula de Sertoli (Riera y col., 2001; Riera y col., 2002; Riera y col., 2003; Galardo y col., 2008; Regueira y col., 2015). Entre ellos se encuentran: 1) la entrada de glucosa a la célula y la expresión de GLUT1, 2) la expresión de enzimas claves del flujo glucolítico, 3) la actividad del complejo piruvato deshidrogenasa (PDC) y la expresión de PDKs y PDPs que controlan la disponibilidad de piruvato y 4) la actividad LDH y los niveles de ARNm de LDH A que participan finalmente en la conversión de piruvato a lactato. Decidimos analizar entonces si alguno de los mecanismos conocidos del metabolismo de los hidratos de carbono de la célula de Sertoli podía estar regulado por activación de PPAR γ .

Con respecto a la entrada de glucosa a la célula, se ha observado que la activación del PPAR γ aumenta la entrada de glucosa en distintos tipos celulares, mecanismo que contribuye al efecto antidiabético de la RSG. Así, se demostró que la activación farmacológica de PPAR γ aumenta la entrada de glucosa en tejido adiposo debido a un aumento en la expresión de GLUT4 (Armoni y col., 2003), efecto que también se observa en células beta del páncreas por aumento en la expresión de GLUT2 (Kim y col., 2000). En este trabajo observamos que el tratamiento con RSG aumentó la incorporación de 2-DOG a la célula de Sertoli. La célula de Sertoli expresa GLUT1-4 y GLUT8 (Carosa y col., 2005; Angulo y col., 2008; Galardo y col., 2008). Estudios acerca de la regulación hormonal de la entrada de glucosa a la célula de Sertoli mostraron una correlación entre el aumento en la incorporación del azúcar y la expresión de GLUT1 (Galardo y col., 2007; 2008; 2010). Sin embargo en este trabajo no pudimos observar un aumento en la

expresión de GLUT1 en células de Sertoli tratadas con RSG. Considerando que el gen que codifica para GLUT2 tiene sitio PPRE (Im y col., 2005), decidimos evaluar si la activación de PPAR γ aumentaba la expresión del transportador. Observamos que RSG aumentó la expresión de GLUT2, lo que explicaría al menos en parte, el aumento en la incorporación de glucosa observado. Este aumento en la incorporación de glucosa contribuiría a una mayor disponibilidad de sustrato inicial para la vía glucolítica.

En relación a las enzimas que participan en la regulación del flujo glucolítico, se conoce que la PFK1 y la PK juegan un rol esencial. La primera reacción que verdaderamente compromete a la glucosa a su degradación por la vía glucolítica es la catalizada por la enzima fosfofructokinasa 1 (PFK1). Esta enzima está sujeta a una compleja regulación alostérica. Su actividad varía de acuerdo al estado energético celular: el ATP actúa como efector alostérico negativo, mientras que el AMP aumenta la actividad enzimática. El efector alostérico positivo más potente de PFK1 es la fructosa-2,6-bisfosfato (F2,6BP), cuyos niveles celulares correlacionan fuertemente con el flujo glucolítico (Hue y Rider, 1987). Los niveles de F2,6BP dependen de la actividad de enzimas que catalizan su síntesis y degradación, las PFKFBs de la cual se conocen cuatro isoformas (Rider y col., 2004; Mor y col., 2011). En particular, las células de Sertoli de rata expresan PFKFB1, PFKFB2 y PFKFB3 (Regueira y col., 2015). El gen que codifica para la PFKFB3 tiene un sitio PPRE y se ha demostrado que en una línea celular de adipocitos su expresión es estimulada por el tratamiento con agonistas farmacológicos de PPAR γ (Atsumi y col., 2005). Además se ha observado que la regulación de la expresión de PFKFB3 participa en el efecto antidiabético de las tiazolidonas (Guo y col., 2010). Evaluamos entonces si la activación de PPAR γ regulaba la expresión de PFKFB3, isoforma que posee baja actividad fructosa-2,6-bisfosfatasa y cuyos niveles de expresión correlacionaban con el flujo glucolítico. En células de Sertoli, no observamos regulación de la expresión de esta enzima por activación de PPAR γ . Sin embargo, conociendo que la

actividad de PFKFBs puede ser regulada por mecanismos distintos a la inducción génica, no se puede descartar una regulación de la actividad de PFKFB3 por activación de PPAR γ en células de Sertoli.

Por otro lado, la regulación de PK es otro de los mecanismos moleculares que controla el flujo glucolítico. Si bien se han descrito cuatro isoformas de la enzima, la actividad PK presente en testículos de rata es atribuible sólo a PKM2 (Imamura y Tanaka, 1972). Cabe mencionar que esta isoforma se encuentra asociada a LDH y otras enzimas de la vía glucolítica conformando el complejo enzimático glucolítico (Mazurek y col., 2002). Este hecho favorece que el piruvato, producto de la reacción catalizada por la PKM2, sea en su mayoría convertido a lactato. Se ha observado que PKM2 presenta un sitio PPRE en su promotor y que la activación de PPAR γ aumenta su expresión en células que tienen una vía glucolítica muy activa (Panasyuk y col., 2012). Por esta razón, decidimos evaluar la posible regulación de su expresión por activación de PPAR γ en células de Sertoli. En nuestras condiciones experimentales, no hemos observado un aumento en la expresión de PKM2 en respuesta al tratamiento con RSG. El hecho de no observar variaciones en la expresión de genes glucolíticos, como PFKFB3 y PKM2, por el tratamiento con RSG, no explica el aumento del consumo de glucosa observado en las mismas condiciones experimentales. En general, el consumo de glucosa puede ser debido a un aumento en la síntesis de glucógeno, un aumento en la vía de las pentosas o un aumento en el flujo glucolítico. Teniendo en cuenta que el flujo glucolítico es regulado por disponibilidad de sustrato así como también por modificaciones en las actividades enzimáticas que no involucran la expresión génica, es posible especular que en el estado metabólico que resulta de la activación de PPAR γ en la célula de Sertoli, se pondrían en juego mecanismos distintos a la inducción/represión de las enzimas glucolíticas que producen un aumento del consumo de glucosa y que podrían conducir a un incremento de la producción de lactato.

El piruvato obtenido de la glucólisis puede tener diferentes destinos, uno de los cuales es su entrada al ciclo de Krebs controlada por la actividad del complejo enzimático piruvato deshidrogenasa (PDC). La actividad del PDC es regulada por modificación covalente. La fosforilación del mismo es la encargada de suprimir su actividad. Por consiguiente, existe la posibilidad de que una mayor proporción de complejo fosforilado, y por lo tanto inactivo, se traduzca en una mayor disponibilidad de piruvato para ser derivado hacia otro destino, por ejemplo, ser reducido a lactato por acción de la enzima LDH. En el presente trabajo, observamos que tratamiento con RSG no modificó el estado de fosforilación del PDC. Curiosamente, en células de Sertoli, se había observado una correlación entre el aumento de la producción de lactato y el estado de fosforilación del PDC por activación de PPAR β/δ (Regueira y col., 2014). Respuestas diferenciales a la activación de los distintos PPARs se han observado en muchos casos. En este contexto, se observó que la activación de PPAR α y de PPAR γ regula la expresión de distintos grupos de genes lipolíticos y glucolíticos en células de tejido adiposo humano (Ribet y col., 2010). Estos efectos se pueden atribuir, entre otras causas, a una distinta afinidad de cada receptor por los PPRE, a un distinto contexto metabólico celular y/o al reclutamiento de distintos co-activadores (Ribet y col., 2010). En las células de Sertoli, la activación de PPAR γ , a diferencia de la activación de PPAR β/δ , no regularía la actividad del PDC evaluada por su estado de fosforilación.

La conversión de piruvato a lactato está catalizada por la enzima lactato deshidrogenasa (LDH). Se conocen seis isoenzimas que están formadas por distinta composición de tres subunidades. La LDH 5, que está formada por cuatro subunidades LDH A, presenta características cinéticas que favorecen la conversión de piruvato a lactato (Cahn y col., 1962; Pesce y col., 1964). En células de Sertoli, el aumento de la producción de lactato en respuesta a hormonas correlaciona con un incremento en la actividad LDH que es acompañado por un aumento en los niveles de ARNm de LDH A

(Nehar y col., 1997; Riera y col., 2001). Analizamos si este último paso de la glucólisis era regulado por activación de PPAR γ . El tratamiento con RSG, no modificó ni la actividad de LDH ni la expresión de LDH A. En este caso, al igual que lo observado para la activación de PPAR α y PPAR β/δ , este proceso no parece estar regulado por activación de PPARs en la célula de Sertoli.

Como se señaló en la introducción, la producción de lactato, metabolito final de la vía glucolítica en células de Sertoli, es regulada tanto por hormonas como por un conjunto de factores producidos localmente en el testículo. En este contexto cabe mencionar que se observó que dicha producción es estimulada por FSH (Mita y col., 1982), hormonas tiroideas (Palmero y col., 1995), prolactina (Scarabelli y col., 2003), factores de producción local tales como IGF-I, EGF, bFGF e interleuquina 1 β (Borland y col., 1984; Mallea y col., 1986; Oonk y col., 1989; Schteingart y col., 1999; Riera y col., 2001) y adenosina (Galardo y col., 2010). Más recientemente, hemos demostrado en nuestro laboratorio que la activación de PPAR β/δ , además de regular la oxidación de ácidos grasos, estimula la producción del lactato en células de Sertoli (Regueira y col., 2014). Consecuentemente decidimos analizar si la activación de PPAR γ conducía a un aumento en la producción del mencionado hidroxiaácido. Observamos que el tratamiento con RSG aumenta la producción de lactato por la célula de Sertoli. Este aumento por activación de PPAR γ puede ser explicado, al menos en parte, por la regulación de diversos mecanismos que resultan en un aumento en la disponibilidad de glucosa entre los que se encuentran un aumento en la entrada de glucosa a la célula y en la expresión de GLUT2. Dada la importancia del lactato como nutriente para las células germinales en desarrollo, la regulación de este proceso resulta fundamental para una espermatogénesis normal.

En su conjunto, los resultados presentados en este trabajo indican que el PPAR γ ocuparía un rol central en el metabolismo energético del túbulo seminífero. De esta manera, una situación fisiológica que resulte en la activación del PPAR γ promovería un

aumento en la síntesis de TAGs y su acumulación en las gotas lipídicas, asegurando una adecuada provisión de energía para la célula de Sertoli, y simultáneamente induciría un aumento en la producción de lactato, metabolito indispensable como fuente energética para las células germinales.

Enrico Sertoli (1865) realiza una descripción detallada de la célula que llevaría su nombre. Ciento cincuenta años más tarde nadie duda de la importancia fisiológica de estas células en el normal desarrollo de la espermatogénesis, sin embargo muchos de los mecanismos moleculares que operan para su adecuado funcionamiento son aún desconocidos. Este trabajo intenta ser un aporte más hacia la comprensión de los complejos mecanismos que intervienen en la regulación del metabolismo energético de la célula de Sertoli, fundamental para el adecuado desarrollo de las células germinales y, por lo tanto, de una espermatogénesis normal.

Conclusiones

Los resultados presentados en esta tesina demuestran que el PPAR γ participa en el mantenimiento de un adecuado equilibrio energético en la célula de Sertoli.

Por un lado, se demostró que la activación de PPAR γ promueve el almacenamiento de ácidos grasos como TAGs y la acumulación de los mismos en gotas de lípidos regulando la expresión de distintos genes tales como FAT/CD36, GPAT1, PLIN1, PLIN2 y PLIN3. Este almacenamiento de TAGs sería de gran importancia en la célula de Sertoli, que utiliza los ácidos grasos como principal fuente energética.

Por otro lado, se demostró que la activación de PPAR γ aumenta la producción de lactato regulando la entrada de glucosa a la célula y la expresión de GLUT2. Dada la importancia del lactato como nutriente para las células germinales, la regulación por PPAR γ de este proceso resultaría elemental para el mantenimiento de las células germinales en desarrollo.

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.

Bibliografía

- Ahmadian, M., Suh, J. M., Hah, N., Liddle, C., Atkins, A. R., Downes, M., y Evans, R. M. 2013. PPARgamma signaling and metabolism: the good, the bad and the future. *Nat Med* 19:557-566.
- Angulo, C., Castro, M. A., Rivas, C. I., Segretain, D., Maldonado, R., Yanez, A. J., Slebe, J. C., Vera, J. C., y Concha, II. 2008. Molecular identification and functional characterization of the vitamin C transporters expressed by Sertoli cells. *J Cell Physiol* 217:708-716.
- Arimura, N., Horiba, T., Imagawa, M., Shimizu, M., y Sato, R. 2004. The peroxisome proliferator-activated receptor gamma regulates expression of the perilipin gene in adipocytes. *J Biol Chem* 279:10070-10076.
- Armoni, M., Kritz, N., Harel, C., Bar-Yoseph, F., Chen, H., Quon, M. J., y Karnieli, E. 2003. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma represses GLUT4 promoter activity in primary adipocytes, and rosiglitazone alleviates this effect. *J Biol Chem* 278:30614-30623.
- Astakhova, A. A., Chistyakov, D. V., Pankevich, E. V., y Sergeeva, M. G. 2015. Regulation of cyclooxygenase 2 expression by agonists of PPAR nuclear receptors in the model of endotoxin tolerance in astrocytes. *Biochemistry (Mosc)* 80:1262-1270.
- Atsumi, T., Nishio, T., Niwa, H., Takeuchi, J., Bando, H., Shimizu, C., Yoshioka, N., Bucala, R., y Koike, T. 2005. Expression of inducible 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase/PFKFB3 isoforms in adipocytes and their potential role in glycolytic regulation. *Diabetes* 54:3349-3357.
- Beigneux, A. P., Vergnes, L., Qiao, X., Quatela, S., Davis, R., Watkins, S. M., Coleman, R. A., Walzem, R. L., Philips, M., Reue, K., y Young, S. G. 2006. Agpat6--a novel lipid biosynthetic gene required for triacylglycerol production in mammary epithelium. *J Lipid Res* 47:734-744.
- Bickel, P. E., Tansey, J. T., y Welte, M. A. 2009. PAT proteins, an ancient family of lipid droplet proteins that regulate cellular lipid stores. *Biochim Biophys Acta* 1791:419-440.
- Bindesboll, C., Berg, O., Arntsen, B., Nebb, H. I., y Dalen, K. T. 2013. Fatty acids regulate perilipin5 in muscle by activating PPARdelta. *J Lipid Res* 54:1949-1963.
- Bonofiglio, D., Santoro, A., Martello, E., Vizza, D., Rovito, D., Cappello, A. R., Barone, I., Giordano, C., Panza, S., Catalano, S., Iacobazzi, V., Dolce, V., y Ando, S. 2013. Mechanisms of divergent effects of activated peroxisome proliferator-activated receptor-gamma on mitochondrial citrate carrier expression in 3T3-L1 fibroblasts and mature adipocytes. *Biochim Biophys Acta* 1831:1027-1036.
- Borland, K., Mita, M., Oppenheimer, C. L., Blinderman, L. A., Massague, J., Hall, P. F., y Czech, M. P. 1984. The actions of insulin-like growth factors I and II on cultured Sertoli cells. *Endocrinology* 114:240-246.
- Bosma, M., Dapito, D. H., Drosatos-Tampakaki, Z., Huiping-Son, N., Huang, L. S., Kersten, S., Drosatos, K., y Goldberg, I. J. 2014. Sequestration of fatty acids in triglycerides prevents endoplasmic reticulum stress in an in vitro model of cardiomyocyte lipotoxicity. *Biochim Biophys Acta* 1841:1648-1655.
- Boussouar, F., y Benahmed, M. 2004. Lactate and energy metabolism in male germ cells. *Trends Endocrinol Metab* 15:345-350.
- Burkart, E. M., Sambandam, N., Han, X., Gross, R. W., Courtois, M., Gierasch, C. M., Shoghi, K., Welch, M. J., y Kelly, D. P. 2007. Nuclear receptors PPARbeta/delta and PPARalpha direct distinct metabolic regulatory programs in the mouse heart. *J Clin Invest* 117:3930-3939.

- Cahn, R. D., Zwilling, E., Kaplan, N. O., y 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.
- Cao, J., Li, J. L., Li, D., Tobin, J. F., y Gimeno, R. E. 2006. Molecular identification of microsomal acyl-CoA:glycerol-3-phosphate acyltransferase, a key enzyme in de novo triacylglycerol synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:19695-19700.
- Carosa, E., Radico, C., Giansante, N., Rossi, S., D'Adamo, F., Di Stasi, S. M., Lenzi, A., y Jannini, E. A. 2005. Ontogenetic profile and thyroid hormone regulation of type-1 and type-8 glucose transporters in rat Sertoli cells. *Int J Androl* 28:99-106.
- Cases, S., Smith, S. J., Zheng, Y. W., Myers, H. M., Lear, S. R., Sande, E., Novak, S., Collins, C., Welch, C. B., Lusic, A. J., Erickson, S. K., y Farese, R. V., Jr. 1998. Identification of a gene encoding an acyl CoA:diacylglycerol acyltransferase, a key enzyme in triacylglycerol synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:13018-13023.
- Cases, S., Stone, S. J., Zhou, P., Yen, E., Tow, B., Lardizabal, K. D., Voelker, T., y Farese, R. V., Jr. 2001. Cloning of DGAT2, a second mammalian diacylglycerol acyltransferase, and related family members. *J Biol Chem* 276:38870-38876.
- Cattaneo, E. R., Pellon-Maison, M., Rabassa, M. E., Lacunza, E., Coleman, R. A., y Gonzalez-Baro, M. R. 2012. Glycerol-3-phosphate acyltransferase-2 is expressed in spermatid germ cells and incorporates arachidonic acid into triacylglycerols. *PLoS One* 7:e42986.
- Coleman, J. D., Prabhu, K. S., Thompson, J. T., Reddy, P. S., Peters, J. M., Peterson, B. R., Reddy, C. C., y Vanden Heuvel, J. P. 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.
- Coleman, R. A., y Mashek, D. G. 2011. Mammalian triacylglycerol metabolism: synthesis, lipolysis, and signaling. *Chem Rev* 111:6359-6386.
- Corpeleijn, E., Pelsers, M. M., Soenen, S., Mensink, M., Bouwman, F. G., Kooi, M. E., Saris, W. H., Glatz, J. F., y Blaak, E. E. 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, J. L., y Ploen, L. 1999. Improvement of spermatogenesis in adult cryptorchid rat testis by intratesticular infusion of lactate. *Biol Reprod* 61:154-161.
- Chakravarthy, M. V., Lodhi, I. J., Yin, L., Malapaka, R. R., Xu, H. E., Turk, J., y Semenkovich, C. F. 2009. Identification of a physiologically relevant endogenous ligand for PPARalpha in liver. *Cell* 138:476-488.
- Chang, B. H., Li, L., Paul, A., Taniguchi, S., Nannegari, V., Heird, W. C., y Chan, L. 2006. Protection against fatty liver but normal adipogenesis in mice lacking adipose differentiation-related protein. *Mol Cell Biol* 26:1063-1076.
- Chao, L., Marcus-Samuels, B., Mason, M. M., Moitra, J., Vinson, C., Arioglu, E., Gavrilova, O., y Reitman, M. L. 2000. Adipose tissue is required for the antidiabetic, but not for the hypolipidemic, effect of thiazolidinediones. *J Clin Invest* 106:1221-1228.
- Chen, H. C., Jensen, D. R., Myers, H. M., Eckel, R. H., y Farese, R. V., Jr. 2003. Obesity resistance and enhanced glucose metabolism in mice transplanted with white adipose tissue lacking acyl CoA:diacylglycerol acyltransferase 1. *J Clin Invest* 111:1715-1722.
- Chen, J. K., y Heckert, L. L. 2001. Dmrt1 expression is regulated by follicle-stimulating hormone and phorbol esters in postnatal Sertoli cells. *Endocrinology* 142:1167-1178.
- Chomczynski, P., y Sacchi, N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156-159.

- Degrace-Passilly, P., y Besnard, P. 2012. CD36 and taste of fat. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 15:107-111.
- Devchand, P. R., Keller, H., Peters, J. M., Vazquez, M., Gonzalez, F. J., y Wahli, W. 1996. The PPAR α -leukotriene B4 pathway to inflammation control. *Nature* 384:39-43.
- Ducharme, N. A., y Bickel, P. E. 2008. Lipid droplets in lipogenesis and lipolysis. *Endocrinology* 149:942-949.
- Fajas, L., Auboeuf, D., Raspe, E., Schoonjans, K., Lefebvre, A. M., Saladin, R., Najib, J., Laville, M., Fruchart, J. C., Deeb, S., Vidal-Puig, A., Flier, J., Briggs, M. R., Staels, B., Vidal, H., y Auwerx, J. 1997. The organization, promoter analysis, and expression of the human PPAR γ gene. *J Biol Chem* 272:18779-18789.
- Fajas, L., Debril, M. B., y Auwerx, J. 2001. PPAR γ : an essential role in metabolic control. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 11:64-69.
- Fawcett, D. W., Neaves, W. B., y Flores, M. N. 1973. Comparative observations on intertubular lymphatics and the organization of the interstitial tissue of the mammalian testis. *Biol Reprod* 9:500-532.
- Festuccia, W. T., Blanchard, P. G., Turcotte, V., Laplante, M., Sariahmetoglu, M., Brindley, D. N., y Deshaies, Y. 2009a. Depot-specific effects of the PPAR γ agonist rosiglitazone on adipose tissue glucose uptake and metabolism. *J Lipid Res* 50:1185-1194.
- Festuccia, W. T., Blanchard, P. G., Turcotte, V., Laplante, M., Sariahmetoglu, M., Brindley, D. N., Richard, D., y Deshaies, Y. 2009b. The PPAR γ agonist rosiglitazone enhances rat brown adipose tissue lipogenesis from glucose without altering glucose uptake. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 296:R1327-1335.
- Forman, B. M., Tontonoz, P., Chen, J., Brun, R. P., Spiegelman, B. M., y Evans, R. M. 1995. 15-Deoxy- δ 12, 14-prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR γ . *Cell* 83:803-812.
- Forman, B. M., Chen, J., y Evans, R. M. 1997. Hypolipidemic drugs, polyunsaturated fatty acids, and eicosanoids are ligands for peroxisome proliferator-activated receptors α and δ . *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:4312-4317.
- Fritz, I. B., Rommerts, F. G., Louis, B. G., y Dorrington, J. H. 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.
- Fu, J., Gaetani, S., Oveisi, F., Lo Verme, J., Serrano, A., Rodriguez De Fonseca, F., Rosengarth, A., Luecke, H., Di Giacomo, B., Tarzia, G., y Piomelli, D. 2003. Oleyethanolamide regulates feeding and body weight through activation of the nuclear receptor PPAR- α . *Nature* 425:90-93.
- Galardo, M. N., Riera, M. F., Pellizzari, E. H., Cigorraga, S. B., y Meroni, S. B. 2007. The AMP-activated protein kinase activator, 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -D-ribose nucleoside, regulates lactate production in rat Sertoli cells. *J Mol Endocrinol* 39:279-288.
- Galardo, M. N., Riera, M. F., Pellizzari, E. H., Chemes, H. E., Venara, M. C., Cigorraga, S. B., y Meroni, S. B. 2008. Regulation of expression of Sertoli cell glucose transporters 1 and 3 by FSH, IL1 β , and bFGF at two different time-points in pubertal development. *Cell Tissue Res* 334:295-304.
- Galardo, M. N., Riera, M. F., Pellizzari, E. H., Sobarzo, C., Scarcelli, R., Denduchis, B., Lustig, L., Cigorraga, S. B., y Meroni, S. B. 2010. Adenosine regulates Sertoli cell function by activating AMPK. *Mol Cell Endocrinol* 330:49-58.
- Ghosh, S., Bartke, A., Grasso, P., Reichert, L. E., Jr., y Russell, L. D. 1992. Structural manifestations of the rat Sertoli cell to hypophysectomy: a correlative morphometric and endocrine study. *Endocrinology* 131:485-497.

- Gillot, I., Jehl-Pietri, C., Gounon, P., Luquet, S., Rassoulzadegan, M., Grimaldi, P., y Vidal, F. 2005. Germ cells and fatty acids induce translocation of CD36 scavenger receptor to the plasma membrane of Sertoli cells. *J Cell Sci* 118:3027-3035.
- Glatz, J. F., Luiken, J. J., y Bonen, A. 2010. Membrane fatty acid transporters as regulators of lipid metabolism: implications for metabolic disease. *Physiol Rev* 90:367-417.
- Gnessi, L., Fabbri, A., y 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* 18:541-609.
- Gonzalez-Baro, M. R., Lewin, T. M., y Coleman, R. A. 2007. Regulation of Triglyceride Metabolism. II. Function of mitochondrial GPAT1 in the regulation of triacylglycerol biosynthesis and insulin action. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 292:G1195-1199.
- Grasselli, E., Voci, A., Pesce, C., Canesi, L., Fugassa, E., Gallo, G., y Vergani, L. 2010. PAT protein mRNA expression in primary rat hepatocytes: Effects of exposure to fatty acids. *Int J Mol Med* 25:505-512.
- Grimaldi, P., Di Giacomo, D., y Geremia, R. 2013. The endocannabinoid system and spermatogenesis. *Front Endocrinol (Lausanne)* 4:192.
- Griswold, M. D. 1988. Protein secretions of Sertoli cells. *Int Rev Cytol* 110:133-156.
- Grønning, L. M., Dahle, M. K., Tasken, K. A., Enerback, S., Hedin, L., Tasken, K., y Knutsen, H. K. 1999. Isoform-specific regulation of the CCAAT/enhancer-binding protein family of transcription factors by 3',5'-cyclic adenosine monophosphate in Sertoli cells. *Endocrinology* 140:835-843.
- Grootegoed, J. A., Oonk, R. B., Jansen, R., y van der Molen, H. J. 1986. Metabolism of radiolabelled energy-yielding substrates by rat Sertoli cells. *J Reprod Fertil* 77:109-118.
- Guan, H. P., Ishizuka, T., Chui, P. C., Lehrke, M., y Lazar, M. A. 2005. Corepressors selectively control the transcriptional activity of PPARgamma in adipocytes. *Genes Dev* 19:453-461.
- Gulick, T., Cresci, S., Caira, T., Moore, D. D., y Kelly, D. P. 1994. The peroxisome proliferator-activated receptor regulates mitochondrial fatty acid oxidative enzyme gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:11012-11016.
- Guo, X., Xu, K., Zhang, J., Li, H., Zhang, W., Wang, H., Lange, A. J., Chen, Y. E., Huo, Y., y Wu, C. 2010. Involvement of inducible 6-phosphofructo-2-kinase in the anti-diabetic effect of peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation in mice. *J Biol Chem* 285:23711-23720.
- Haakonsson, A. K., Stahl Madsen, M., Nielsen, R., Sandelin, A., y Mandrup, S. 2013. Acute genome-wide effects of rosiglitazone on PPARgamma transcriptional networks in adipocytes. *Mol Endocrinol* 27:1536-1549.
- Hammond, L. E., Neschen, S., Romanelli, A. J., Cline, G. W., Ilkayeva, O. R., Shulman, G. I., Muoio, D. M., y Coleman, R. A. 2005. Mitochondrial glycerol-3-phosphate acyltransferase-1 is essential in liver for the metabolism of excess acyl-CoAs. *J Biol Chem* 280:25629-25636.
- Hara, T., Kashihara, D., Ichimura, A., Kimura, I., Tsujimoto, G., y Hirasawa, A. 2014. Role of free fatty acid receptors in the regulation of energy metabolism. *Biochim Biophys Acta* 1841:1292-1300.
- Hsieh, K., Lee, Y. K., Londos, C., Raaka, B. M., Dalen, K. T., y Kimmel, A. R. 2012. Perilipin family members preferentially sequester to either triacylglycerol-specific or cholesteryl-ester-specific intracellular lipid storage droplets. *J Cell Sci* 125:4067-4076.
- Hue, L., y Rider, M. H. 1987. Role of fructose 2,6-bisphosphate in the control of glycolysis in mammalian tissues. *Biochem J* 245:313-324.

- Im, S. S., Kim, J. W., Kim, T. H., Song, X. L., Kim, S. Y., Kim, H. I., y Ahn, Y. H. 2005. Identification and characterization of peroxisome proliferator response element in the mouse GLUT2 promoter. *Exp Mol Med* 37:101-110.
- Imamura, K., y Tanaka, T. 1972. Multimolecular forms of pyruvate kinase from rat and other mammalian tissues. I. Electrophoretic studies. *J Biochem* 71:1043-1051.
- Jeninga, E. H., Bugge, A., Nielsen, R., Kersten, S., Hamers, N., Dani, C., Wabitsch, M., Berger, R., Stunnenberg, H. G., Mandrup, S., y Kalkhoven, E. 2009. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma regulates expression of the anti-lipolytic G-protein-coupled receptor 81 (GPR81/Gpr81). *J Biol Chem* 284:26385-26393.
- Jutte, N. H., Grootegoed, J. A., Rommerts, F. F., y van der Molen, H. J. 1981. Exogenous lactate is essential for metabolic activities in isolated rat spermatocytes and spermatids. *J Reprod Fertil* 62:399-405.
- Jutte, N. H., Eikvar, L., Levy, F. O., y Hansson, V. 1985. Metabolism of palmitate in cultured rat Sertoli cells. *J Reprod Fertil* 73:497-503.
- Katz, A. M., y Messineo, F. C. 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., y Nakanishi, Y. 2002. Phosphatidylserine binding of class B scavenger receptor type I, a phagocytosis receptor of testicular sertoli cells. *J Biol Chem* 277:27559-27566.
- Kazantzis, M., y Stahl, A. 2012. Fatty acid transport proteins, implications in physiology and disease. *Biochim Biophys Acta* 1821:852-857.
- Kerr, J. B., y de Kretser, D. M. 1974. Proceedings: The role of the Sertoli cell in phagocytosis of the residual bodies of spermatids. *J Reprod Fertil* 36:439-440.
- Kerr, J. B., y De Kretser, D. M. 1975. Cyclic variations in Sertoli cell lipid content throughout the spermatogenic cycle in the rat. *J Reprod Fertil* 43:1-8.
- Kim, H. I., Kim, J. W., Kim, S. H., Cha, J. Y., Kim, K. S., y Ahn, Y. H. 2000. Identification and functional characterization of the peroxisomal proliferator response element in rat GLUT2 promoter. *Diabetes* 49:1517-1524.
- Kim, H. J., Jung, T. W., Kang, E. S., Kim, D. J., Ahn, C. W., Lee, K. W., Lee, H. C., y Cha, B. S. 2007. Depot-specific regulation of perilipin by rosiglitazone in a diabetic animal model. *Metabolism* 56:676-685.
- Krogdams, A. M., Nielsen, C. A., Neve, S., Holst, D., Helledie, T., Thomsen, B., Bendixen, C., Mandrup, S., y Kristiansen, K. 2002. Nuclear receptor corepressor-dependent repression of peroxisome-proliferator-activated receptor delta-mediated transactivation. *Biochem J* 363:157-165.
- Kuroda, T., Lee, M. M., Haqq, C. M., Powell, D. M., Manganaro, T. F., y Donahoe, P. K. 1990. Mullerian inhibiting substance ontogeny and its modulation by follicle-stimulating hormone in the rat testes. *Endocrinology* 127:1825-1832.
- Labarca, C., y Paigen, K. 1980. A simple, rapid, and sensitive DNA assay procedure. *Anal Biochem* 102:344-352.
- Lacroix, M., y Fritz, I. B. 1982. The control of the synthesis and secretion of plasminogen activator by rat sertoli cells in culture. *Mol Cell Endocrinol* 26:247-258.
- Lee, C. H., Kang, K., Mehl, I. R., Nofsinger, R., Alaynick, W. A., Chong, L. W., Rosenfeld, J. M., y Evans, R. M. 2006. Peroxisome proliferator-activated receptor delta promotes very low-density lipoprotein-derived fatty acid catabolism in the macrophage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:2434-2439.
- Lehrke, M., y Lazar, M. A. 2005. The many faces of PPARgamma. *Cell* 123:993-999.
- Lewin, T. M., Granger, D. A., Kim, J. H., y Coleman, R. A. 2001. Regulation of mitochondrial sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase activity: response to feeding status is unique in various rat tissues and is discordant with protein expression. *Arch Biochem Biophys* 396:119-127.

- Lewin, T. M., Schwerbrock, N. M., Lee, D. P., y Coleman, R. A. 2004. Identification of a new glycerol-3-phosphate acyltransferase isoenzyme, mtGPAT2, in mitochondria. *J Biol Chem* 279:13488-13495.
- Lim, H. J., Moon, I., y Han, K. 2004. Transcriptional cofactors exhibit differential preference toward peroxisome proliferator-activated receptors alpha and delta in uterine cells. *Endocrinology* 145:2886-2895.
- Liu, M., Qi, L., Zeng, Y., Yang, Y., Bi, Y., Shi, X., Zhu, H., Zhou, Z., y Sha, J. 2012. Transient scrotal hyperthermia induces lipid droplet accumulation and reveals a different ADFP expression pattern between the testes and liver in mice. *PLoS One* 7:e45694.
- Livera, G., Rouiller-Fabre, V., Pairault, C., Levacher, C., y Habert, R. 2002. Regulation and perturbation of testicular functions by vitamin A. *Reproduction* 124:173-180.
- Louis, B. G., y Fritz, I. B. 1979. Follicle-stimulating hormone and testosterone independently increase the production of androgen-binding protein by Sertoli cells in culture. *Endocrinology* 104:454-461.
- Lowell, B. B. 1999. PPARgamma: an essential regulator of adipogenesis and modulator of fat cell function. *Cell* 99:239-242.
- Lui, W. Y., Mruk, D., Lee, W. M., y Cheng, C. Y. 2003. Sertoli cell tight junction dynamics: their regulation during spermatogenesis. *Biol Reprod* 68:1087-1097.
- Mallea, L. E., Machado, A. J., Navaroli, F., y Rommerts, F. F. 1986. Epidermal growth factor stimulates lactate production and inhibits aromatization in cultured Sertoli cells from immature rats. *Int J Androl* 9:201-208.
- Mandard, S., Muller, M., y Kersten, S. 2004. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha target genes. *Cell Mol Life Sci* 61:393-416.
- Markert, C. L., Shaklee, J. B., y Whitt, G. S. 1975. Evolution of a gene. Multiple genes for LDH isozymes provide a model of the evolution of gene structure, function and regulation. *Science* 189:102-114.
- Martinez-Botas, J., Anderson, J. B., Tessier, D., Lapillonne, A., Chang, B. H., Quast, M. J., Gorenstein, D., Chen, K. H., y Chan, L. 2000. Absence of perilipin results in leanness and reverses obesity in *Lepr*(db/db) mice. *Nat Genet* 26:474-479.
- Matzkin, M. E., Pellizzari, E. H., Rossi, S. P., Calandra, R. S., Cigorruga, S. B., y Frungieri, M. B. 2012. Exploring the cyclooxygenase 2 (COX2)/15d-Delta(12,14)PGJ(2) system in hamster Sertoli cells: regulation by FSH/testosterone and relevance to glucose uptake. *Gen Comp Endocrinol* 179:254-264.
- Mazurek, S., Grimm, H., Boschek, C. B., Vaupel, P., y Eigenbrodt, E. 2002. Pyruvate kinase type M2: a crossroad in the tumor metabolome. *Br J Nutr* 87 Suppl 1:S23-29.
- Meldrum, E., Parker, P. J., y Carozzi, A. 1991. The PtdIns-PLC superfamily and signal transduction. *Biochim Biophys Acta* 1092:49-71.
- Meroni, S. B., Canepa, D. F., Pellizzari, E. H., Schteingart, H. F., y Cigorruga, S. B. 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, S. B., Riera, M. F., Pellizzari, E. H., y Cigorruga, S. B. 2002. Regulation of rat Sertoli cell function by FSH: possible role of phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway. *J Endocrinol* 174:195-204.
- Mita, M., Price, J. M., y Hall, P. F. 1982. Stimulation by follicle-stimulating hormone of synthesis of lactate by Sertoli cells from rat testis. *Endocrinology* 110:1535-1541.
- Mor, I., Cheung, E. C., y Vousden, K. H. 2011. Control of glycolysis through regulation of PFK1: old friends and recent additions. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 76:211-216.

- Motojima, K., Passilly, P., Peters, J. M., Gonzalez, F. J., y 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* 273:16710-16714.
- Mruk, D. D., y Cheng, C. Y. 2004. Sertoli-Sertoli and Sertoli-germ cell interactions and their significance in germ cell movement in the seminiferous epithelium during spermatogenesis. *Endocr Rev* 25:747-806.
- Mullaney, B. P., y Skinner, M. K. 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, D. M., MacLean, P. S., Lang, D. B., Li, S., Houmard, J. A., Way, J. M., Winegar, D. A., Corton, J. C., Dohm, G. L., y Kraus, W. E. 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* 277:26089-26097.
- Naruhn, S., Meissner, W., Adhikary, T., Kaddatz, K., Klein, T., Watzer, B., Muller-Brusselbach, S., y Muller, R. 2010. 15-hydroxyeicosatetraenoic acid is a preferential peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta agonist. *Mol Pharmacol* 77:171-184.
- Naville, D., Chatelain, P. G., Avallet, O., y Saez, J. M. 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, J. G., y Grimaldi, P. A. 2014. Physiological functions of peroxisome proliferator-activated receptor beta. *Physiol Rev* 94:795-858.
- Nehar, D., Mauduit, C., Boussouar, F., y 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* 138:1964-1971.
- Nielsen, R., Pedersen, T. A., Hagenbeek, D., Moulos, P., Siersbaek, R., Megens, E., Denissov, S., Borgesen, M., Francoijs, K. J., Mandrup, S., y Stunnenberg, H. G. 2008. Genome-wide profiling of PPARgamma:RXR and RNA polymerase II occupancy reveals temporal activation of distinct metabolic pathways and changes in RXR dimer composition during adipogenesis. *Genes Dev* 22:2953-2967.
- Okumura, T. 2011. Role of lipid droplet proteins in liver steatosis. *J Physiol Biochem* 67:629-636.
- Oonk, R. B., Jansen, R., y Grootegoed, J. A. 1989. Differential effects of follicle-stimulating hormone, insulin, and insulin-like growth factor I on hexose uptake and lactate production by rat Sertoli cells. *J Cell Physiol* 139:210-218.
- Oresti, G. M., Garcia-Lopez, J., Avelano, M. I., y 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* 146:471-480.
- Orth, J. M. 1982. Proliferation of Sertoli cells in fetal and postnatal rats: a quantitative autoradiographic study. *Anat Rec* 203:485-492.
- Orth, J. M. 1984. The role of follicle-stimulating hormone in controlling Sertoli cell proliferation in testes of fetal rats. *Endocrinology* 115:1248-1255.
- Palmero, S., Prati, M., Bolla, F., y Fugassa, E. 1995. Tri-iodothyronine directly affects rat Sertoli cell proliferation and differentiation. *J Endocrinol* 145:355-362.
- Panasyuk, G., Espeillac, C., Chauvin, C., Pradelli, L. A., Horie, Y., Suzuki, A., Annicotte, J. S., Fajas, L., Foretz, M., Verdeguer, F., Pontoglio, M., Ferre, P., Scoazec, J. Y., Birnbaum, M. J., Ricci, J. E., y Pende, M. 2012. PPARgamma contributes to PKM2 and HK2 expression in fatty liver. *Nat Commun* 3:672.

- Pesce, A., McKay, R. H., Stolzenbach, F., Cahn, R. D., y Kaplan, N. O. 1964. The Comparative Enzymology of Lactic Dehydrogenases. I. Properties of the Crystalline Beef and Chicken Enzymes. *J Biol Chem* 239:1753-1761.
- Picard, F., y Auwerx, J. 2002. PPAR(gamma) and glucose homeostasis. *Annu Rev Nutr* 22:167-197.
- Qiu, Q., Liu, G., Li, W., Shi, Q., Zhu, F., y Lu, G. 2009. Glycerol-3-phosphate acyltransferase 4 gene is involved in mouse spermatogenesis. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 41:668-676.
- Ranganathan, G., Unal, R., Pokrovskaya, I., Yao-Borengasser, A., Phanavanh, B., Lecka-Czernik, B., Rasouli, N., y Kern, P. A. 2006. The lipogenic enzymes DGAT1, FAS, and LPL in adipose tissue: effects of obesity, insulin resistance, and TZD treatment. *J Lipid Res* 47:2444-2450.
- Regueira, M., Riera, M. F., Galardo, M. N., Pellizzari, E. H., Cigorruga, S. B., y Meroni, S. B. 2014. Activation of PPAR alpha and PPAR beta/delta regulates Sertoli cell metabolism. *Mol Cell Endocrinol* 382:271-281.
- Regueira, M., Artagaveytia, S. L., Galardo, M. N., Pellizzari, E. H., Cigorruga, S. B., Meroni, S. B., y Riera, M. F. 2015. Novel molecular mechanisms involved in hormonal regulation of lactate production in Sertoli cells. *Reproduction* 150:311-321.
- Rey, R. A., Musse, M., Venara, M., y Chemes, H. E. 2009. Ontogeny of the androgen receptor expression in the fetal and postnatal testis: its relevance on Sertoli cell maturation and the onset of adult spermatogenesis. *Microsc Res Tech* 72:787-795.
- Riahi, Y., Sin-Malia, Y., Cohen, G., Alpert, E., Gruzman, A., Eckel, J., Staels, B., Guichardant, M., y 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.
- Ribet, C., Montastier, E., Valle, C., Bezaire, V., Mazzucotelli, A., Mairal, A., Viguerie, N., y Langin, D. 2010. Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha control of lipid and glucose metabolism in human white adipocytes. *Endocrinology* 151:123-133.
- Rider, M. H., Bertrand, L., Vertommen, D., Michels, P. A., Rousseau, G. G., y Hue, L. 2004. 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase: head-to-head with a bifunctional enzyme that controls glycolysis. *Biochem J* 381:561-579.
- Riera, M. F., Meroni, S. B., Gomez, G. E., Schteingart, H. F., Pellizzari, E. H., y Cigorruga, S. B. 2001. Regulation of lactate production by FSH, iL1beta, and TNFalpha in rat Sertoli cells. *Gen Comp Endocrinol* 122:88-97.
- Riera, M. F., Meroni, S. B., Schteingart, H. F., Pellizzari, E. H., y Cigorruga, S. B. 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.
- Riera, M. F., Meroni, S. B., Pellizzari, E. H., y Cigorruga, S. B. 2003. Assessment of the roles of mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathways in the basic fibroblast growth factor regulation of Sertoli cell function. *J Mol Endocrinol* 31:279-289.
- Riera, M. F., Galardo, M. N., Pellizzari, E. H., Meroni, S. B., y Cigorruga, S. B. 2009. Molecular mechanisms involved in Sertoli cell adaptation to glucose deprivation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 297:E907-914.
- Robinson, R., y Fritz, I. B. 1981. Metabolism of glucose by Sertoli cells in culture. *Biol Reprod* 24:1032-1041.
- Russell, L. 1977. Observations on rat Sertoli ectoplasmic ('junctional') specializations in their association with germ cells of the rat testis. *Tissue Cell* 9:475-498.

- Sanborn, B. M., Elkington, J. S., Steinberger, A., y Steinberger, E. 1975. Androgen binding in the testis: in vitro production of androgen binding protein (ABP) by Sertoli cell cultures and measurement of nuclear bound androgen by a nuclear exchange assay. *Curr Top Mol Endocrinol* 2:293-309.
- Scarabelli, L., Caviglia, D., Bottazzi, C., y Palmero, S. 2003. Prolactin effect on pre-pubertal Sertoli cell proliferation and metabolism. *J Endocrinol Invest* 26:718-722.
- Schteingart, H. F., Rivarola, M. A., y Cigorruga, S. B. 1989. Hormonal and paracrine regulation of gamma-glutamyl transpeptidase in rat Sertoli cells. *Mol Cell Endocrinol* 67:73-80.
- Schteingart, H. F., Meroni, S. B., Canepa, D. F., Pellizzari, E. H., y Cigorruga, S. B. 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.
- Sertoli, E. 1865. Dell'esistenza di particolari cellule ramificate nei canalicoli seminiferi del testicolo umano. *Il Morgagni* 7:31-39.
- Seth, A., Steel, J. H., Nichol, D., Pocock, V., Kumaran, M. K., Fritah, A., Mobberley, M., Ryder, T. A., Rowlerson, A., Scott, J., Poutanen, M., White, R., y Parker, M. 2007. The transcriptional corepressor RIP140 regulates oxidative metabolism in skeletal muscle. *Cell Metab* 6:236-245.
- Shi, Y., y Cheng, D. 2009. Beyond triglyceride synthesis: the dynamic functional roles of MGAT and DGAT enzymes in energy metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 297:E10-18.
- Shiratsuchi, A., Kawasaki, Y., Ikemoto, M., Arai, H., y 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, R. L., y Febbraio, M. 2009. CD36, a scavenger receptor involved in immunity, metabolism, angiogenesis, and behavior. *Sci Signal* 2:re3.
- Simoni, M., Gromoll, J., y Nieschlag, E. 1997. The follicle-stimulating hormone receptor: biochemistry, molecular biology, physiology, and pathophysiology. *Endocr Rev* 18:739-773.
- Skinner, M. K., y Griswold, M. D. 1980. Sertoli cells synthesize and secrete transferrin-like protein. *J Biol Chem* 255:9523-9525.
- Skinner, M. K., y Griswold, M. D. 1982. Secretion of testicular transferrin by cultured Sertoli cells is regulated by hormones and retinoids. *Biol Reprod* 27:211-221.
- Spiegelman, B. M. 1998. PPAR-gamma: adipogenic regulator and thiazolidinedione receptor. *Diabetes* 47:507-514.
- Stone, S. J., Myers, H. M., Watkins, S. M., Brown, B. E., Feingold, K. R., Elias, P. M., y Farese, R. V., Jr. 2004. Lipopenia and skin barrier abnormalities in DGAT2-deficient mice. *J Biol Chem* 279:11767-11776.
- Storch, J., y Corsico, B. 2008. The emerging functions and mechanisms of mammalian fatty acid-binding proteins. *Annu Rev Nutr* 28:73-95.
- Sylvester, S. R., y Griswold, M. D. 1994. The testicular iron shuttle: a "nurse" function of the Sertoli cells. *J Androl* 15:381-385.
- Tadokoro, Y., Yomogida, K., Ohta, H., Tohda, A., y Nishimune, Y. 2002. Homeostatic regulation of germinal stem cell proliferation by the GDNF/FSH pathway. *Mech Dev* 113:29-39.
- Takeuchi, K., y Reue, K. 2009. Biochemistry, physiology, and genetics of GPAT, AGPAT, and lipin enzymes in triglyceride synthesis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 296:E1195-1209.
- Teboul, L., Febbraio, M., Gaillard, D., Amri, E. Z., Silverstein, R., y Grimaldi, P. A. 2001. Structural and functional characterization of the mouse fatty acid translocase promoter: activation during adipose differentiation. *Biochem J* 360:305-312.

- Thomas, K., Sung, D. Y., Chen, X., Thompson, W., Chen, Y. E., McCarrey, J., Walker, W., y Griswold, M. 2011. Developmental patterns of PPAR and RXR gene expression during spermatogenesis. *Front Biosci (Elite Ed)* 3:1209-1220.
- Toebosch, A. M., Robertson, D. M., Klaij, I. A., de Jong, F. H., y Grootegoed, J. A. 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.
- Tontonoz, P., Hu, E., y Spiegelman, B. M. 1995. Regulation of adipocyte gene expression and differentiation by peroxisome proliferator activated receptor gamma. *Curr Opin Genet Dev* 5:571-576.
- Vogl, A. W., Vaid, K. S., y Guttman, J. A. 2008. The Sertoli cell cytoskeleton. *Adv Exp Med Biol* 636:186-211.
- Walczak, R., y Tontonoz, P. 2002. PPARadigms and PPARadoxes: expanding roles for PPARgamma in the control of lipid metabolism. *J Lipid Res* 43:177-186.
- Walther, T. C., y Farese, R. V., Jr. 2012. Lipid droplets and cellular lipid metabolism. *Annu Rev Biochem* 81:687-714.
- Wang, H., Xiong, W., Chen, Y., Ma, Q., Ma, J., Ge, Y., 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* 132:485-492.
- Wang, Y., Sternfeld, L., Yang, F., Rodriguez, J. A., Ross, C., Hayden, M. R., Carriere, F., Liu, G., Hofer, W., y 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, Y. X., Lee, C. H., Tiep, S., Yu, R. T., Ham, J., Kang, H., y Evans, R. M. 2003. Peroxisome-proliferator-activated receptor delta activates fat metabolism to prevent obesity. *Cell* 113:159-170.
- Wendel, A. A., Lewin, T. M., y Coleman, R. A. 2009. Glycerol-3-phosphate acyltransferases: rate limiting enzymes of triacylglycerol biosynthesis. *Biochim Biophys Acta* 1791:501-506.
- Wilfling, F., Haas, J. T., Walther, T. C., y Farese, R. V., Jr. 2014. Lipid droplet biogenesis. *Curr Opin Cell Biol* 29:39-45.
- Wolins, N. E., Rubin, B., y Brasaemle, D. L. 2001. TIP47 associates with lipid droplets. *J Biol Chem* 276:5101-5108.
- Wolins, N. E., Skinner, J. R., Schoenfish, M. J., Tzekov, A., Bensch, K. G., y Bickel, P. E. 2003. Adipocyte protein S3-12 coats nascent lipid droplets. *J Biol Chem* 278:37713-37721.
- Wolins, N. E., Brasaemle, D. L., y Bickel, P. E. 2006. A proposed model of fat packaging by exchangeable lipid droplet proteins. *FEBS Lett* 580:5484-5491.
- Wright, W. W., Musto, N. A., Mather, J. P., y Bardin, C. W. 1981. Sertoli cells secrete both testis-specific and serum proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78:7565-7569.
- Xiong, W., Wang, H., Wu, H., Chen, Y., y Han, D. 2009. Apoptotic spermatogenic cells can be energy sources for Sertoli cells. *Reproduction* 137:469-479.
- Xu, H. E., Lambert, M. H., Montana, V. G., Parks, D. J., Blanchard, S. G., Brown, P. J., Sternbach, D. D., Lehmann, J. M., Wisely, G. B., Willson, T. M., Kliewer, S. A., y Milburn, M. V. 1999. Molecular recognition of fatty acids by peroxisome proliferator-activated receptors. *Mol Cell* 3:397-403.
- Zanatta, L., Zamoner, A., Zanatta, A. P., Bouraima-Lelong, H., Delalande, C., Bois, C., Carreau, S., y Silva, F. R. 2011. Nongenomic and genomic effects of 1alpha,25(OH)₂ vitamin D₃ in rat testis. *Life Sci* 89:515-523.
- Zhang, Z., Wu, A. Z., Feng, Z. M., Mruk, D., Cheng, C. Y., y Chen, C. L. 2002. Gonadotropins, via cAMP, negatively regulate GATA-1 gene expression in testicular cells. *Endocrinology* 143:829-836.