



Universidad Austral de Chile

Facultad de Ciencias

Profesor Patrocinante

Dra. Ilona I. Concha

Instituto de Bioquímica y Microbiología
Facultad de Ciencias

Profesor Co-Patrocinante

Dr. Juan Carlos Slebe

Instituto de Bioquímica y Microbiología
Facultad de Ciencias

**ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE ENZIMAS QUE PARTICIPAN
EN LA SÍNTESIS DE GLUCÓGENO EN CÉLULAS DE SERTOLI:
GLUCÓGENO SINTASA Y FRUCTOSA-1,6-BISFOSFATASA**

Tesis de Grado presentada como parte
de los requisitos para optar al grado de
Licenciado en Bioquímica y Título
Profesional de *Bioquímico*

CRISTIAN IGNACIO TORRES ALARCÓN

VALDIVIA – CHILE

2012

Agradecimientos

Quisiera comenzar con mis padres, Patricio y María Soledad, y mis hermanos por su apoyo incondicional durante toda mi vida, por estar conmigo en los buenos y los malos momentos, a ellos les digo muchas gracias por estar en mi vida.

Agradecer a mi profesora, la Dra. Ilona Concha por su amabilidad y confianza, por dejarme ser parte del laboratorio de Metabolismo Molecular y a los Drs. Juan Carlos Slebe y Maite Castro por ser grandes personas y siempre estar dispuestos a compartir sus conocimientos conmigo.

A Franz, Rodrigo, Héctor, Aníbal, quienes me ayudaron a adquirir los conocimientos necesarios dentro del laboratorio, siempre dispuestos a ayudarme con lo que fuera necesario, a Josselyne, María Paz, Noemí, que me levantaron el ánimo más de una vez y me dijeron lo que debía escuchar, a la gente de Vit-C, AMZ y otros, a mis amigos en general, que me hicieron reír o me escucharon cuando era necesario, y me ayudaron a seguir, a la gente de Capoeira, con los que me relajaba y reía. También quiero agradecer a ti, que llegaste sin yo esperarlo en un no muy buen momento de mi vida, y seguro sin que lo supieras, la arreglaste mucho. Gracias, Gracias a todos.

También me gustaría agradecer al financiamiento que hizo posible esta tesis, los proyectos **FONDECYT 1090740 y 1110508, DID-UACH.**

Índice

1. Resumen	1
1.1 Summary	2
2. Introducción	3
3. Material y Métodos	17
3.1 Materiales	17
3.2 Material biológico	18
3.3 Instrumentos	19
3.4 Métodos	19
3.4.1 Cultivo de células de Sertoli 42GPA9	19
3.4.2 Extracción RNA	20
3.4.3 Reacción en cadena de polimerasa acoplada a transcripción reversa	21
3.4.4 PCR tiempo real	22
3.4.5 Ensayos de actividad	23
3.4.6 Inmunohistoquímica cromógena	24
3.4.7 Inmunocitoquímica	25
3.4.8 Extracción y cuantificación de proteínas totales	26
3.4.9 Separación electroforética de proteínas	27
3.4.10 Transferencia de proteínas a membranas de PVDF	28
3.4.11 Análisis de Western Blot	28

4. Resultados	29
4.1 Determinación de las isoformas de Glucógeno Sintasa y Fructosa 1-6 Bisfosfatasa presentes en células de Sertoli 42GPA9	29
4.2 Efecto de la concentración de glucosa en el medio de cultivo sobre la localización subcelular de MGS en célula de Sertoli 42GPA9	44
4.3 Efecto del factor de crecimiento tipo insulina 1 (IGF-1) en la localización subcelular de MGS en célula de Sertoli 42GPA9.	48
4.4 Efecto del ión litio sobre la localización subcelular de MGS	50
5. Discusión	52
6. Bibliografía	57

Índice de Figuras

Figura 1. Epitelio seminífero.	4
Figura 2. Síntesis de glucógeno a partir de Glucosa 6 Fosfato (G6P).	9
Figura 3. Procedencia de la G6P necesaria para la síntesis de glucógeno.	12
Figura 4. Expresión de Glucógeno Sintasa y Fructosa-1,6-Bisfosfatasa en testículo de ratón y en línea celular de Sertoli 42GPA9.	31
Figura 5. Detección de FBPasa hepática en cortes de testículo de ratón de diferentes edades de desarrollo post-natal.	34
Figura 6. Expresión raltiva de FBPasa hepática en testiculos de ratones de diferentes edades postnatal.	37
Figura 7. Actividad FBPasa en células de Sertoli 42GPA9.	38
Figura 8. Detección de GS de músculo esqueléticoen cortes de testiculo de ratón de diferentes edades de desarrollo post-natal.	40
Figura 9. Expresión relativa de MGS en testículos de ratones de diferentes edades de desarrollo post-natal.	43
Figura 10. Inmunodetección de glucógeno y MGS en células de Sertoli cultivadas sin o con baja glucosa.	45
Figura 11. Inmulocalización de MGS en células de Sertoli 42GPA9 tratadas sin glucosa o con alta glucosa.	47

Figura 12. Inmunolocalización de MGS en células de Sertoli 42GPA9 tratadas con IGF-1 49

Figura 13. Inmunolocalización de MGS total y fosforilada en Serina 640 en células de Sertoli 42GPA9. 51

Lista de Abreviaturas

BHT:	Barrera hemato-testicular
BSA:	Albúmina de suero bovino
BSO:	L-butionina-S,R-sulfoxamida
DHA:	Ácido deshidroascórbico
DMEM:	Medio Dulbelcco's Eagle modificado enriquecido con F12
DTT:	1,4- ditiotreitól
EDTA:	Ácido etilendiaminotetracético
F-2,6-P2:	Fructosa-2,6-Bisfosfato
F6P:	Fructosa-6- Fosfato
FBP:	Fructosa-1,6-Bisfosfato
FBPasa:	Fructosa-1,6-Bisfosfatasa
FBPasaH:	Fructosa-1,6-Bisfosfatasa hepática
FBS:	Suero bovino fetal
G1P:	Glucosa-1-fosfato
G6P:	Glucosa-6-fosfato
GS:	Glucógeno Sintasa
HRP:	Peroxidasa de rábano picante
IP:	Ioduro de propidio
MGS:	Glucógeno Sintasa muscular
PBS:	Tampón fosfato salino
PVDF:	Polivinilideno fluoruro

RT-PCR: Transcripción reversa acoplada a reacción en cadena de polimerasa

SDS: Dodecil sulfato de sodio

TEMED: N,N,N'N'-tetrametilendiamina

UDPG: Uridinfosfato glucosa

1. Resumen

Las células de Sertoli son de gran importancia para el proceso espermatogénico, pues son las encargadas de soportar, tanto estructural como energéticamente, dicho proceso. Estas células poseen una gran cantidad de glucógeno, principal reserva de glucosa en los organismos superiores. Existen dos vías de síntesis de este polímero; la directa, a partir de la glucosa absorbida por la célula, y la indirecta, a partir de la gluconeogénesis. Ambas vías son necesarias para mantener los niveles de glucógeno y se ha descrito que ocurren cambios de localización celular de algunas enzimas involucradas en este proceso, como son la Glucógeno Sintasa (GS) (ambas vías) y la Fructosa-1,6-Bisfosfatasa (FBPasa) (vía indirecta), dependiendo de la condición metabólica. Para determinar cambios en la localización subcelular de estas enzimas y analizar su correlación con la síntesis de glucógeno en células de Sertoli, se realizaron ensayos de RT-PCR, Western Blot e inmunohistoquímica utilizando como modelo las células de Sertoli 42GPA9, además de cortes de testículo de ratón. Los resultados mostraron que FBPasa no se expresa en este tipo celular, sugiriendo ausencia de la vía gluconeogénica, lo que es traducible en una alta biodisponibilidad de lactato para ser usado por las células germinales. Las células de la línea 42GPA9 cultivadas en diferentes condiciones (sin glucosa, alta glucosa y en presencia de IGF-1) no mostraron cambios de localización de la isoforma muscular de GS de células de Sertoli. Esta enzima sólo cambia su localización subcelular en presencia de LiCl, condición en la que se observa en gránulos citosólicos y una baja cantidad en el núcleo, que co-localiza con SC-35. Este estudio indica que el metabolismo de glucosa y glucógeno de la célula de Sertoli sería diferente al descrito para otros tipos celulares sintetizadores de glucógeno.

1.1. Summary.

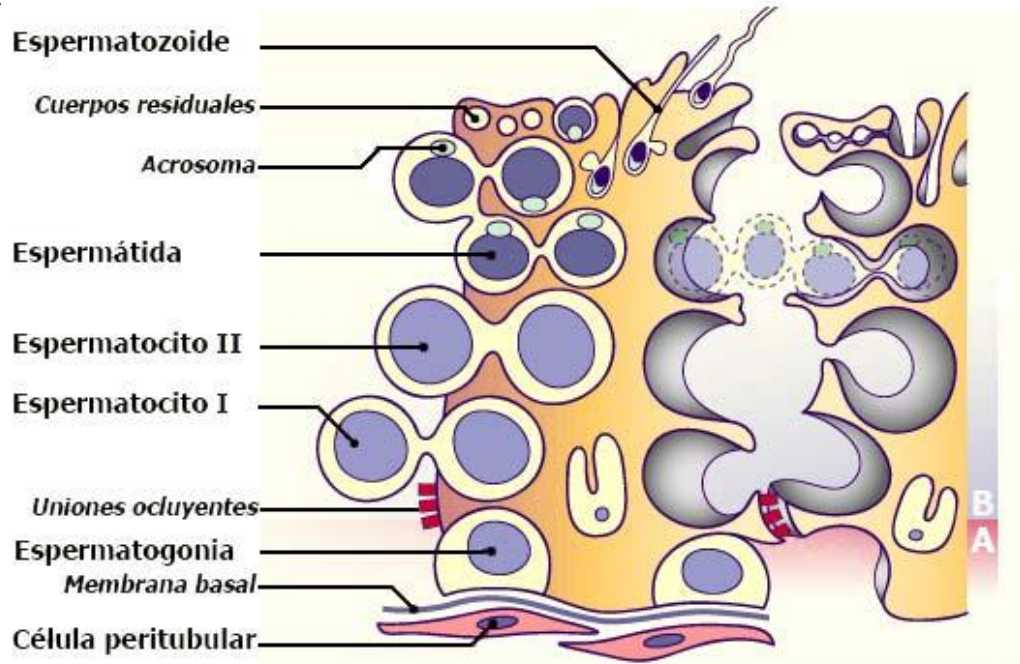
Sertoli cells are very important for spermatogenesis, because these somatic cells support this process, both structurally and energetically. They pose large amounts of glycogen, the main glucose reservoir in higher organisms. This polymer can be synthesized by two pathways: the direct pathway, which uses glucose absorbed by the cell, and the indirect pathway, which uses gluconeogenic precursors. Both pathways are very important to maintain an adequate level of glycogen. Glycogen Synthase (GS) (both pathways) and Fructose-1,6-Biphosphatase (FBPase) (indirect pathway) change their subcellular localization depending on the metabolic condition of the cell. To determine subcellular localization changes of these enzymes and analyze its correlation with Sertoli cell glycogen synthesis, RT-PCR, Western Blot and immunohistochemical assays were done, using 42GPA9 Sertoli cells and mouse testis slices. The results showed that FBPase is not expressed in this cell type, suggesting the absence of a gluconeogenic pathway, which may indicate a high lactate bioavailability to be used by germ cells. On the other hand, 42GPA9 Sertoli cells cultured under different conditions (with or without glucose, in high glucose and in the presence IGF-1) did not show changes of GS subcellular localization in Sertoli cells. This enzyme only changes its localization in the presence of LiCl, condition in which it is mainly found in cytosolic granules and a small amount in the nuclei, co-localizing with SC-35. This study indicates for first time that glucose and glycogen metabolism in Sertoli cells may be different to other glycogen synthesizing cell types, like hepatocytes and muscular cells.

2. Introducción

El testículo posee dos grandes funciones; por un lado, es en este órgano donde se produce la hormona masculina testosterona, y por otro, es el encargado de la producción de gametos masculinos, denominados espermatozoides. Este proceso, llamado espermatogénesis, se lleva a cabo en el epitelio del túbulo seminífero, que está compuesto por 2 tipos celulares, las células germinales y las somáticas. Las células germinales se encuentran desde la parte basal a la parte adluminal del túbulo seminífero en diferentes estados de diferenciación, esto es, espermatogonias, espermaticitos pre-leptoténicos y leptoténicos, espermátidas redondas, espermátidas elongadas y espermatozoides. Las células somáticas que dan soporte mecánico y nutricional al proceso de espermatogénesis, denominadas células de Sertoli.

Las células de Sertoli son de forma irregular y columnares en el epitelio seminífero (figura 1), se extienden desde la base del epitelio seminífero hasta el lumen de este, interactuando directamente con las células germinales en sus diferentes estadios. Están en contacto directo con una forma modificada de matriz celular por su parte basal (Dym, 1994), y tienen una gran área superficial, que les permite sostener en promedio hasta 50 células germinales, en el testículo de rata adulta (Wong *et al.*, 1983, Weber *et al.*, 1983).

A



B

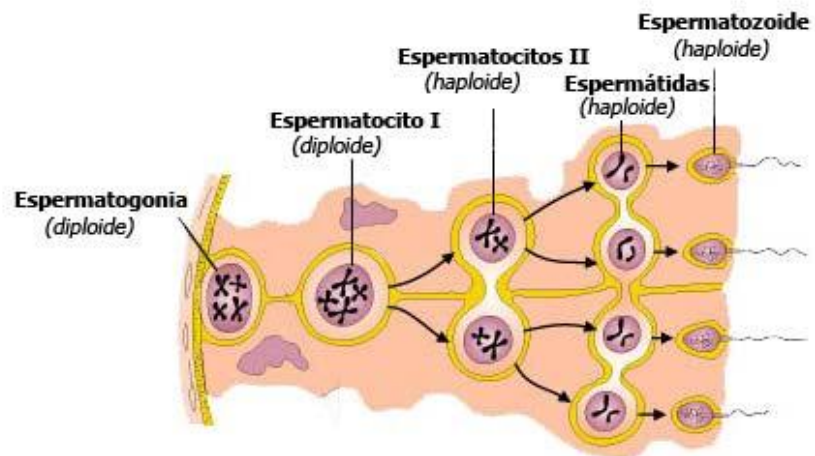


Figura 1. Epitelio seminífero. A) Esquema representativo del epitelio seminífero en mamífero. B) BHT formada por las células de Sertoli (divisiones en amarillo). Las células de Sertoli vecinas se unen lateralmente por uniones ocluyentes que dividen el túbulo seminífero en dos compartimentos e impiden el libre paso de sustancias entre ambos. El compartimento basal comprende el espacio intersticial y los espacios ocupados por las espermatogonias (A). El segundo compartimento, denominado adluminal, incluye la luz del túbulo y el espacio que se extiende entre células vecinas desde la luz hasta las uniones estrechas (B). Este compartimento contiene espermatocitos, espermatidas y espermatozoides. B. Esquema representativo de la espermatogénesis en el epitelio seminífero. Comienza con la proliferación de las espermatogonias que están en contacto la membrana basal, la última división da lugar a los espermatocitos I, posteriormente estas células entran en meiosis para dar lugar a las espermatidas, las cuales se diferencian para alcanzar la maduración completa de los espermatozoides. (Imágenes adaptadas de <http://www.bioapuntes.cl/apuntes/gametogenesis.htm> y <http://www.embryology.ch/anglais/ugenital/molec06.html>)

Las funciones de las células de Sertoli están estrechamente relacionadas con el desarrollo y movimiento de las células germinales, ya que:

- Proveen un soporte estructural a estas, pues depositan los componentes de la matriz extracelular y la formación de uniones celulares da forma al túbulo seminífero,
- Crean la barrera hemato-testicular (BHT), mediante uniones oclusivas entre ellas, lo que conlleva a crear un ambiente adluminal que no está en contacto con el torrente sanguíneo, creando un ambiente especializado para la espermatogénesis, ya que esta barrera regula el tipo de moléculas que pueden pasar hacia el lumen del túbulo seminífero, lo que la convierte también en una barrera inmunológica, asegurando que el sistema inmune del organismo no reconozca los antígenos presentes en las células germinales haploides.
- Participan en el movimiento de las células germinales, ya que estas células no poseen la arquitectura característica de las células migratorias, y también participan en la espermiación, ya que las células de Sertoli encapsulan las cabezas de las espermátidas con sus procesos citoplasmáticos, expulsan las espermátidas desde sus criptas y liberan las cabezas de las espermátidas.
- Fagocitan los cuerpos residuales liberados por las espermátidas y también fagocitan a cualquier célula germinal que haya degenerado durante el proceso de espermatogénesis.
- Secretan una gran variedad de elementos necesarios para la supervivencia y desarrollo de las células germinales, como proteasas e inhibidores de proteasas, factores de crecimiento autocrinos y paracrinos, y componentes de la matriz

extracelular, entre otros. También proveen nutrientes a las células detrás de la BHT, los que tienen que ser sintetizados y entregados eficientemente para mantener a las células germinales. Estos incluyen aminoácidos, carbohidratos, lípidos, vitaminas e iones metálicos. (Mruk & Cheng,2004).

Se ha descrito que la mayor cantidad de glucosa que es captada por las células de Sertoli entra en la vía de glicólisis, sin embargo una muy baja cantidad de esta llega al ciclo de Krebs y posterior fosforilación oxidativa, ya que solo entre el 2% y 3% de esta se transforma en CO_2 , mientras que aproximadamente el 75% se convierte en aniones, especialmente lactato (Robinson & Fritz, 1981). Estas células sintetizan también glucógeno, cuya concentración varía de acuerdo al estado de desarrollo del organismo (Fabbrini, Re y Conti, 1969). Tomando en cuenta la importancia de las células de Sertoli para la mantención energética del proceso espermatogénico, la acumulación de glucógeno en la célula de Sertoli puede ser determinante para el correcto desarrollo de esta.

El glucógeno es la principal reserva de carbohidratos en el ser humano, así como en la mayor parte de los organismos superiores. Es un polisacárido de D-glucosa altamente ramificado que funciona como un depósito, en el cual los excesos de glucosa pueden ser almacenados, y de donde la glucosa puede ser rápidamente liberada según la demanda. El metabolismo del glucógeno está bajo una compleja regulación, involucrando varios factores alostéricos, así como modificaciones covalentes y compartimentalización de enzimas claves. La síntesis de glucógeno es conocida: en general, la glucosa-6-fosfato (G6P) es transformada en glucosa-1-fosfato (G1P) por la Fosfoglucomutasa y

posteriormente la UDP-glucosa-1-fosfato pirofosforilasa cataliza la reacción de que da paso a la formación de UDP-glucosa, que es sustrato de la Glucógeno Sintasa (GS), enzima encargada de alargar la cadena de glucógeno (figura 2).

Figura 2. Síntesis de Glucógeno a partir de Glucosa 6 Fosfato (G6P). La G6P sirve de sustrato para la enzima Fosfoglucomutasa, encargada de transformar la G6P en glucosa 1 fosfato (G1P). Luego, la enzima UDP-Glucosa Pirofosforilasa cataliza la reacción entre G1P y Uridin trifosfato (UTP) para formar Uridindifosfato glucosa (UDPG) liberando 2 fosfatos inorgánicos (PPi). Finalmente, UDPG es usado como sustrato por la Glucógeno Sintasa, enzima que cataliza la reacción de transferencia del grupo glucosil de la UDP-glucosa al polímero glucógeno en formación mediante un enlace glucosídico $\alpha(1\rightarrow4)$, y liberando UDP. (adaptado de <http://www.javeriana.edu.co/Facultades/Ciencias/neurobioquimica/libros/perinatal/glucogenesised.html>)

Hay 2 vías de obtención de G6P para la síntesis de Glucógeno, la directa y la indirecta (figura 3). En la primera, el G6P es obtenido a partir de glucosa a la que se le agrega un grupo fosfato en el carbono 6, reacción catalizada por una hexokinasa, mientras que en la vía alternativa, la G6P es obtenida a partir de sustratos gluconeogénicos. (Topper & Hastings, 1949).

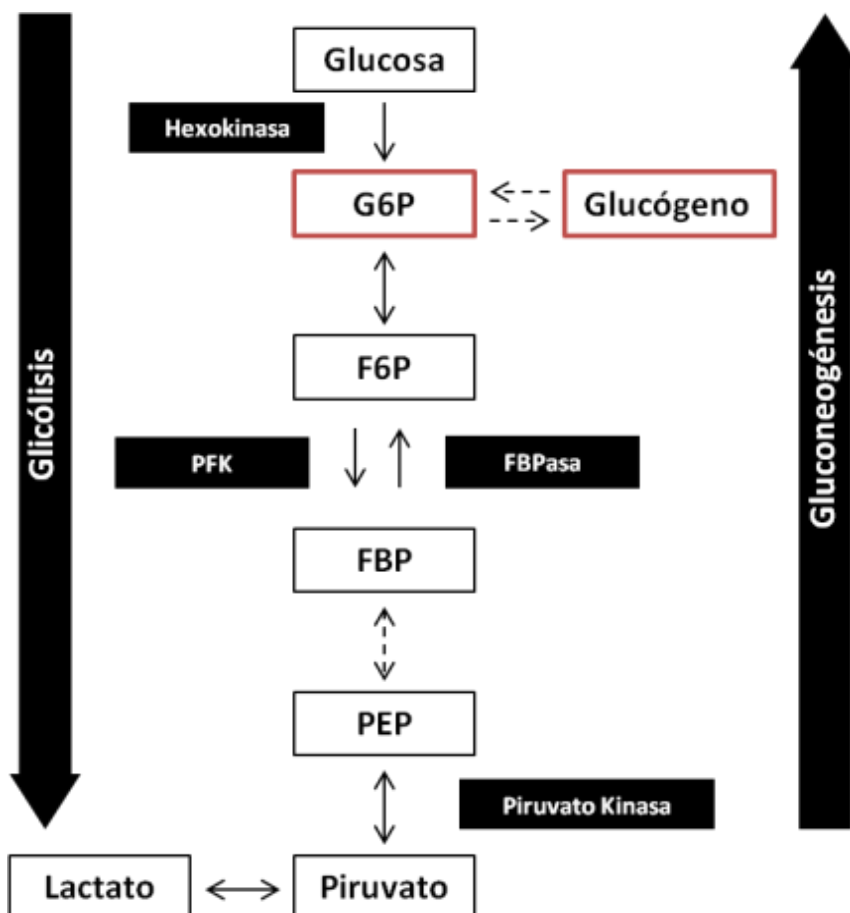


Figura 3. Procedencia de la G6P necesaria para la síntesis de glucógeno. Esquema representativo de las fuentes de procedencia de la G6P para la síntesis de glucógeno, el cual puede provenir de la glucosa captada por la célula, proceso conocido como síntesis directa de de glucógeno, o puede provenir de precursores no glucósidos, a partir de la gluconeogénesis, proceso denominado síntesis indirecta de glucógeno. (Tomado de Dzugaj *et al.*, 2006)

De acuerdo con lo anterior, dos enzimas muy importantes para la síntesis de glucógeno son la anteriormente nombrada Glucógeno Sintasa (GS), involucrada en ambas vías de síntesis de glucógeno, y la Fructosa-1,6-Bisfosfatasa (FBPasa), involucrada en la síntesis indirecta. GS es la enzima encargada de catalizar la unión de glucosas, provenientes de la UDP-glucosa, mediante enlaces $\alpha(1-4)$ al extremo no reductor de una molécula de Glucógeno creciente. Es una enzima altamente regulada por diversos factores, ya que al ser fosforilada por la Glucógeno Sintasa Kinasa 3 (GSK3), reduce la actividad de la enzima, mientras que la G6P activa alostéricamente a la enzima, siendo capaz de contrarrestar casi totalmente la inhibición por fosforilación (Bouskila *et al.*, 2010). G6P juega "*in vivo*" un papel muy importante, puesto que su unión a la GS convierte a la enzima en un mejor sustrato para las fosfatasas que conducen a su activación covalente (Villar-Palasi y Guinovart, 1997). Las dos isoformas mayoritarias de la GS en mamíferos son la muscular (MGS), que es la que expresan la mayoría de tejidos, y la hepática (LGS), que parece ser específica de este tejido. Estas dos isoformas presentan un 70 % de identidad de secuencia global, que no se distribuye de forma homogénea, y el tamaño varía entre especies, variando el peso molecular entre 80 y 95 kDa, aproximadamente. La zona central, que presumiblemente contiene los dominios de unión de sustratos y el centro catalítico, está mucho más conservada, mientras que los extremos N- y C-terminales, que contienen los lugares de fosforilación conocidos y que controlan la actividad de la enzima, son los que presentan menor grado de homología. Se ha descrito que las dos isoformas de la GS presentan una distribución subcelular diferente, tanto en ausencia como en presencia de glucosa, lo que sugiere la existencia de diferencias

significativas entre los mecanismos moleculares involucrados en el control de la síntesis de Glucógeno en el músculo y en el hígado.

FBPasa, en general, es un tetrámero de 36,5 kDa por subunidad, que cataliza uno de los tres pasos reguladores de la gluconeogénesis, la hidrólisis de FBP a fructosa-6-fosfato (F6P) más fosfato inorgánico, en presencia de iones metálicos bivalentes, Mg^{2+} o Mn^{2+} (Van Schaftingen, 1987). La enzima responde a una gran variedad de señales metabólicas (Benkovic & deMaine, 1982), ya que es regulada por inhibición a concentraciones micro molar de AMP y fructosa-2,6-bisfosfato (F-2,6-P2) y separadamente por altas concentraciones de FBP. Existe además un potente sinergismo entre las inhibiciones provocadas por F-2,6-P2 y AMP, efecto que se piensa es el principal mecanismo de control del flujo de la vía gluconeogénica (Hers & Hue 1983; Van Schaftingen, 1987). La cantidad de variados modelos de regulación y características particulares, relativamente conservadas entre las FBPasa de organismos superiores, ha provocado un permanente interés en el análisis de esta enzima desde un punto de vista estructural, cinético y regulador. La enzima tiene una estructura homotetramérica por lo que los residuos de cada monómero de la proteína se ordenan en un único dominio que tiene una forma hexaédrica. Las dos subunidades superiores adyacentes forman una unidad dimérica (C1-C2) que posee una forma de una pirámide truncada y el tetrámero se forma por sobreposición de dos dímeros (C1-C2/C3-C4). La proteína es funcionalmente en dímero de dímeros.

Se sabe que ambas enzimas pueden cambiar su localización subcelular de acuerdo al estado metabólico en que se encuentre la célula. En algunos estudios se ha visto que GS puede ser encontrada en el compartimento nuclear en caso de privación de glucosa y

reducción en la cantidad de glucógeno celular en miocitos y adipocitos (Cid *et al.*, 2005), también en adipocitos en presencia de insulina, GS se presenta en patrones punteados dentro de la célula (Ou *et al.*, 2005) y en hepatocitos la glucosa induce su traslocación a la periferia de la membrana plasmática (Fernandes-Novell *et al.*, 1997). De manera similar, FBPasa hepática puede ser localizada en el núcleo (Dzugaj, 2006) y también en compartimentos periféricos del hepatocito, en donde colocaliza con GS hepática, cuando está en presencia de altas concentraciones de glucosa o ácido deshidroascorbico (DHA) (Yáñez *et al.*, 2004). El cambio en la localización subcelular de estas enzimas es importante para el metabolismo de azúcares en células sintetizadoras de glucógeno, al parecer como una forma de controlar adecuadamente el destino de los sustratos energéticos que posee.

Aunque el metabolismo de glucosa y glucógeno en la célula de Sertoli y en el epitelio seminífero han sido estudiados, la información recopilada no es aún suficiente para comprender completamente el rol que pudiese estar cumpliendo el glucógeno en este sistema, o como es regulado este metabolismo en este sistema, y aún no se han hecho estudios en cuanto a los cambios de localización que pudiesen sufrir enzimas claves en la síntesis de glucógeno. Por lo expuesto anteriormente, el metabolismo energético de estas células es algo esencial no solo para la mantención de sí misma, sino para todo el proceso espermatogénico, por lo que es importante investigar sobre los cambios de localización que puedan sufrir estas enzimas y los efectos que estos cambios pueden provocar en el metabolismo energético (en relación con glucosa y glucógeno) de la célula de Sertoli.

De acuerdo a lo anterior, se planteó la siguiente hipótesis: **en células de Sertoli 42GPA9 existe un cambio en la localización de las enzimas relacionadas con la síntesis de glucógeno, Glucógeno Sintasa y Fructosa 1-6 Bisfosfatasa, en diferentes estados metabólicos**, de la cual se desprenden los siguientes objetivos específicos:

1. Determinar la presencia de Glucógeno Sintasa y Fructosa-1,6-Bisfosfatasa en la línea celular de Sertoli 42GPA9.
2. Evaluar los cambios de localización subcelular de estas enzimas bajo distintas condiciones metabólicas.

3. Material y Método

3.1 Materiales

De Sigma Chemical Co. (USA) se obtuvieron los siguientes reactivos: azul de Coomassie G-250, Histochoice (fijador de tejido), yoduro de propidio (IP), Tritón X-100, rojo fenol, starter-RT (oligo-dT), azul de tripán, solución de colágeno tipo I de cola de rata, ácido sulfosalicílico.

De Merck & Co, Inc. (Alemania) se obtuvieron los siguientes reactivos: cloruro de mercurio II, ácido clorhídrico, cloruro de potasio, alcohol metílico, alcohol etílico, fosfato diácido de sodio, fosfato dihidrógeno de potasio, acrilamida, bisacrilamida, alcohol isopropílico, cloroformo, hidróxido de sodio.

De Winkler Ltda. (Chile) se adquirió albúmina de suero de bovino (BSA), glicina, Tris base, carbonato de sodio, dodecilsulfato de sodio (SDS), persulfato de amonio, cloruro de sodio, cloruro de calcio, cloruro de magnesio, reactivo de Bradford, agua ultra pura libre de nucleasas, tampón de carga de proteínas 2X.

De Gibco-BRL Laboratorios Life Technologies, Inc. (USA) se adquirió: tripsina, EDTA, penicilina/estreptomina/fungizona.

De Hyclone (USA), se obtuvo medio de cultivo Dulbecco's Eagle modificado enriquecido con F-12 (DMEM-F12) y suero fetal bovino (FBS).

De Santa Cruz Biotechnology (USA), se obtuvo anti β - actina (sc-81178),

De INVITROGEN Corporation (USA), se obtuvo TOPRO-3, anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado a Alexa Fluor 488, anticuerpo anti-igG de ratón conjugado a Alexa Fluor 568 y medio de montaje para fluorescencia.

De Pierce Biotechnology, Inc. (USA) se adquirieron los anticuerpos secundarios conjugados a peroxidasa, anti-IgG de ratón y anti-IgG de conejo, reactivo ECL para quimioluminiscencia y cocktail de inhibidores de proteasas 100X.

De Promega Co. (USA), se adquirió la enzima transcriptasa reversa M-MLV, los dNTP`s, la enzima GoTaq polimerasa, estándar de DNA 100bp.

De Lonza Group Ltda, (Suiza), se obtuvo Agarosa Seakem. De OMEGA Bio-Tek Inc, (USA), se obtuvo RNASolv.

De MBI Fermentas (USA), fue obtenido el estándar de peso molecular pre-teñido para geles de poliacrilamida-SDS. De bioWORLD (USA), se adquirió TEMED.

De Calbiochem, EMD Chemicals Inc (USA), se adquirió Tween 20 y β -mercaptoetanol.

3.2 Material biológico.

Para los cortes histológicos y ensayos de PCR en tiempo real se utilizaron ratones OF1 obtenidos de Harlan laboratories, y fueron mantenidos en las instalaciones del bioterio del PARC científic de la Universidad de Barcelona, España.

También se utilizaron ratones obtenidos del Instituto de Fisiología de la Universidad Austral de Chile, donde son mantenidos según las normas vigentes. Estos animales de experimentación son anestesiados con cloroformo y sacrificados por decapitación, según las medidas de bioseguridad del “Manual de Normas de Bioseguridad” de CONICYT de 2008. Los restos animales son cremados en el incinerador del Fundo Teja Norte de la Universidad Austral de Chile, donde se descartan los desechos biológicos de acuerdo al Manual de Procedimiento para el Manejo de Residuos de la UACH.

3.3 Instrumentos.

Los equipos utilizados fueron los siguientes: pHmetro Inolab WTW pH 720 Autocal, balanza Precisa AND GR-200, balanza Sartorius TE4101, centrífuga Sigma 2-16PK, centrífuga Sigma 1-14, centrífuga Eppendorf minispin, incubador para cultivo NuairTMDH Autoflow, gabinete de seguridad biológica NuairTM Class II UN-425-600-E, microscopio confocal OLYMPUS Fluoview FV1000, microscopio de epifluorescencia OLYMPUS BX 50 con cámara OLYMPUS U-TV0 5XC-3, microscopio invertido OLYMPUS CKX41, fuente de poder EPS 250 de Scientific Company, espectrofotómetro de arreglo de diodos Agilent 8453 agitador magnético IKAMAGR RCT, sonicador Ultrasonic Homogenizer 4710 Cole Parmer Instruments Co. espectrofotómetro Agilent 8453, Thermo Nanodrop 2000, PCR en tiempo real ABI Prism7700, sistema de electroforesis y transferencia Mini ProteanR Tri-Carb 1600 TR, agitador orbital Lab-Line, baño termorregulado Haake D8, freezer a -70°C Foma Scientific Bio-freezer 8425, freezer a -20°C Consul, refrigerador Fensa y Whirlpool.

3.4 Métodos.

3.4.1 Cultivo de células de Sertoli 42GPA9.

Las células de Sertoli 42GPA9 se cultivaron en medio DMEM-F12 suplementado con FBS (suero bovino fetal) al 10%, L-glutamina 2 mM, penicilina 50 U/ml,

estreptomicina 50mg/ml y fungizona 50 ng/ml a 37°C y CO₂ al 5 % (Bourdon et al., 1998; Lablack et al., 1998; Bourdon et al., 1999).

3.4.2 Extracción de RNA

Se obtuvo RNA total de células en cultivo mediante un método equivalente al de Trizol, utilizando RNA-Solv. Se homogeneizaron 5-10 x 10⁶ células en 1ml de reactivo y se transfirieron a un tubo nuevo, se agregó 0,2 ml de cloroformo y se agitó vigorosamente por 15 segundos en vortex, inmediatamente se incubó en hielo por 10 minutos. Se centrifugó la muestra a 12000 x g por 15 minutos a 4°C, obteniéndose tres fases. Posteriormente el 80% de fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo y se precipitó el RNA con 0,5 mL de isopropanol dejando reposar 20 minutos, luego el RNA fue centrifugado a 12000 x g por 10 minutos a 4°C y se lavó con 1 ml de etanol 80% en vortex, posteriormente se centrifugó a 7500 x g por 5 minutos y se retiró el etanol, se dejó secar por 5 minutos y se resuspendió en 30µl de agua ultra pura libre de nucleasas. Se determinó la concentración del RNA midiendo absorbancia a 260 nm usando la relación de una unidad de absorbancia corresponde a 40µg/ml de RNA. A las muestras obtenidas se les determinó la relación de absorbancia 260 nm/280 nm, encontrándose todas dentro del rango de 1,9-2,0.

3.4.3 Reacción en cadena de la polimerasa acoplada a transcripción reversa (RT-PCR)

Para la transcripción reversa se preparó una mezcla consistente en 4 µg de RNA, 1 µl de starter-RT 5 µM (oligo-dT) y agua libre de nucleasas para completar 35,5 µl, la que se incubó a 70°C por 5 minutos para finalmente dejarla en hielo. Paralelamente se preparó una segunda mezcla que contenía 10 µl de tampón RT 5X (Tris-HCl 250 mM, KCl 375 mM, MgCl₂ 15 mM, DTT 50 mM, pH 8,3), 4 µl de dNTP's 10 mM, 0,7 µl de enzima transcriptasa reversa M-MLV (200 U/µl), se juntaron ambas mezclas y se incubaron a 42°C por 1 hora. Adicionalmente, se realizó el mismo procedimiento en ausencia de la enzima transcriptasa reversa para descartar la presencia de contaminación con DNA.

Para la reacción de amplificación, se utilizaron partidores diseñados para amplificar segmentos internos de MGS y de FBPasaH.

Para controlar la integridad de los cDNAs, se llevaron a cabo reacciones de amplificación utilizando partidores diseñados para amplificar el gen que codifica para β-actina. En todos los casos, se preparó la mezcla de reacción conteniendo en todos los casos: 2,5 µl de tampón green 5X, 1,25 µl de MgCl₂ 25 mM (tampón y MgCl₂, suministrado con la enzima), 0,25 µl de dNTP's 10 mM, 5,3 µl de agua libre de nucleasas, 1,3 µl de cada partidor 10 µM, 1 µl de templado y finalmente 0,1 µl de enzima GoTaq (5 U/µl), generando un volumen final de 13 µl. Se utilizaron 1 par de partidores tanto para MGS como para la isoforma hepática de FBPasa (FBPasaH). El programa de amplificación en el termociclador consistió en una primera etapa de desnaturación a 94°C por 5 min, con 35 ciclos de 94° C 45 seg, 60° C 45 seg y 72° C 2 min y finalmente 72° C

10 min. Como control negativo de la reacción de PCR fue llevada a cabo la misma reacción pero en ausencia de templado.

Para detectar FBPasaH se usaron los oligos:

△ 5' AAGCTTGTGCGACATGGCGAACCATGCGCCCTTC 3'

△ 5' GGATCCCATATGTCACTTGGCTTTGTGCTTCCTTT 3'

Cuyo amplicón corresponde a la secuencia completa de FBPasaH, aproximadamente 1070 pb.

Para detectar MGS se usaron los siguientes oligos:

△ 5' GCTTACGGCATTACATTCT 3'

△ 5' CTTTCATCCTCACTCTGGTGT 3'

Cuyo amplicón corresponde a una secuencia interior de MGS, que mide aproximadamente 500 pb.

3.4.4 Reacción en cadena de Polimerasa en tiempo real

RNA total fue extraído de testículos de ratón empleando el sistema comercial Trizol® (Invitrogen) y posterior re-purificación para aumentar la pureza de los RNAs recuperados mediante *RNAeasy* (Qiagen), en ambos casos se siguió las recomendaciones del fabricante. Los RNAs fueron cuantificados espectrofotométricamente en *nanodrop* y ajustados a una concentración de 1ug/ul con agua libre de nucleasas. Las muestras de RNA fueron sometidas a retrotranscripción,

para lo que se utilizó 6ug de RNA total y hexámeros degenerados, siguiendo el protocolo descrito por el proveedor.

Los análisis de expresión en tiempo real (PCR), se realizaron en el equipo ABI Prism7700 Detection System y siguiendo los protocolos descritos para ready-made TaqMan primer (Applied Biosystems, #Mm00472712_m1 y #Mm00490181_m1 para GYS1 y FBP1, respectivamente). Cada muestra fue analizada en triplicado usando 100 ng de cDNA total en cada caso. La reacción de PCR se desarrolló con el siguiente perfil: 40 ciclos de 15 seg a 95 °C y 1 min a 60 °C. Los datos obtenidos fueron analizados con el método comparativo $2\Delta\Delta C_t$, usando como controles internos el RNA ribosomal 18S y GAPDH (Applied Biosystems, #Hs99999901_s1 y #Mm03302249_g1, respectivamente).

3.4.5 Ensayo actividad FBPasa

Para medir la actividad de FBPasa las células de Sertoli 42GPA9 fueron congeladas sin medio de cultivo y luego fueron lizadas con 200 μ l de buffer de lisis (20 mM Tris-base, 0,4% Triton x-100, NaCl 500 mM y mix de inhibidores de proteasas 1x) para extraer las proteínas, sin sonicar. Las muestras fueron centrifugadas a 10000g durante 5 minutos, tomando el sobrenadante y eliminado el pellet.

Luego 10 μ l de la muestra fueron mezclados con 490 μ l de mix de actividad enzimática FBPasa (100 ml mix: 0,332 μ l de PFI 1,2 U, 0,484 μ l G6PDH 1,2 U, 25 μ l $MgCl_2$ 100mM, 0,05 μ l EDTA 0,1mM, 1,5 μ l FBP 30 μ M y 362,6 μ l de H_2O ultrapura). El

mix fue preincubado a 37°C durante 5 minutos antes de agregar las muestras. Como control positivo se usaron extractos de hígado, riñón y testículo.

3.4.6 Inmunohistoquímica cromógena

Los testículos de ratón se fijaron con Bouin acuoso (75 ml ácido pícrico saturado en agua, 25 ml formamida 40%, 5 ml ácido acético glacial) por 48 horas, para luego ser incluidas en parafina. Los testículos fijados e incluidos se seccionaron con un micrótopo, obteniéndose cortes seriados de 5 µm de grosor y fueron montados en portaobjetos de vidrio gelatinizados. Los cortes incluidos en parafina fueron pasadas por xilol y una batería descendente de etanol (100% I, 100% II, 95% I, 95% II, 70%, (v/v)) por 5 minutos cada uno para desparafinar e hidratar, luego se lavan tres veces con agua destilada por 3 minutos. Posteriormente, los cortes fueron sometidos a un tratamiento para mejorar la exposición de los antígenos que consistió en incubar la muestra con citrato de sodio 10 mM (pH 6,0) en un horno microondas, 1 minuto a 100% de potencia, 10 minutos a 10% de potencia y 15 minutos a temperatura ambiente. Para eliminar el exceso de citrato se lavó con agua destilada dos veces por 5 minutos. Para eliminar la actividad de la peroxidasa endógena, los cortes se trataron con 3% peróxido de hidrógeno en metanol durante 15 minutos. Seguido de tres lavados con tampón fosfato 0,1 M (PBS, pH 7,4; 320 mOsm), por 5 minutos. Se bloqueó y permeabilizó con solución de bloqueo (5% BSA, 0.3% Tritón X-100, en PBS 0,1 M) por 2 horas en cámara húmeda a temperatura ambiente. Para la incubación con los anticuerpos primarios (anti- MGS, anti-FBPasa de riñón de cerdo y anti-β-actina) se utilizaron diluciones de 1:200 en solución de bloqueo

modificada (1% BSA, 0,3% tritón X-100 en PBS 0,1 M). Se incubaron con el anticuerpo primario por toda la noche a 4°C en cámara húmeda. Posteriormente se lavaron los cortes tres veces con PBS 0,1 M Tritón 0,3% por 10 minutos. Como anticuerpo secundario se utilizó anti-igG de rata y anti-igG de conejo conjugados con peroxidasa de rábano (HRP), según fuera el caso, en una dilución 1:200 en solución de bloqueo modificada, se incubó por 2 horas en cámara húmeda a temperatura ambiente. Se lavó tres veces con PBS 1x-Tritón X-100 0,3 % una vez con PBS 0,1 M por 10 minutos cada uno. Para el revelado se incubó con una solución de 3,3'-diaminobenzidina (DAB) 0,7 mg/ml y 0,03% de peróxido de hidrógeno por 10 minutos en oscuridad seguido de tres lavados con agua destilada por 3 minutos. Los núcleos fueron teñidos con hematoxilina durante 10 segundos y el viraje de color se realizó inmediatamente en borato de sodio por 2 segundos. Finalmente, los cortes fueron deshidratados en una batería ascendente de etanol (70%, 95% II, 95% I, 100% II y 100% I (v/v)) y xilol por 5 minutos cada uno, para luego ser montados utilizando bálsamo de Canadá. Los cortes fueron observados en un microscopio de epifluorescencia OLYMPUS BX 50 con cámara OLYMPUS U-TV0 5XC-3.

3.4.7 Inmunocitoquímica

Las células de Sertoli 42GPA9 fueron cultivadas sobre cubreobjetos redondos de vidrio (12mm), previamente tratados con colágeno, para luego ser fijadas con Histochoice:etanol (4:1) durante 10 minutos. Después de dos lavados con PBS 0,1 M (pH7,4) por 10 minutos, se bloqueó y permeabilizó con solución de bloqueo (5% BSA, 0,3% Tritón X- 100, en PBS 0,1 M) por 1 h en cámara húmeda a temperatura ambiente.

Para la incubación con los anticuerpos primarios (anti-glucógeno y anti-MGS) se utilizaron diluciones de 1:50 y 1:200 en solución de bloqueo modificada (1% BSA, 0,3% Tritón X-100 en PBS 0,1 M). Se incubaron con el anticuerpo primario por toda la noche a 4°C en cámara húmeda. Posteriormente se lavaron los cortes tres veces con PBS 0,1 M, Tritón X-100 0,3% por 10 minutos. Como anticuerpo secundario se utilizó anti-igG de conejo conjugado a Alexa fluor 488 y anti-igG de ratón conjugado a Alexa fluor 568, en una dilución 1:200 en solución de bloqueo modificada, se incubó durante 2 horas en cámara húmeda a temperatura ambiente. Se lavó tres veces con PBS 0,1 M, Tritón X-100 0,3 % y una vez con PBS 0,1 M por 10 minutos cada uno. Los núcleos fueron teñidos con ioduro de propidio 1,7ug/mL o TOPRO3, según el caso, ambos incubados junto al anticuerpo secundario. Las muestras fueron montadas con medio de montaje para fluorescencia DAKO y visualizadas utilizando un microscopio confocal invertido.

3.4.8 Extracción y cuantificación de proteínas totales

Las células en cultivo previamente lavadas con PBS 0,1M (pH 7,4) fueron despegadas de las placas de cultivo utilizando tripsina-EDTA 0,25% (p/v). El sedimento celular fue resuspendido en tampón A (sacarosa 300 mM, DTT 3 mM, PMSF 100 µg/ml, aprotinina 2 µg/ml, pestatina A 1 µg/ml, leuceptina 2 µg/ml y EDTA 1 mM, pH 7,4) y sonificado 3-5 veces durante 15 segundos a 4°C hasta disgregar completamente. Los homogeneizados fueron centrifugados a 14,000 x g durante 15 minutos a 4°C. El sobrenadante fue rescatado y cuantificado mediante el método de Bradford. Estos extractos proteicos fueron utilizados para realizar ensayos de Western blot. Las proteínas

se cuantificaron utilizando el método de Bradford (Bradford et al. 1976). Se construyó una curva de calibración entre 0 y 40 μg de proteína en un volumen final de 100 μl . Se utilizó como estándar BSA (1,45 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) diluido en agua destilada. Para todas las lecturas se utilizó un blanco de agua destilada, la misma usada para las diluciones. Se adicionó a cada tubo de la curva 1 ml del reactivo de Bradford 1x (0.01% azul de Coomassie G, 4.75% etanol, 8.5% ácido fosfórico) y se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se realizó la lectura de absorbancia en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 595 nm. Para la cuantificación de las muestras se tomó una alícuota de 5 μl de cada una y se diluyó hasta completar un volumen final de 100 μl . En seguida se adicionó 1 ml de reactivo de Bradford 1x.

3.4.9 Separación electroforética de proteínas

Las muestras de proteínas fueron separadas electroforéticamente en geles de poliacrilamida al 10%. El gel separador y el espaciador se prepararon a partir de una solución de acrilamida:bisacrilamida 30:0,8%. El gel separador se preparó con una concentración final de poliacrilamida de 10% conteniendo Tris (pH 8,8) 375 mM; SDS 0,1%, persulfato de amonio 0,04% y TEMED 0,03%. Mientras que el gel espaciador se preparó con una concentración final de poliacrilamida de 3,8% incluyendo Tris 125 mM (pH 6,8), 0,1% SDS, 0,01% persulfato de amonio y 0,04% TEMED. Se tomaron muestras de proteínas de 40 μg a 80 μg y se les agregó tampón carga 2X Winkler (Tris 100 mM, 2-mercaptoetanol 2%, SDS 4%, glicerol 20%, azul bromofenol 0,2%, pH 6,8) a cada una y se calentaron a 95°C por 5 minutos. Las muestras fueron cargadas en el gel realizándose

la electroforesis a 30mA por 1 hora en tampón de corrida (Tris 25 mM, glicina 190 mM, SDS 0,1%, pH 8,3). Las proteínas separadas fueron transferidas a membranas de PVDF.

3.4.10 Transferencia de proteínas a membranas de PVDF

Finalizada la electroforesis, las muestras se electrotransferieron a membranas de PVDF (difluoruro de polivinilideno; 0,45 micrones de poro, 100-145 μm de espesor). Sobre una esponja embebida en tampón de transferencia (Tris 25 mM, glicina 190 mM, SDS 0,1%, metanol 20%, pH 8,3) se depositó secuencialmente: un trozo de papel de filtro (Whatman n° 1), la membrana de PVDF (previa activación de la membrana en metanol por 15 segundos), el gel a transferir, otro papel de filtro y luego otra esponja embebida en el mismo tampón. Esto se colocó en una cámara de electrotransferencia conteniendo el tampón mencionado y se aplicó una intensidad de corriente de 400 mA por 1 hora. Una vez cumplido el tiempo la membrana se dejó secar a temperatura ambiente. Para verificar el buen resultado de la transferencia, el gel fue teñido con solución de azul de Coomassie (30% metanol y 10% ácido acético) durante tres horas, y luego desteñido en una solución que contenía 30% de metanol y 10% de ácido acético.

3.4.11 Análisis de Western Blot

Para los experimentos de Western blot, las membranas se incubaron con 10 ml de solución de bloqueo (BSA 5%, Tween-20 0,1%) durante 2 h con agitación constante a temperatura ambiente. Luego, se incubaron las membranas con anticuerpos primarios de

interés, diluidos 1:5000 – 1:1000 en solución bloqueo modificada (BSA 1%, Tween-20 0,1%) durante toda la noche con agitación constante a temperatura ambiente. Finalizado este periodo, las membranas se lavaron tres veces por 20 minutos en PBS 0,1 M-Tween-20 0,1% y se incubaron con anti-IgG de ratón o de conejo conjugado a peroxidasa de rábano (HRP) 1:5000 en solución de bloqueo modificada durante 2 h a temperatura ambiente. Finalmente, las membranas se lavaron 2 veces con en PBS 0,1 M-Tween-20 0,1% y una vez con PBS 0,1 M. El revelado del conjugado se realizó utilizando un método de quimioluminiscencia, el cual se basa en la emisión de luz no radiactiva detectando antígenos inmovilizados unidos directa o indirectamente con anticuerpos conjugados con HRP. Se vertió sobre las membranas una solución que contenía peróxido de hidrógeno y luminol. Luego de 1 minuto, la membrana fue expuesta durante 5 a 20 minutos en el equipo Ultralum, donde fue tomada la fotografía.

4. Resultados

4.1. Determinación de las isoformas de Glucógeno Sintasa y Fructosa 1-6

Bisfosfatasa presentes en la célula de Sertoli 42GPA9.

La GS expresada en testículo completo y en la línea celular de Sertoli 42GPA9 corresponde a la isoforma del músculo esquelético (Figura 4A y 4C), mientras que la isoforma de FBPassa expresada en el órgano corresponde a la hepática (Figura 4A y 4B), lo que se corresponde con lo propuesto por Yañez *et al.* (2007). Sin embargo, esta

isoforma no se expresa en las células de Sertoli 42GPA9 ni tampoco la isoforma muscular (datos no mostrados).

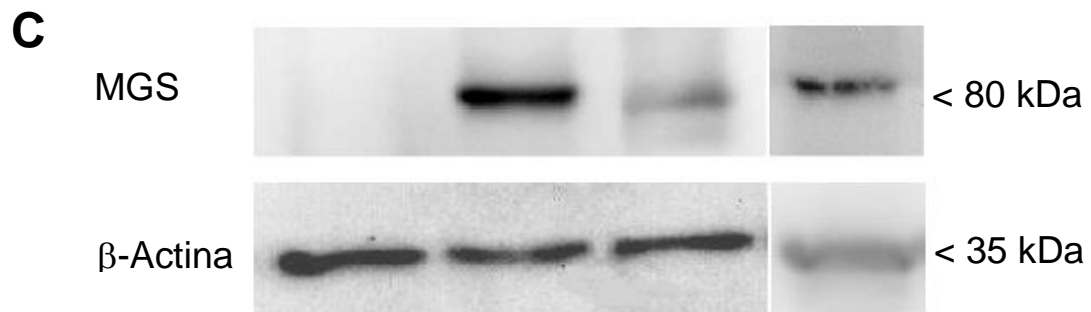
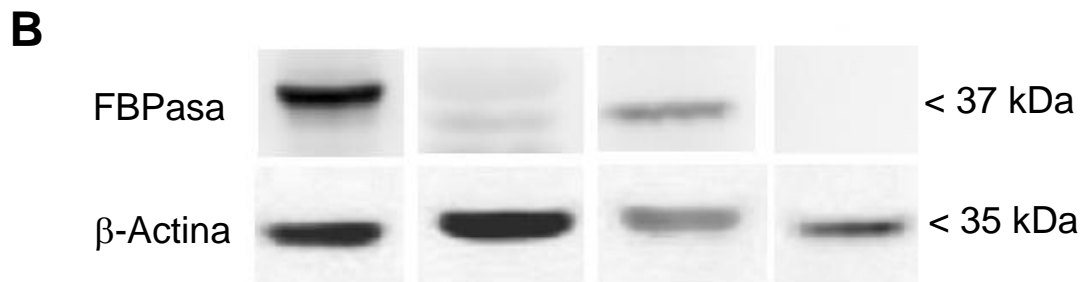
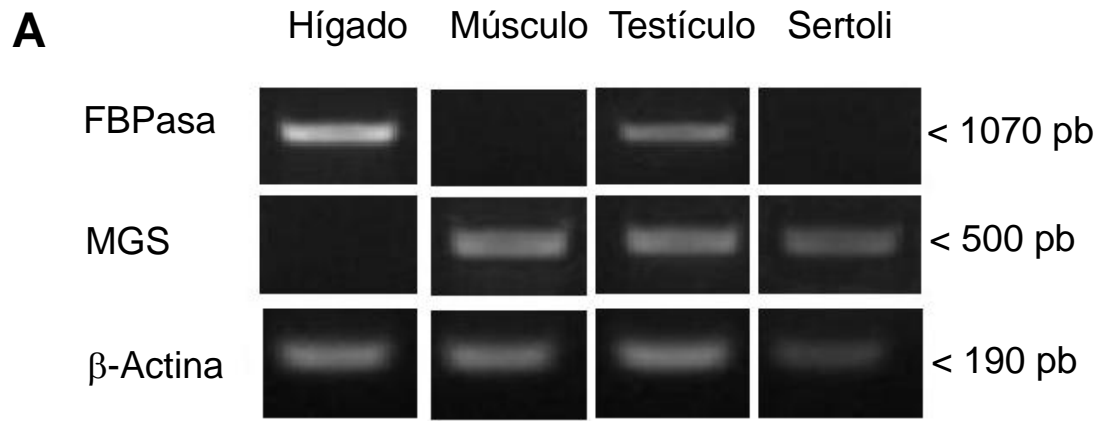


Figura 4. Expresión de Glucógeno Sintasa y Fructosa-1,6-Bisfosfatasa en testículo de ratón y en línea celular de Sertoli 42GPA9.

Los carriles corresponden a: 1 Hígado, 2 Músculo, ambos usado como control positivo o negativo, según corresponda, 3 Testículo y 4 Sertoli 42GPA9, tanto en el RT- PCR como en los Western Blots. β -Actina fue usado como control de carga.

A) Usando cDNA obtenido a partir de RNA extraído de testículo de ratón y de la línea celular de Sertoli 42GPA9, se evaluó por RT-PCR la expresión de GS y FBPasa. La isoforma de FBPasa expresada en el testículo corresponde a la hepática, mientras que la GS expresada en el órgano y en células de Sertoli 42GPA9 corresponde a la isoforma muscular. Mediante esta técnica no se detectó ningún tipo de FBPasa en la línea celular Sertoli 42GPA9.

B) Western Blots usando extractos proteicos de testículo y de células de Sertoli 42GPA9, usando un anticuerpo anti - FBPasa hepática.

C) Western Blots usando extractos proteicos de testículo y de células de Sertoli 42GPA9, usando un anticuerpo anti – GS de músculo esquelético.

De acuerdo a lo planteado en la introducción, las células sintetizadoras de glucógeno poseen en general la ruta gluconeogénica, debido a que esta es parte de la ruta indirecta de síntesis de glucógeno, la que ha sido demostrada, tanto a nivel muscular (Gleeson, 1996), como hepático (Radziuk & Pye, 2001). Por esta razón, nos preguntamos si las células de Sertoli del epitelio seminífero expresaban FBPasa. Esta idea fue desechada, pues en la figura 5, se observa claramente que FBPasa comienza a expresarse después del día 20 post-natal en testículo.

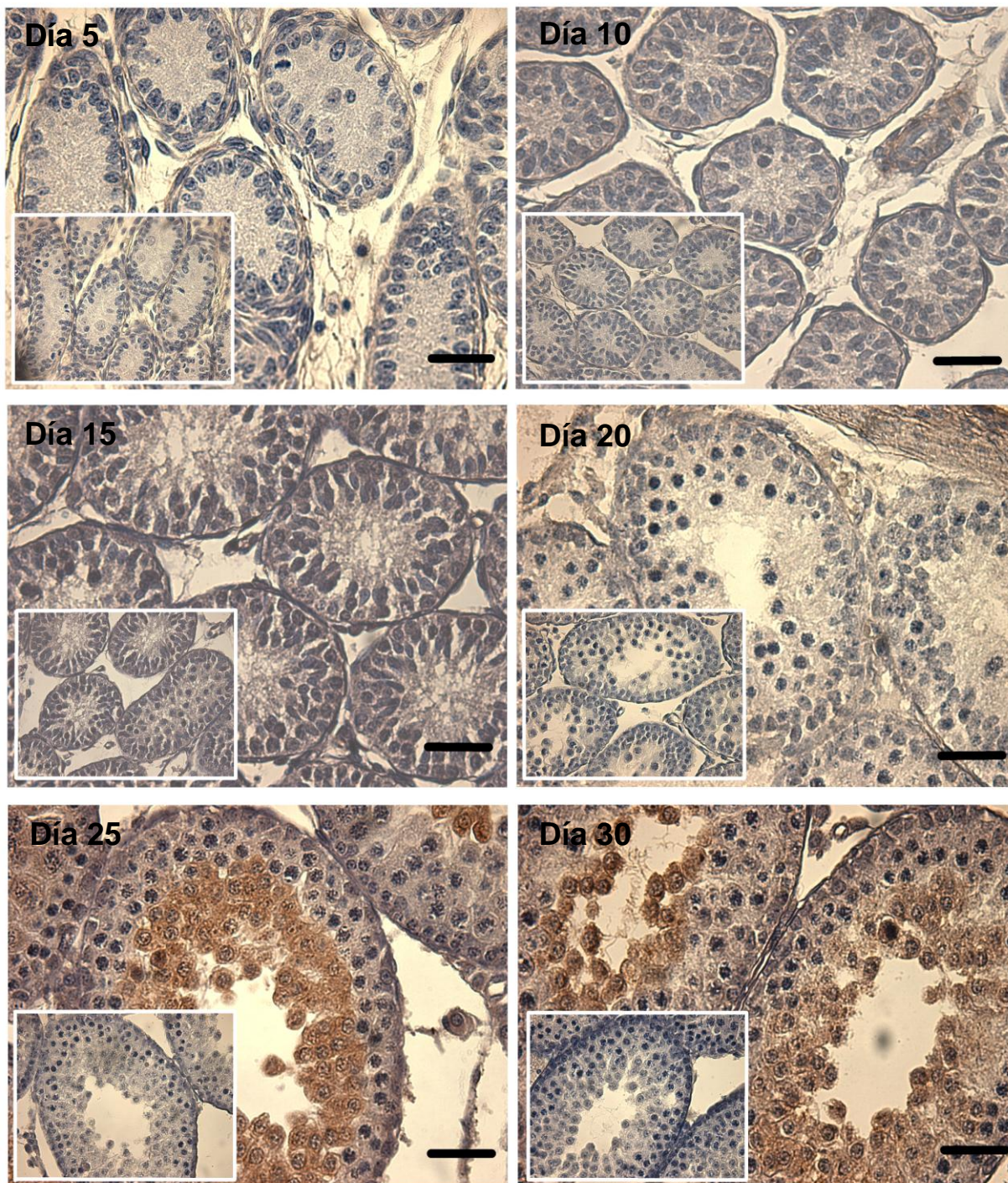


Figura 5. Detección de FBPasa hepática en cortes de testículo de ratón de diferentes edades de desarrollo post-natal.

Detección mediante inmunohistoquímica de FBPasa hepática en cortes de testículo de ratones de diferentes edades de desarrollo post-natal (5, 10, 15, 20, 25 y 30 días). FBPasa fue detectada usando un anticuerpo específico anti - FBPasa de riñón de cerdo. En el recuadro de cada imagen se observa el control negativo para el anticuerpo primario. La barra de magnificación corresponde a 50 μm .

Se corroboró la expresión tardía de FBPasa con un ensayo de PCR en tiempo real (figura 6), en donde se detectó el transcrito de FBPasa a partir del día 22 post-natal. Las células de Sertoli están presentes en todo momento en el túbulo seminífero durante el desarrollo post natal hasta la adultez, mientras que las células germinales en diferentes estados de desarrollo comienzan a poblar el epitelio del túbulo seminífero a medida que avanza el desarrollo testicular. Los días en que se observa expresión de FBPasa corresponden a la aparición de las primeras espermátidas (Zhengwei *et al.* 1990).

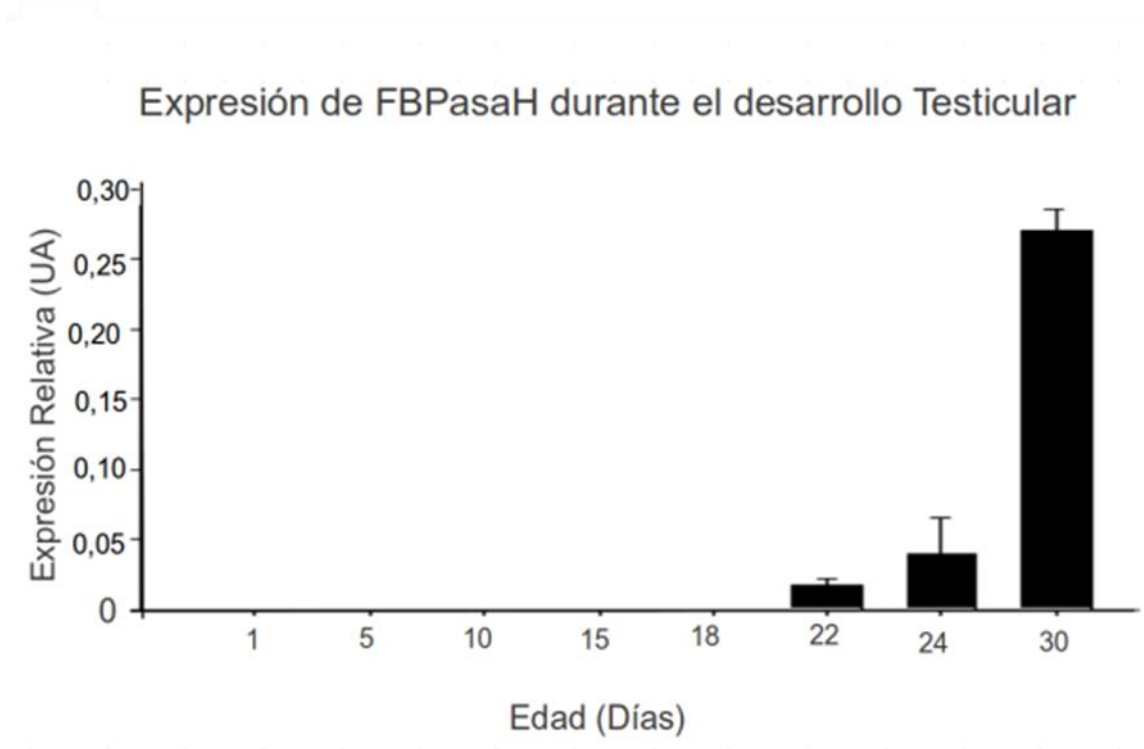


Figura 6. Expresión relativa de FBPasa hepática en testículos de ratones en diferentes edades de desarrollo post-natal. RT-PCR en tiempo real en el que se usaron partidores específicos para la FBPasa hepática. Los cDNAs se obtuvieron a partir de RNA extraído de testículos de ratones de diferentes edades de desarrollo post-natal.

Se hizo un ensayo de actividad de FBPasa en extractos proteicos de células de Sertoli 42GPA9 para descartar la posibilidad de que exista alguna isoforma de FBPasa que no sea detectada por PCR o por Western blot (Figura 7). No se detectó actividad, descartando la existencia de una nueva isoforma de FBPasa. Estos resultados apoyan la idea de que FBPasa no se expresa en células de Sertoli y que comienza a expresarse en las células germinales más diferenciadas, cercanas a lumen del túbulo seminífero, debido a que se detectó actividad de la enzima en extracto proteico de testículo, utilizado como control.

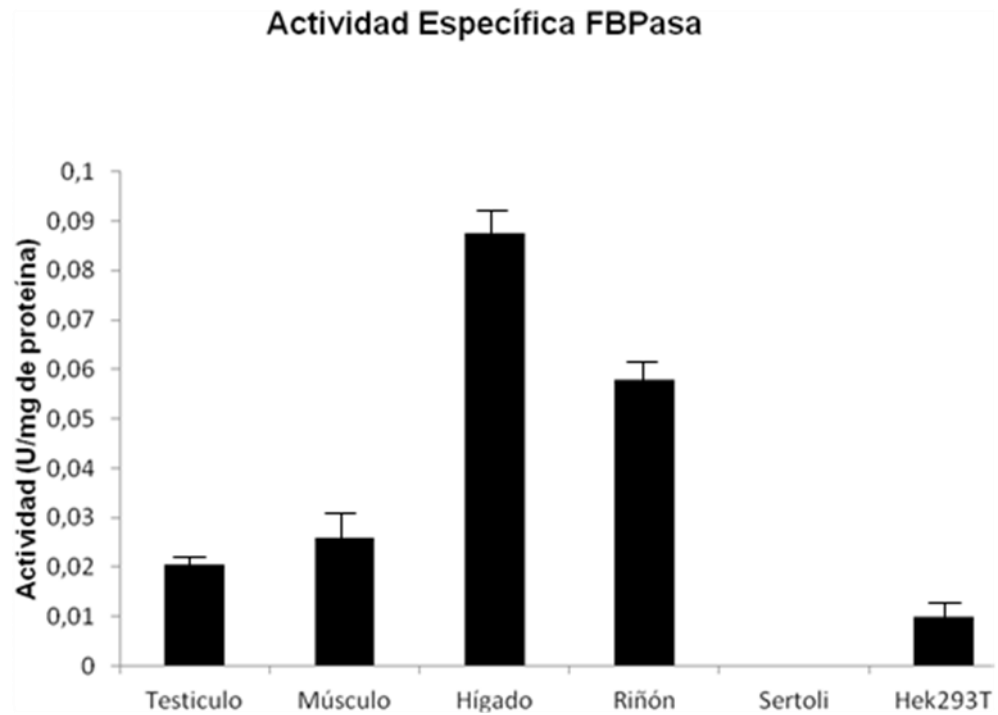


Figura 7. Actividad FBPasa en células de Sertoli 42GPA9. Se midió la actividad FBPasa a partir de extracto de proteínas de células de Sertoli 42GPA9 cultivadas en medio DMEM-F12. Se usaron como controles extractos de testículo, hígado, músculo, riñón y de células HEK293T. (n= 2)

La isoforma muscular de GS es expresada en testículo a partir del primer día de vida del ratón, como se observa en las figuras 8 y 9. Al día 5 post-natal, se evidencia un aumento en la expresión de MGS (figura 9), lo que podría estar relacionado con la aparición de las primeras espermatogonias del tipo A en el epitelio seminífero (Vergouwen *et al.*, 1991).

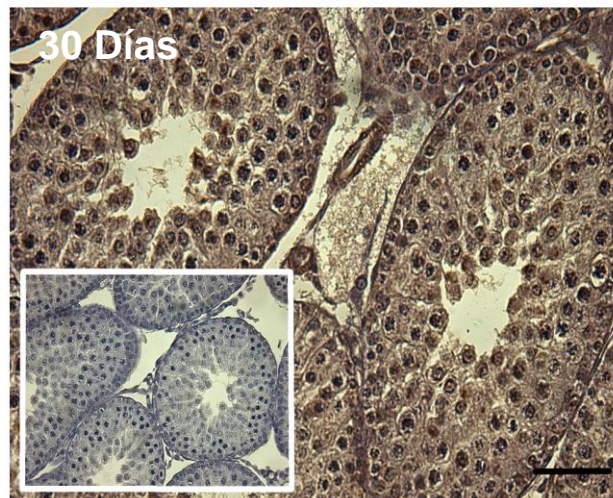
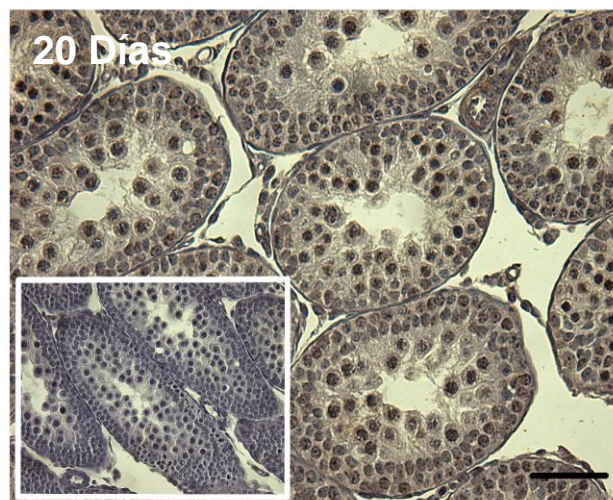
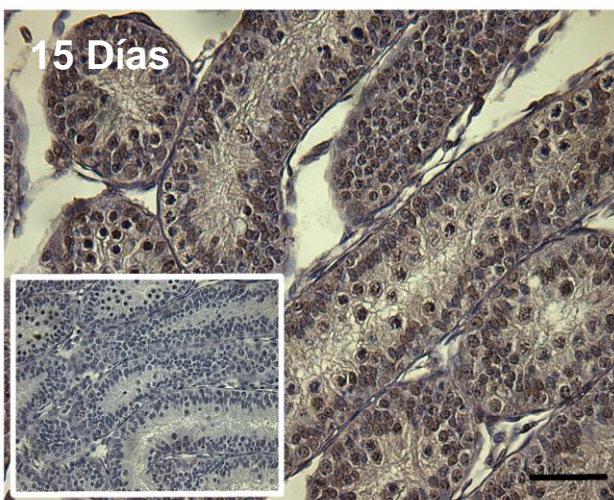
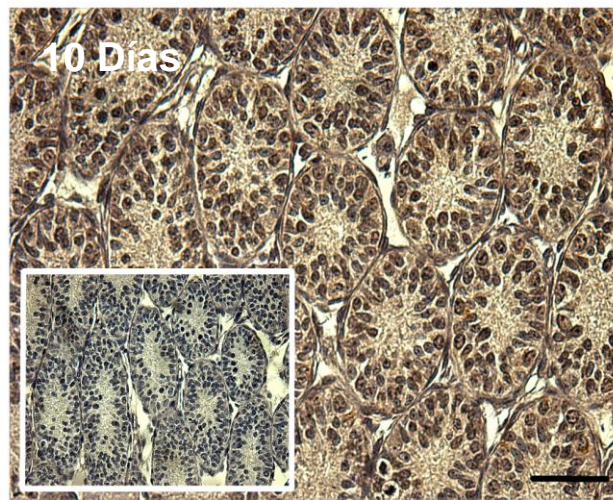
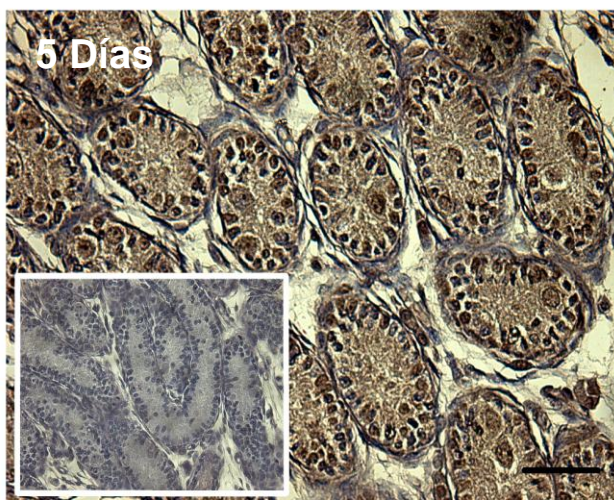


Figura 8. Detección de GS de músculo esquelético en cortes de testículo de ratón de diferentes edades de desarrollo post-natal.

Detección mediante inmunohistoquímica de GS de músculo esquelético en cortes de testículo de ratones de diferentes edades de desarrollo post-natal (5,10,15, 20, 25 y 30 días). La GS muscular fue detectada usando un anticuerpo específico anti - MGS. En el recuadro de cada imagen se observa el control negativo para el anticuerpo primario. La barra de magnificación corresponde a 50 μm .

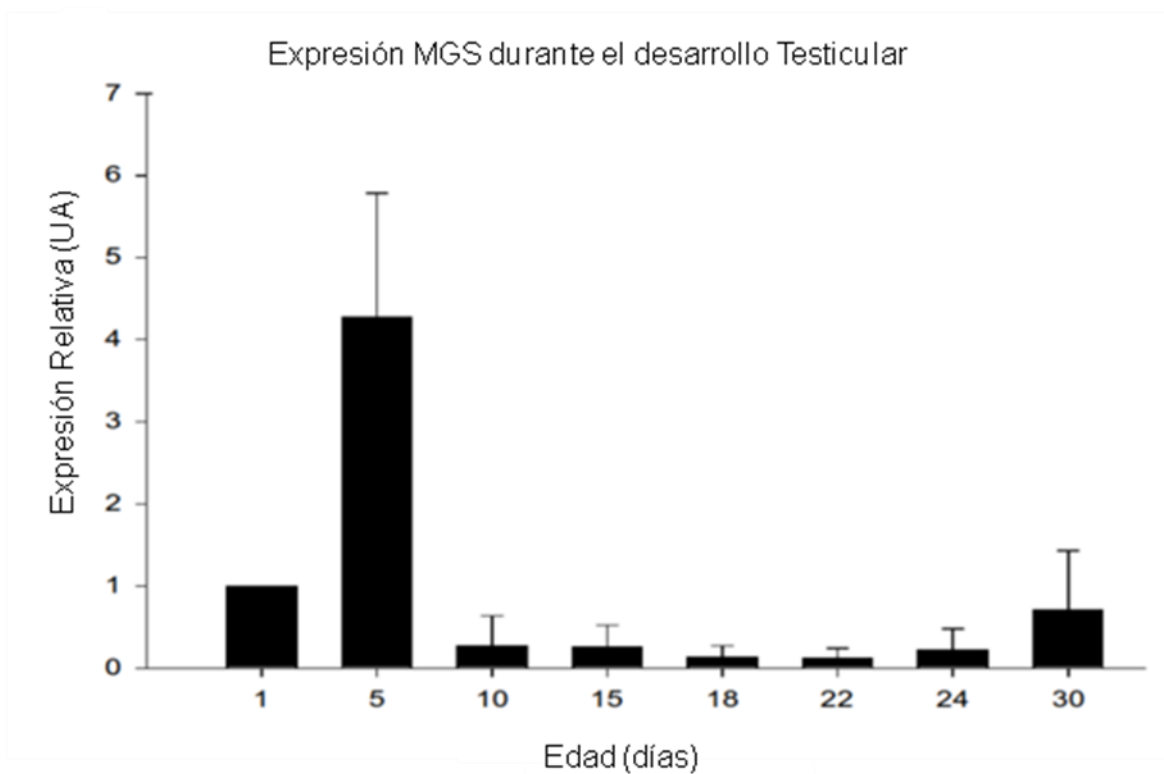


Figura 9. Expresión relativa de MGS en testículos de ratones en diferentes edades de desarrollo post-natal. Ensayo de RT-PCR en tiempo real usando partidores específicos para FBPasa hepática (FBPasaH). Los cDNAs se obtuvieron a partir de RNA extraído de testículos de ratones de diferentes edades de desarrollo post-natal.

4.2 Efecto de la concentración de glucosa en el medio de cultivo sobre la localización subcelular de MGS en célula de Sertoli 42GPA9.

Al determinar que las células de Sertoli no poseen la enzima FBPasa, se prosiguió el estudio sobre los posibles cambios de localización subcelular que puede experimentar la enzima MGS bajo diferentes estímulos. Para esto se usó la línea de célula de Sertoli 42GPA9. Primero, las células fueron cultivadas en ausencia de glucosa durante 13 h, para luego agregar al cultivo glucosa a una concentración final de 5 mM durante 7 h adicionales, y otro cultivo fue dejado sin glucosa durante esas 7 h hasta completar las 20 h (figura 10). Luego se inmunodetectó la MGS y el glucógeno usando anticuerpos específicos para cada uno. En estudios anteriores hechos en células musculares, se ha observado que al cultivar estas células en un medio libre de glucosa, utilizan el glucógeno almacenado como fuente de energía y la MGS es capaz de translocar hacia el núcleo (Cid *et al.*, 2005). Sin embargo, esto no ocurre en la célula de Sertoli 42GPA9 a pesar de estar 20 h privadas de glucosa. La cantidad de glucógeno en las células no disminuye notoriamente y la enzima se mantiene en el citoplasma (Figura 10, panel superior). En presencia de glucosa, la MGS tiende a agruparse en el citoplasma, aunque la variación no es muy notoria. También se observa una pequeña cantidad de MGS a nivel nuclear en todo momento (en ausencia o presencia de glucosa). Como era de esperar, la colocalización entre MGS y el glucógeno celular aumenta en presencia de glucosa (figura 10, panel inferior).

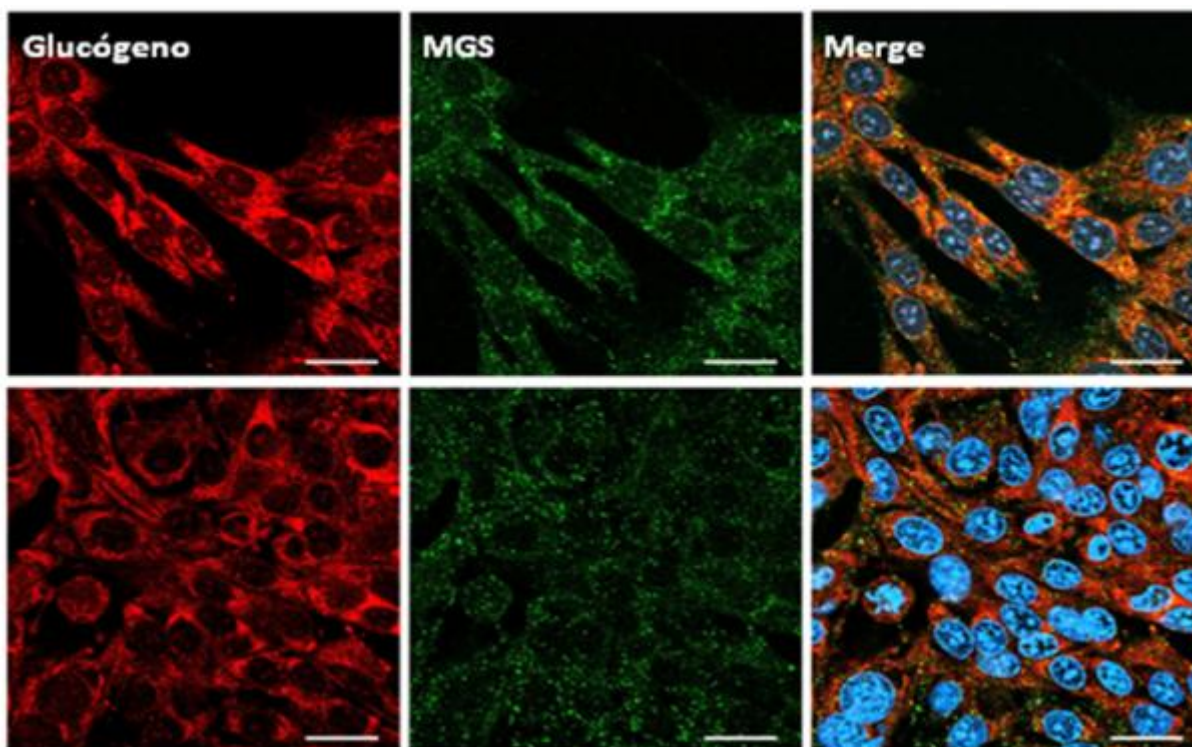


Figura 10. Inmunodetección de glucógeno y MGS en células de Sertoli cultivadas sin o con baja glucosa. Las células de Sertoli 42GPA9 fueron cultivadas en ausencia de glucosa durante 13h, para luego agregar 5 mM glucosa al cultivo (arriba) o mantener sin glucosa (abajo) durante 7h adicionales, hasta completar 20h. Luego de fijar las células, se realizó una inmunodetección utilizando anticuerpos específicos anti – glucógeno (rojo) y anti – MGS (verde). Los núcleos fueron teñidos con TOPRO3 (azul). La barra de magnificación corresponde a 25 μ m.

Se hizo otro ensayo cultivando las células en medio RPMI sin glucosa o cultivadas con medio DMEM F12 suplementado con FBS al 10% (17,5 mM de glucosa) y el resultado es el mismo al anterior. En presencia de una alta cantidad de glucosa y en ausencia de esta, la localización subcelular de MGS no varía notoriamente (figura 11).

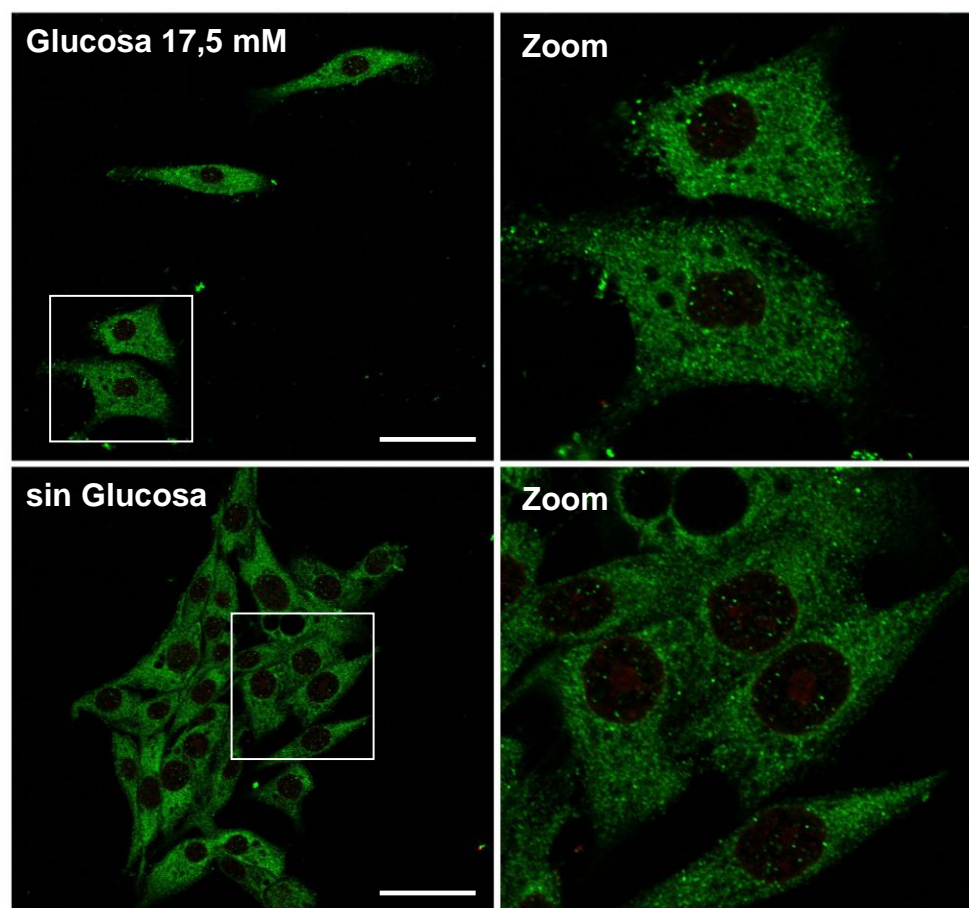


Figura 11. Inmunolocalización de MGS en células de Sertoli 42GPA9 cultivadas sin glucosa o con alta glucosa. Las células de Sertoli 42GPA9 fueron cultivadas en medio DMEM F12 (glucosa 17,5 mM) o en Medio RPMI sin glucosa. Luego de fijar las células, se inmunodetectó MGS (verde) con un anticuerpo específico. La barra de magnificación corresponde a 25 μm . El recuadro de cada imagen se amplificó y se muestra en la imagen Zoom respectiva.

4.3 Efecto del Factor de Crecimiento tipo Insulina 1 (IGF-1) en la localización subcelular de MGS en célula de Sertoli 42GPA9.

La insulina e IGF-1 (Insulin-like growth factor 1) son dos péptidos relacionados,, que en general pueden tener diferentes efectos sobre diferentes tipos celulares, y en otros casos, efectos similares. En el caso del metabolismo de glucosa y glucógeno, ambos péptidos poseen un efecto similar, aumentando la glicólisis y la síntesis de glucógeno. (Chistyakoba *et al.* 2003; Park *et al.* 1999; Parkes & Cardell, 1986). Se ha visto en adipocitos y células musculares, que GS activa presenta un cambio en la localización citosólica, agrupándose de manera notoria cerca de la membrana celular y formando agrupaciones punteadas (Ortmeyer *et al.*, 2005; Brady, *et al* 1999; Ou, *et al.*, 2005). Al tratar la células de Sertoli 42GPA9 con IGF-1 (figura 12) no se observa un cambio significativo en la localización subcelular de MGS.

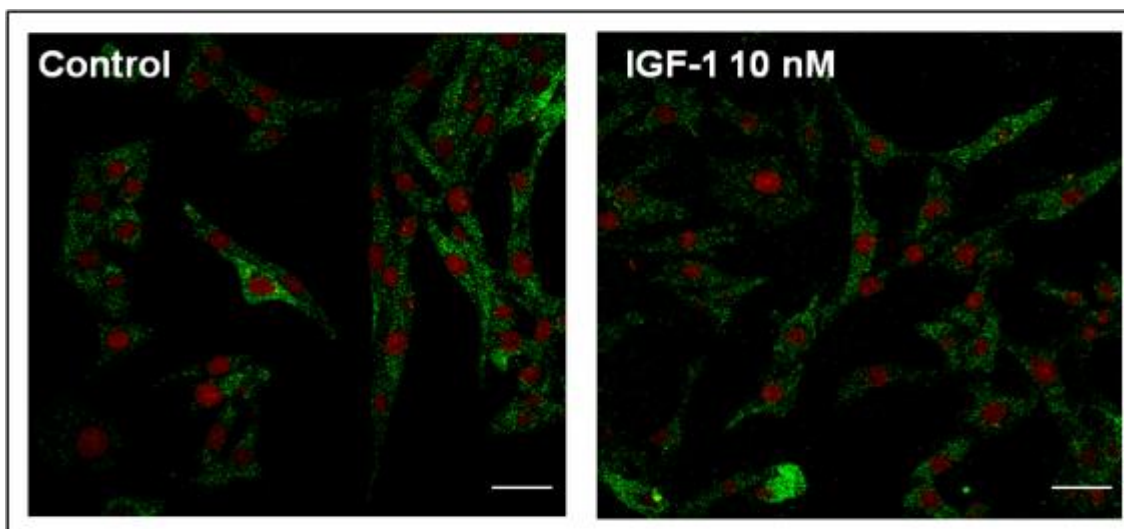


Figura 12. Inmuloalización de MGS en células de Sertoli 42GPA9 tratadas con IGF-

1. Las células fueron cultivadas con medio DMEM F12 en presencia de IGF-1 10nM o en ausencia de este (Control) durante 2h. Luego de fijadas las células, se inmunodetectó MGS usando anticuerpos específicos (verde) y fueron observadas por microscopía confocal. Los núcleos fueron teñidos con yoduro de propidio (rojo). La barra de magnificación corresponde a 20 μ m.

4.4 Efecto del ion litio sobre la localización subcelular de MGS.

MGS puede ser regulada alostéricamente, por G6P, aumentando su actividad, o inactivándola por modificaciones post-traduccionales, específicamente, fosforilaciones. GSK3 β es una proteína serina / treonina capaz de fosforilar MGS y por ende inactivarla. Esta proteína necesita del ion magnesio para funcionar adecuadamente, lo que se ve impedido al encontrarse el ion litio, ya que este es capaz de desplazar al magnesio e inactivar de esta manera GSK3 β (Stambolic *et al*, 1996; Ryves y Harwood, 2002). Se esperaría, por lo tanto que MGS se activase al ser tratada con ión litio con un posible cambio de localización subcelular. MGS total y MGS fosforilada en Ser 641 se observan en gránulos a nivel citosólico al tratar las células de Sertoli con litio (figura 13). Adicionalmente, se usó un anticuerpo específico para la proteína SC35 (figura 13). Esta proteína pertenece a la familia de proteínas SR (ricas en serina y arginina) y forma parte de la maquinaria de *splicing* alternativo (Fu & Maniatis, 1992; Fu, 1995). MGS fosforilada en serina 641 (pSer641MGS) colocaliza con esta proteína en el núcleo, lo que sugiere que pSer641MGS podría ejercer una función distinta en el núcleo. MGS total también se observa dentro del núcleo, pero en menor proporción.

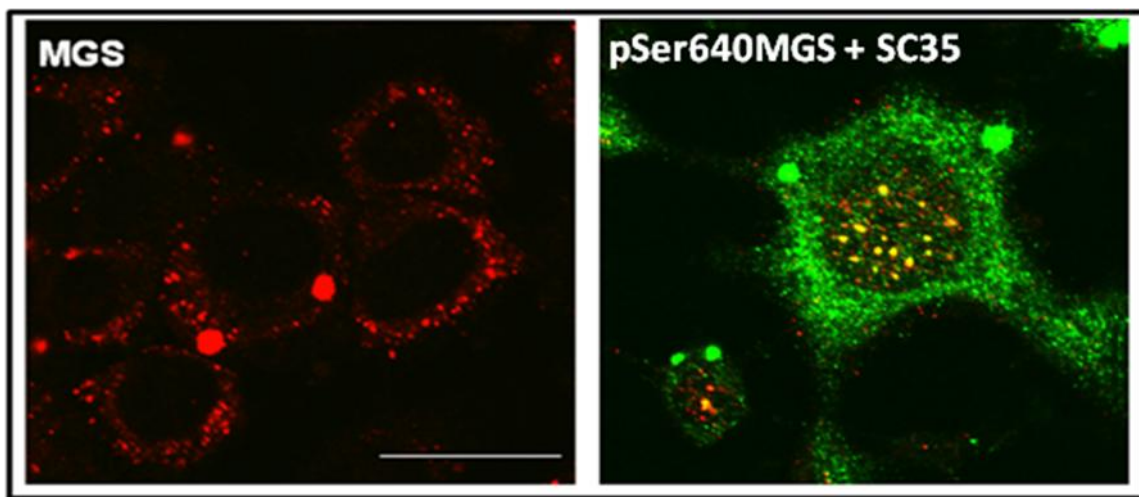


Figura 13. Inmunolocalización de MGS total y fosforilada en serina 640 en células de Sertoli 42GPA9 tratadas con 30 mM LiCl. Las células de Sertoli 42GPA9 fueron cultivadas en presencia de 30 mM de LiCl durante 24h. Luego las células fueron fijadas y se inmunodetectó MGS usando un anticuerpo específico (rojo, imagen a la izquierda) o un anticuerpo que detecta específicamente MGS fosforilada en la Serina 641 de su secuencia aminoacídica (verde, imagen de la derecha). También se detectó la proteína nuclear SC35 usando un anticuerpo específico (rojo, imagen de la derecha). Las barras de magnificación corresponden a 25 μ m.

5. Discusión

De acuerdo a los resultados obtenidos, la isoforma de GS presente en el testículo corresponde a la muscular, de acuerdo con Villarroel-Espindola *et al.* (datos no publicados), y es expresada en testículo a partir del primer día post-natal del ratón. La isoforma de FBPasa es la hepática, de acuerdo con Yáñez *et al.* (2007), y es expresada en testículo de ratón a partir del día 22 postnatal, de acuerdo con los resultados obtenidos en la figura 6.

El Glucógeno es la forma de almacenaje de glucosa más importante en los organismos superiores y, por lo tanto, una rápida forma de obtención de energía. No es extraño, entonces, que siendo la célula de Sertoli encargada de la mantención de las células germinales masculinas durante su desarrollo hasta la formación de espermatozoides, posea altos niveles de Glucógeno. Sin embargo, a pesar de que la ruta gluconeogénica es importante para la formación de glucógeno en varios tipos celulares, como hepatocitos o miocitos, de acuerdo a los resultados obtenidos en este estudio la célula de Sertoli carece de esta ruta, ya que no hay expresión de la enzima reguladora más importante de la vía, la FBPasa, o alguna proteína que posea su actividad. En la figuras 5 y 6 se puede observar que la expresión de FBPasa es detectable a partir de los 20 días, aproximadamente, y comienza a aparecer marca cerca del centro del túbulo seminífero, lo que correspondería a la aparición de las primeras espermátidas, acercándose a la pubertad del ratón. En ratas se ha visto que esto ocurre alrededor del día 25 a 30 post nacimiento (Zhengwei *et al.*, 1990).

Se sabe que el lactato extracelular es esencial para las actividades metabólicas de las células germinales, especialmente para espermatoцитos y espermátidas, debido a que una correcta absorción de ciertos nutrientes (precursores de ácidos nucleicos y proteínas) depende de este sustrato (Jutte *et al.*, 1981), así como la capacitación de espermatozoides (Albarracín *et al.*, 2004), además de que posiblemente sea el mayor aporte energético que reciben las células germinales en los diferentes estados de su desarrollo. Siendo la célula de Sertoli precursora de gran cantidad de lactato que puede ser liberada al medio extracelular (Robinson y Fritz, 1981, Vivarelli *et al.*, 1984), la falta de expresión de FBPasa y la posible inexistencia de una ruta gluconeogénica que esto conlleva, podría ser explicada de forma que no es necesaria la resíntesis de glucosa por la célula de Sertoli, manteniendo energéticamente el proceso de espermatogénesis mediante la liberación de altas cantidades de lactato al medio extracelular, lactato que es captado por las células germinales. A pesar de que se ha visto actividad de Glucosa-6-fosfatasa en varios tipos celulares presentes en el túbulo seminífero, incluyendo la célula de Sertoli (Yokoyama & Chang, 1977, Barham *et al.*, 1976), estudios han demostrado que la cantidad de glucosa liberada al espacio luminal del túbulo seminífero es muy baja, inexistente incluso en algunos tipos de mamíferos (Voglmayr *et al.*, 1966; Wales *et al.* 1966; Jones y Glover, 1973; Turner *et al.*, 1980), lo que puede ser una razón más para que la existencia de la vía gluconeogénica en las células de Sertoli no sea importante para el sistema desarrollado en el túbulo seminífero para la mantención de la espermatogénesis.

Por lo que se observa en las figuras 5 y 6, la expresión de FBPasa testicular en ratón comienza en células germinales en estados de diferenciación avanzados, al

parecer espermátidas primarias. Es posible que una pequeña cantidad de glucosa atraviese la barrera hemato-testicular, lo que crearía un pequeño gradiente que disminuye hacia el lumen del túbulo seminífero. Es por esta razón que células germinales dispuestas en el lado basal del túbulo tienen al parecer una cantidad suficiente de glucosa 6 fosfato, obtenida a partir de la metabolización de glucosa captada del medio extracelular o del glucógeno sintetizado a partir de glucosa adquirida antes de cruzar la barrera hemato-testicular, en el estado de espermatogonia. Pero al continuar con la diferenciación y alejarse de la zona basal, la cantidad de glucosa se hace prácticamente nula, por lo que una forma de obtener glucosa 6 fosfato sería a través de la ruta gluconeogénica, debido a la alta cantidad de lactato presente en el medio extracelular. Por esta razón se hace necesaria la expresión de FBPasa en células germinales en estadios mayores de diferenciación, cercanas al lumen del tubo seminífero. Esta es una idea que necesita una mayor investigación para ser probada.

GS es expresada en testículo desde el primer día post-natal, presentando un *peak* de expresión a los 5 días, lo que correspondería al comienzo de la diferenciación de las espermatogonias. Es posible que esta alza en la expresión de la enzima se deba a la preparación por parte de la célula de Sertoli para cuando la diferenciación de las células germinales esté más avanzada y el lactato suplementado a las células germinales a partir de la glucosa captada del torrente sanguíneo no sea suficiente. Este sería el comienzo de las acumulaciones de glucógeno a nivel testicular, que se sabe que es cíclico. Se ha visto que en testículo de hámster el glucógeno se acumula en las zonas que se encuentran entre las etapas IV y VIII del ciclo del epitelio seminífero (Fouquet & Guha, 1969). Si esto es lo que ocurre en ratón, en estas etapas está finalizando la

diferenciación de los espermatozoides, y las espermátidas aún no comienzan a diferenciarse en espermátidas elongadas. Sin embargo, desde la etapa IX en adelante, comienza la diferenciación de las espermátidas redondas, por lo que es posible que el que la célula de Sertoli use el glucógeno acumulado para la demanda energética que esto conlleva.

La célula de Sertoli es el tipo celular que posee una mayor cantidad de glucógeno en el epitelio seminífero, y como se dijo antes, la acumulación de este glucógeno es cíclico. Tal vez sea esta la explicación del comportamiento diferencial de GS en esta célula al incompararlo con otros tipos celulares sintetizadores de glucógeno. En líneas celulares procedentes de músculo y en cultivos primarios se ha visto que la privación de glucosa y baja de glucógeno intracelular determina la traslocación de le GS hacia el núcleo (Cid *et al.*, 2005) y en adipocitos hay un cambio de localización de GS en respuesta a la estimulación con insulina, en la forma de un patrón punteado en el citoplasma (Ou *et al.* 2004). Sin embargo, de acuerdo a los resultados obtenidos en células de Sertoli 42GPA9, esto no ocurre bajo esos estímulos, a pesar de que al parecer siempre hay una pequeña cantidad de GS a nivel nuclear. Es posible que debido a que la cantidad de glucógeno es cíclica, cambios en la localización subcelular como los anteriormente señalados dependan de otros factores hormonales, como FSH o testosterona, pero no hay estudios al respecto, aunque se sabe que modulan el metabolismo de la glucosa y del glucógeno (Means *et al.* 1980, Walker & Cheng, 1997).

Al tratar las células con LiCl, GS tiende a concentrarse en algunas partes del citoplasma, formando una especie de gránulo, que se puede apreciar en algunas células. Siendo el ión litio capaz de inactivar GSK3 β , lo que activaría a GS para sintetizar

glucógeno, al parecer el estrés provocado por este ión en la célula de Sertoli provocaría la aglomeración de esta enzima (Maldonado et al., datos no publicados). GS inactiva puede ser localizada en el núcleo, en donde se ha visto que hay ciertas cantidades de glucógeno y se ha postulado un rol como estructura de andamiaje (Ragano-Caracciolo *et al.* 2002). En nuestros resultados hemos observado que la GS nuclear colocaliza con la proteína SC35 (figura 13), proteína que compone la maquinaria de splicing, lo que sugiere que GS y tal vez el glucógeno nuclear son parte de esta maquinaria, formando tal vez estructuras de andamiaje.

Como conclusiones, las células de Sertoli no poseen ninguna isoforma de FBPasa o alguna proteína con esta actividad, mientras que otras células que forman parte del epitelio seminífero poseen la isoforma hepática de esta enzima. La isoforma de Glucógeno Sintasa que se encuentra en estas células, y en el epitelio seminífero en general, es la muscular, y a diferencia de lo que ocurre en otros tipos celulares sintetizadores de glucógeno, la localización de MGS no varía bajo distintas condiciones metabólicas.

6. Bibliografía.

- △ Albarracín, J. L., Fernández-Novell, J. M., Ballester, J., Rauch, M. C., Quintero-Moreno, a, Peña, a, Mogas, T., et al. (2004). Gluconeogenesis-linked glycogen metabolism is important in the achievement of in vitro capacitation of dog spermatozoa in a medium without glucose. *Biol Reprod*, 71(5), 1437-45.
- △ Barham, S. B., Berlin, J. D. and Brackeen, R. B. (1976). The fine structural localization of testicular phosphatases in man: the control testis. *Cell Tiss Res* 166, 497-510.
- △ Bourdon, V., Defamie, N., Fenichel, P. and Pointis, G. (1999). Regulation of tissuetype plasminogen activator and its inhibitor (PAI-1) by ipopolyaccharide-induced phagocytosis in a Sertoli cell line. *Exp Cell Res*, 247(2), 367-372.
- △ Bourdon, V., Lablack, A., Abbe, P., Segretain, D. and Pointis, G. (1998).Characterizatio of a clonal Sertoli cell line using adult PyLT transgenic mice. *Biol Reprod*, 58(2), 591-599.
- △ Bouskila, M., Hunter, R. W., Ibrahim, A. F. M., Delattre, L., Peggie, M., van Diepen, J. a, Voshol, P. J., et al. (2010). Allosteric regulation of glycogen synthase controls glycogen synthesis in muscle. *Cell metabolism* 12(5), 456-66. Elsevier Inc.
- △ Brady, M. J., Kartha, P. M., Aysola, A. A., & Saltiel, A R. (1999). The role of glucose metabolites in the activation and translocation of glycogen synthase by insulin in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem*, 274(39), 27497-504.

- △ Chistyakova, O., Kuznetsova, L., & Leibush, B. (2003). Effect of Insulin and Insulin-Like Growth Factor 1 (IGF-1) on Activity of Glycogen Synthase in Skeletal Muscles of the Lamprey *Lampetra fluviatilis*. *J Evol Biochem Physiol*, 39(2), 177–183. Springer.
- △ Cid, E., Cifuentes, D., Baqué, S., Ferrer, J. C., & Guinovart, J. J. (2005). Determinants of the nucleocytoplasmic shuttling of muscle glycogen synthase. *FEBS*, 272(12), 3197-213.
- △ Dym M 1994 Basement membrane regulation of Sertoli cells. *Endocr Rev* 15:102–115
- △ Dzugaj, A. (2006). Localization and regulation of muscle fructose-1,6-bisphosphatase, the key enzyme of glyconeogenesis. *Adv Enzyme Regul*, 46, 51-71.
- △ Fabbrini, A., Re, M., & Conti, C. (1969). glycogen in the normal human testis: a histochemical and histoenzimatic study. *J Endocr*, 43(4), 499.
- △ Fernández-Novell, J. M., Bellido, D., Vilaró, S., & Guinovart, J. J. (1997). Glucose induces the translocation of glycogen synthase to the cell cortex in rat hepatocytes. *BJ*, 321 (Pt 1, 227-31)
- △ Fouquet, J.P. & Guha, S. (1969) Glycogen, phosphorylase and glycogen synthetase in hamster testis during postnatal development. *J Reprod. Fert.* 19, 455.
- △ Fu, X.D. (1995) The superfamily of argenine/serine-rich splicing factors. *RNA*, 1, 663-680.

- △ Fu, X.D. And Maniatis, T. (1992) Isolation of a complementary DNA that encodes the mammalian Splicing factor SC35. *Science*, 256, 535 – 538.
- △ Gleeson, T. T. (1996). Post-exercise lactate metabolism: a comparative review of sites, pathways, and regulation. *Rev physiol*, 58, 565-81.
- △ Hers, H. G and Hue, L. (1983) Gluconeogenesis and related aspects of glycolysis. *Biochemistry. Annu. Rev Biochem.* 52: 617-653.
- △ Jones. R. & Glover, T.D. (1973) The collection and composition of epididymal plasma from the cauda epididymidis of the rabbit. *J Reprod Fert.* 34, 395-403.
- △ Jutte, N.H.P.M., Grootegoed, J.A., Rommerts, F.F.G. & van der Molen, H.J. (1981) Exogenous lactate is essential for metabolic activities in isolated rat spermatocytes and spermatids. *J. Reprod Fert.* 62,399 – 405.
- △ Lablack, A., Bourdon, V., Defamie, N., Batias, C., Mesnil, M., Fenichel, P., Pointis, G. and Segretain, D. (1998). Ultrastructural and biochemical evidence for gap junction and connexin 43 expression in a clonal Sertoli cell line: a potential model in the study of junctional complex formation. *Cell Tiss Res*, 294(2), 279-287.
- △ Means, A., Dedman, J., Tash, J., Tindall, D., Van Sickle, M., & Welsh, M. (1980). Regulation of the Testis Sertoli Cell by Follicle Stimulating Hormone. *Ann rev physiol*, 42(1), 59–70.
- △ Mruk and Cheng, “Sertoli-Sertoli and Sertoli-germ cell interactions and their significance in germ cell movement in the seminiferous epithelium during spermatogenesis”, *Endocr rev*, vol. 25, no. 5, pp. 747-806, Oct. 2004.

- △ Ortmeyer, H. K., Adall, Y., Marciani, K. R., Katsiaras, A., Ryan, A. S., Bodkin, N. L., & Hansen, B. C. (2005). Skeletal muscle glycogen synthase subcellular localization: effects of insulin and PPAR-alpha agonist (K-111) administration in rhesus monkeys. *Am J Physiol.*, 288(6), R1509-17.
- △ Ou, H., Yan, L., Osmanovic, S., Greenberg, C. C., & Brady, M. J. (2005). Spatial reorganization of glycogen synthase upon activation in 3T3-L1 adipocytes. *Endocr*, 146(1), 494-502.
- △ Park, B. C., Kido, Y., & Accili, D. (1999). Differential signaling of insulin and IGF-1 receptors to glycogen synthesis in murine hepatocytes. *Biochem*, 38(23), 7517-23.
- △ Parkes, J., & Cardell, R. (1986). Insulin-like growth factors (IGF I and IGF II) mimic the effect of insulin on plasma protein synthesis and glycogen deposition in cultured hepatocytes. *Biochem biophys Res Comm*, 134(14), 427-435.
- △ Radziuk, J., & Pye, S. (2001). Hepatic glucose uptake, gluconeogenesis and the regulation of glycogen synthesis. *Diab metab res rev*, 17(4), 250-72.
- △ Ragano-Caracciolo M., Berlin W.K., Miller M.W. and Hanover J.A. (2002) Nuclear Glycogen and Glycogen Synthase Kinase 3. *Biochem Biophys Res Comm*, 249 - 2. 422-427
- △ Robinson, R., & Fritz, I. B. (1981). Metabolism of glucose by Sertoli cells in culture. *Biol reprod.*24, 1032-1041.
- △ Stambolic, V., Ruel, L., & Woodgett, J. R. (1996). Lithium inhibits glycogen synthase kinase-3 activity and mimics wingless signalling in intact cells. *CB*, 6(12), 1664-8.

- △ Topper, Y. J., & Hastings, A. B. (1949). A study of the chemical origins of glycogen by use of C14-labeled carbon dioxide, acetate, and pyruvate. *J Biol Chem*, 179(3), 1255.
- △ Turner, T. T., D'Addario, D. a, & Howards, S. S. (1980). [3H]3-O-methyl-D-glucose transport from blood into the lumina of the seminiferous and epididymal tubules in intact and vasectomized hamsters. *J reprod fert*, 60(2), 285-9.
- △ Van Schaftingen E., *Adv Enzymol Relat Areas. Mol Biol* 59 (1987) 315-395.
- △ Vergouwen RPFA, Jacobs SGPM, Huiskamp R, et al. (1991) Proliferative activity of gonocytes, Sertoli cells and interstitial cells during testicular development in mice. *J Reprod Fertil* 93, 233–243.
- △ Villar-Palasi,C. And Guinovart,J. J., (1997) The role of glucose 6-phosphate in the control of glycogen synthase, *FASEB J*.11,544-558
- △ Vivarelli, E., Stefanini, M., & Siracusa, G. (1984). Pyruvate and lactate production by cultured Sertoli cells, fibroblasts and muscle satellite cells, and the effect of hormonal and dcAMP stimulation. *Cell Biol Int*, 8(9), 739–746.
- △ Voglmayr, J.K., Waites, G.M.H. & Setchell, B.P. (1966) Studies on spermatozoa and fluid collected directly from the testis of the conscious ram. *Nature, Lond.* 210, 861.
- △ Wales, R.G., Wallace, J.C. & White, I.G. (1966) Composition of bull epididymal and testicular fluid. *J. Reprod. Fert.* 12, 139-144.
- △ Walker, W. H., & Cheng, J. (1997). FSH and testosterone signaling in Sertoli cells. *Reprod.* ISSN 1470–1626.

- △ Weber JE, Russell LD, Wong V, Paterson RN (1983) three dimensional reconstruction of a rat stage V Sertoli cell. II. Morphometry of Sertoli-Sertoli and Sertoli-germ cell relationships. *Am J Anat* 167, 163–179
- △ Wong V, Russell LD (1983) Three-dimensional reconstruction of a rat stage V Sertoli cell. I. Methods, basic configuration, and dimensions. *Am J Anat* 167, 143–161
- △ Yáñez, A. J., Bustamante, X., Bertinat, R., Werner, E., Rauch, M. C., Concha, I. I., Reyes, J. G. (2007). Expression of key substrate cycle enzymes in rat spermatogenic cells: Fructose 1, 6 bisphosphatase and 6 phosphofructose 1-kinase. *J Cell Physio*, 212(3), 807–816.
- △ Yáñez, A. J., Garcia-Rocha, M., Bertinat, R., Droppelmann, C., Concha, I. I., Guinovart, J. J., & Slebe, J. C. (2004). Subcellular localization of liver FBPase is modulated by metabolic conditions. *FEBS letters*, 577(1-2), 154-8.
- △ YOKOYAMA, M., & CHANG, J. P. (1977). Cytochemical study of glucose-6-phosphatase in chinese hamster testis. *Biol Reprod*, 17(2), 265.
- △ Zhengwei, Y. Wreford, N. G. and De Kretser D. M. (1990). A Quantitative Study of Spermatogenesis in the Developing Rat Testis. *Biol Reprod* 43: 629-635