



Centola, Cecilia Lucía

Participación de la glucólisis y la glutaminólisis en la regulación por FSH de la proliferación de la célula de Sertoli inmadura



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Argentina.
Atribución - No Comercial - Sin Obra Derivada 2.5
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.5/ar/>

Documento descargado de RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes de la Universidad Nacional de Quilmes

Cita recomendada:

Centola, C. L. (2026). *Participación de la glucólisis y la glutaminólisis en la regulación por FSH de la proliferación de la célula de Sertoli inmadura. (Tesis de doctorado). Universidad Nacional de Quilmes, Bernal, Argentina. Disponible en RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes <http://ridaa.unq.edu.ar/handle/20.500.11807/6179>*

Puede encontrar éste y otros documentos en: <https://ridaa.unq.edu.ar>

Participación de la glucólisis y la glutaminólisis en la regulación por FSH de la proliferación de la célula de Sertoli inmadura

TESIS DOCTORAL

Cecilia Lucía Centola

ceciliacentola@gmail.com

Resumen

Las células de Sertoli proveen soporte estructural y nutricional a las células germinales en desarrollo, y su número final —alcanzado durante etapas proliferativas— determina la capacidad espermatogénica en el individuo adulto. La hormona FSH es clave en este proceso, ya que estimula la proliferación de estas células mediante la activación de la vía mTORC1, integrando señales hormonales y metabólicas en pos de regular el crecimiento celular. En este contexto, la disponibilidad de nutrientes y la participación de rutas metabólicas —especialmente la glucólisis y la glutaminólisis— cumplen un rol fundamental al aportar intermediarios necesarios para la síntesis de macromoléculas y la progresión del ciclo celular.

La tesis demuestra que existe una estrecha relación entre el metabolismo y la proliferación en las células de Sertoli inmaduras, evidenciando que la FSH no solo promueve la división celular, sino también la activación de la glucólisis y la glutaminólisis, necesarias para activar la vía mTORC1. Este trabajo de tesis contribuye de manera significativa al conocimiento sobre la fisiología de la célula de Sertoli inmadura, destacando la importancia de los mecanismos metabólicos en el desarrollo testicular temprano. Esta tesis busca extender su aporte inicial hacia la comprensión de los factores y mecanismos moleculares que, en etapas tempranas de la vida, son esenciales para una función reproductiva masculina normal y, por lo tanto, para la fertilidad futura



Participación de la glucólisis y la glutaminólisis en la regulación por FSH de la proliferación de la célula de Sertoli inmadura

Autora: Lic. Cecilia Lucia Centola

Directora: Dra. María Noel Luján Galardo

Codirectora: Dra. Silvina Beatriz Meroni

Tesis presentada para optar por el título de Doctora en Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional de Quilmes

Centro de Investigaciones Endocrinológicas
Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas



2025

¡Ánimo, jóvenes investigadores!
No os dejéis intimidar por las dificultades que encontraréis al
estudiar una parte tan importante del conocimiento médico.

Enrico Sertoli

Discurso inaugural de la apertura del año escolar 1872-73
R. Escuela Superior de Medicina Veterinaria de Milán.
Archivo de la Real Escuela Superior de Medicina Veterinaria. 1872.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo de tesis es el resultado de todas las personas que me acompañaron durante el doctorado y, aunque me quede corta, estos breves agradecimientos tratarán de poner en palabras algo de todo lo que significó que me apoyaran a lo largo de este camino.

En primer lugar, quiero decir que esta tesis es fruto del trabajo colectivo de todo el laboratorio de Biología Celular Gonadal del CEDIE, cuyos integrantes han sabido hacer del ambiente laboral un lugar de aprendizaje, de escucha, de intercambio, de llanto, de risas, de lucha y, por supuesto, de mucho trabajo también. Es por ello que mi primer gran GRACIAS es para ellos, porque sin el trabajo en equipo no hubiera sido posible. Asimismo, me gustaría agradecer especialmente:

En particular, quiero agradecer a Noe por confiar en mí y guiarme en este camino como mi directora. Fueron años de mucho sacrificio y aprendizaje constante, no solo desde lo técnico y lo teórico, sino también desde la perseverancia y el trabajo en equipo. ¡Gracias por no soltarme nunca la mano y por acompañarme en cada decisión!

Gracias a Silvi por acompañarme a lo largo de este recorrido, no solo desde su rol como codirectora, sino también desde su escucha atenta, porque el doctorado es una etapa de gran aprendizaje desde lo profesional, pero eso también implica un gran crecimiento desde lo personal.

A Mari, con quien supe construir una amistad valiosísima, GRACIAS, porque el día a día no hubiera sido lo mismo sin vos. Gracias por compartir desde los resultados hasta las salidas y las marchas, por abrirme las puertas de tu casa desde el día cero aún sin conocernos tanto, por la escucha diaria, el abrazo reparador, la bronca compartida. ¡Gracias, amiga!

A Fer, gracias por los consejos, las devoluciones y los puntos de vista en el trabajo de estos años y, sobre todo, por estar en los detalles de la escritura y corrección de este trabajo.

A Eli, María del Carmen, Agos y Gus, por su guía y su compañía durante los primeros años del doctorado.

Gracias a Trini, Merce, Maryan, Eve y Dorita, por ayudarme en las tareas diarias del laboratorio y por hacer más ameno el trabajo de todos los días.

También quiero agradecer a mis compañeras del equipo docente de Bioquímica de la Universidad Austral, en especial a Selva, Silvi y Mai. Gracias por confiar en mí y darme el

espacio para desarrollar mi quehacer docente y acompañarme en el proceso. En este sentido, también quiero agradecer a mis compañeros del profesorado de la UTN, por transitar juntos esos años en los que descubrí un mundo fascinante y desafiante. Creo que la docencia tiene algo que no tiene ninguna profesión, porque educar es un montón; y ni siquiera puedo poner en breves palabras todo lo que ello implica, pero lo que sí puedo decir es que dar clase fue de lo más lindo que hice durante estos años.

Gracias a mi familia de sangre, en especial a mis viejos, por estar en todas las formas en las que se puede estar, siempre. A Vico y Agustino, primas-hermanas-compañeras del bien, por el sostén, la escucha, por la manija, la rosca, las charlas filosóficas con mate o cerveza de por medio, por calmar las ansiedades y abrirme los ojos y el corazón a otras realidades, a otros modos de vida. Gracias por ser las mejores tías que Pepita y Malinkus podrían tener.

A Juanma, un compañero en todo sentido. Gracias por el amor y la contención, por elegirnos todos los días.

A mi familia elegida, mis amigos, GRACIAS, porque sin ustedes nada de esto podría haber sido sostenible en el tiempo. Afortunadamente, son muchos para nombrarlos a todos. Pero cada uno de ustedes sabe lo importantes que han sido y que son, y lo mucho que agradezco que estén en mi vida. A mis amigos de la danza, del fútbol, de la vida.

En este contexto, quiero agradecer especialmente a mis compañeros de cursada y amigos de mi paso por la UNQ: Fede, Agus, Leti, Mela, Javi, Vale, Juli, Nani, Xime, Ro, Lauri. Con ellos me entiendo cuando digo que fueron años intensos, en los cuales nos acompañamos, desde el primer cuatrimestre de 2012, hasta la defensa de esta tesis, y espero que por mucho más. ¡GRACIAS, porque no hubiera sido lo mismo sin ustedes! Qué felicidad sabernos, ahora, colegas.

Gracias a Romi, la mejor tutora que los doctorandos de la UNQ podríamos tener. Por la paciencia, la predisposición, el trato amable y por alentarnos a no bajar los brazos.

Por último, quiero agradecer al Centro de Investigaciones Endocrinológicas “Dr. César Bergadá” por brindarme el espacio y los equipos para poder llevar a cabo el plan de esta tesis, al CONICET por financiarlo y a la Universidad Pública, porque de otro modo, no hubiera podido llegar hasta acá.

ABREVIATURAS

2DG	2-desoxi-D-glucosa
³ H	Tritio
3PO	3-(3-piridinil)-1-(4-piridinil)-2-propen-1-ona
5'-TOP	Motivos de oligopirimidina en extremo 5' terminal
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico copia
ADP	Adenosina 5'-difosfato
AMH	Hormona anti mülleriana
AMP	Adenosina 5'-monofosfato
AMPc	Adenosina 3', 5'-monofosfato cíclico
AMPK	Proteína quinasa activada por AMP
AR	Receptor de andrógenos
ARE	Elementos de respuesta a los andrógenos
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ATP	Adenosina 5'-trifosfato
BHT	Barrera hemato-testicular
BrdU	5-bromo-2-desoxiuridina
BSA	Albúmina de suero bovino
CCND1	Ciclina D1
CCND2	Ciclina D2
CDK	Proteína quinasa dependiente de ciclina
c-Myc	Proteína codificada por el oncogén de mielomatosis celular
CO ₂	Dióxido de carbono
CRE	Elementos de respuesta al AMPc
CREB	Proteína de unión a sitios CRE
Cys	Residuo de cisteína
dbAMPc	N6, 2'-O-dibutiril adenosina monofosfato cíclico
DE	Desvío estándar
Deptor	Proteína con dominio DEP
DHAP	Dihidroxiacetona fosfato
dNTPs	Desoxirribonucleótidos trifosfato
DON	6-Diazo-5-oxo-L-norleucina

E2	17 β -estradiol
EDTA	Ácido etilendiamino tetraacético
eIF4E/eIF4G	Factor de inicio de la traducción 4E/4G de eucariotas
eIF4E-BP1	Proteína de unión 1 al factor de iniciación eIF4E
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
EGTA	Ácido etilen glicol tetra acético
ERK1/2	Proteína quinasa dependiente de señales extracelulares
ER α /Er β	Receptor nuclear clásico de estrógeno alfa/beta
FOXO	Miembro de la clase O de factores de transcripción <i>box forkhead</i>
Fru-2,6-P2	Fructosa 2,6-bifosfato
FSH	Hormona folículo estimulante
FSHR	Receptor específico de FSH
FSHRKO	KO del FSHR
GAP	Proteínas activadoras de GTPasas
GAPDH	Enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GATA3	Factor de transcripción que reconoce promotores con secuencias centrales G-A-T-A
GDP	Guanosina 5'-difosfato
GLS	Enzima glutaminasa
GLUT1	Transportador de glucosa 1
Glc-6-P	Glucosa-6-fosfato
GLUD/GDH	Enzima glutamato deshidrogenasa
GnRH	Hormona liberadora de gonadotropina
GoTaq [®]	Enzima termoestable de <i>Thermophilus aquaticus</i>
GPCR	Superfamilia del receptor acoplado a proteína G
GPNA	γ -glutamil-p-nitroanilida
GS	Enzima glutamina sintetasa
GSK3 β	Enzima glucógeno sintasa quinasa 3 β
GTP	Guanosina 5'-trifosfato
GTPasa	Guanosina trifosfatasa
G β L/ mLST8	Proteína 8 letal para mamíferos con Sec13
Hepes	Ácido sulfónico del N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etano
HIF	Factor de transcripción inducido por hipoxia
HK	Enzima hexoquinasa
Hpg	Hipoganodotrófico

IDH	Enzima isocitrato deshidrogenasa
IGF-1/IGF-2	Factores de crecimiento similares a la insulina I y II
IGF-1R	Receptor de IGF-1
InsR	Receptor de insulina
IRS	Sustrato del receptor de insulina
Ki-67	Antígeno Kiel 67
KO	<i>knock-out</i>
Lac	Lactato
LDH	Enzima lactato deshidrogena
L-gln	L-glutamina
L-glu	L-glutamato
L-leu	L-leucina
Lys	Residuo de lisina
MAX	Factor X asociado a c-Myc
MCT	Transportador de monocarboxilatos
mSln1	Proteína 1 que interactúa con la quinasa Map activada por estrés
mTOR	Subunidad catalítica del mTORC1
mTORC1	Complejo blanco de acción de la rapamicina en mamíferos 1
mTORC2	Complejo blanco de acción de la rapamicina en mamíferos 2
NAD ⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido oxidado
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido reducido
N-Myc	Factor de transcripción c-Myc asociado al neuroblastoma
NOX4	Isoforma 4 de la NADPH oxidasa
ns	No significativo
ONPG	Orto-nitrofenil-β-D-galactopiranosido
OXA	Oxamato
OXGR1	Receptor de membrana 1 de 2-oxoglutarato
P45019A1	Enzima aromatasa citocromo P45019A1
p70S6K	Quinasa de la proteína ribosomal S6 de 70 kDa
PBS	Solución reguladora salina de fosfato
PCNA	Antígeno nuclear de células proliferantes
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PFK1	Enzima 6-fosfofructo-1-quinasa
PFKFB	Enzima 6-fosfofructo-2-quinasa/fructosa-2,6-bifosfatasa
PI3K	Enzima fosfatidilinositol 3-quinasa

PKA	Proteína quinasa dependiente de AMPc
PKB/Akt	Proteína quinasa B
PKM2	Isoforma muscular 2 de la enzima piruvato quinasa
PRAS40	Sustrato de Akt rico en prolina de 40 kDa
pRb	Proteína relacionada al retinoblastoma
Protor	Proteína de unión a Rictor 1 y 2
PTMC	Células mioides peritubulares
PVDF	Difluoruro de polivinilideno
RA	Ácido retinoico
Rag	Proteína G monomérica
Rap	Rapamicina
Raptor	Proteína asociada a la regulación de mTOR
Rheb	Proteína G monomérica
Rictor	Proteína de andamiaje insensible a la rapamicina
ROS	Especies reactivas del oxígeno
RT-qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
S6	Proteína que forma parte de la subunidad 40S de los ribosomas
SCARKO	KO del receptor de andrógenos condicional a la célula de Sertoli
SDS	Dodecilsulfato de sodio
Ser	Residuo de serina
SLC	Transportador de solutos
T3	Triyodotironina
T4	Tetrayodotironina
TBE	Solución reguladora Tris-Borato-EDTA
TBS	Solución reguladora Tris salina
TBS-T	TBS con tween
TGF- β	Factor transformante de crecimiento beta
TH	Hormona tiroidea
Thr	Residuo de treonina
Tit1/Tel2	Complejo de proteínas de andamiaje
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
Tris-HCl	Tris (hidroximetil) aminometano-ácido clorhídrico
TSC1/TSC2	Complejo de esclerosis tuberosa
Tyr	Residuo de tirosina
α -KG	α -cetoglutarato

β 2M

β 2-Microglobulina

UNIDADES

ng	Nanogramo
μ g	Microgramo
mg	Miligramo
g	Gramo
μ M	Micromolar
mM	Milimolar
M	Molar
μ l	Microlitro
ml	Mililitro
L	Litro
xg	Veces de aceleración de la gravedad
$^{\circ}$ C	Grados centígrados
UI	Unidad Internacional
kDa	Kilodalton
nm	Nanómetro
μ m	Micrómetro
P/P	Relación peso-peso
P/V	Relación peso-volumen
cm ²	Centímetros cuadrados
h	Horas

INTRODUCCIÓN.....	1
ASPECTOS HISTÓRICOS.....	1
CARACTERÍSTICAS DEL TESTÍCULO.....	2
CARACTERÍSTICAS DE LA CÉLULA DE SERTOLI.....	4
PROLIFERACIÓN DE LAS CÉLULAS DE SERTOLI.....	7
CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL CICLO CELULAR.....	10
COMPLEJOS BLANCO DE ACCIÓN DE LA RAPAMICINA EN MAMÍFEROS (mTORC).....	16
REGULACIÓN ENDOCRINA, PARACRINA Y AUTOCRINA DE LA PROLIFERACIÓN DE LA CÉLULA DE SERTOLI.....	22
<i>Factores que estimulan la proliferación.....</i>	<i>23</i>
• Hormona folículo estimulante (FSH).....	23
• Factores de crecimiento de la familia de la insulina.....	28
• Activinas e inhibinas.....	29
<i>Factores que promueven el cese de la proliferación.....</i>	<i>30</i>
• Andrógenos.....	31
• Estrógenos.....	33
• Ácido retinoico.....	34
• Hormonas tiroideas.....	34
CARACTERÍSTICAS METABÓLICAS DE LAS CÉLULAS QUE PROLIFERAN.....	36
<i>Glucólisis aeróbica. Efecto Warburg.....</i>	<i>36</i>
<i>Metabolismo del aminoácido glutamina/glutaminólisis.....</i>	<i>42</i>
<i>Regulación de la función celular por metabolitos.....</i>	<i>47</i>
• Lactato.....	47
• α-cetoglutarato.....	49
OBJETIVOS.....	52

MATERIALES Y MÉTODOS.....	53
MATERIALES.....	53
MÉTODOS.....	54
Aislamiento y cultivo de células de Sertoli de ratas de 8 días de edad.....	54
Determinación de la viabilidad de células de Sertoli de ratas de 8 días de edad.....	55
Extracción de ARN total y síntesis de ADN copia.....	55
Análisis de la expresión de genes por RT-reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR).....	56
Determinación de los niveles de ARNm por PCR cuantitativa (RT-qPCR).....	56
Determinación de los niveles de mTOR y p70S6K fosforiladas.....	59
Determinación de los niveles de lactato.....	60
Determinación de ADN.....	61
Transfección y ensayo de gen reportero luciferasa/actividad β-galactosidasa.....	61
Ensayo de incorporación de BrdU.....	62
Determinación de Ki-67 mediante inmunofluorescencia.....	63
Análisis estadístico.....	64
DISEÑO EXPERIMENTAL.....	65
<i>Diseño para el estudio de la participación de la glucólisis en la regulación de la proliferación por FSH en la célula de Sertoli.....</i>	65
Estudio de la regulación de la expresión de genes involucrados en la vía glucolítica.....	65
Evaluación de los niveles de lactato como metabolito marcador del flujo glucolítico.....	66
Estudio de los niveles de mTOR y de p70S6K fosforiladas.....	66
Estudio de la regulación de la expresión de c-Myc y ciclinas.....	66
Estudio de la regulación de la actividad transcripcional de c-Myc.....	67
Estudio de la regulación de la proliferación celular.....	68

<i>Diseño para el estudio de la participación de la glutaminólisis en la regulación de la proliferación por FSH en la célula de Sertoli</i>	69
Caracterización de la expresión de genes que codifican para proteínas clave del metabolismo de la glutamina.....	69
Estudio de la regulación de la expresión de genes involucrados en la glutaminólisis por FSH.....	69
Estudio la regulación de los niveles de mTOR y de p70S6K fosforiladas.....	70
Estudio de la regulación de la expresión de c-Myc y ciclinas.....	70
Estudio de la regulación de la actividad transcripcional de c-Myc.....	71
Estudio de la regulación de la proliferación celular.....	72
RESULTADOS.....	73
1) PARTICIPACIÓN DE LA GLUCÓLISIS EN LA REGULACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN DE LA CÉLULA DE SERTOLI POR FSH	73
REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE GENES QUE CODIFICAN PARA ENZIMAS GLUCOLÍTICAS CLAVE POR FSH EN LA CÉLULA DE SERTOLI INMADURA	73
Evaluación de la participación de mTORC1 en la regulación de la glucólisis por FSH en células de Sertoli inmaduras.....	77
Evaluación de la participación de mTORC1 en los mecanismos involucrados en la regulación de la proliferación de la célula de Sertoli por FSH.....	80
EFFECTO DE LA INHIBICIÓN DE LA GLUCÓLISIS SOBRE LA FUNCIONALIDAD DE LA CÉLULA DE SERTOLI INMADURA	82
Efecto de la inhibición de PFKFB3 sobre la activación de la vía mTORC1 por FSH en células de Sertoli inmaduras.....	84
Efecto de la inhibición de PFKFB3 sobre la proliferación de la célula de Sertoli estimulada por FSH.....	86

Efecto de la inhibición de LDH sobre la activación de la vía mTORC1 por FSH en células de Sertoli inmaduras.....	90
Efecto de la inhibición de LDH sobre la proliferación de la célula de Sertoli estimulada por FSH.....	92
Participación de la glucólisis en la regulación de la expresión de PFKFB3 y LDHA por FSH en células de Sertoli inmaduras.....	96
PARTICIPACIÓN DEL LACTATO EN LA REGULACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN DE LA CÉLULA DE SERTOLI.....	97
Regulación de la vía mTORC1 por lactato en células de Sertoli inmaduras.....	97
Regulación de la proliferación de la célula de Sertoli por lactato.....	98
2) PARTICIPACIÓN DE LA GLUTAMINÓLISIS EN LA REGULACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN POR FSH EN LA CÉLULA DE SERTOLI.....	103
Caracterización de la expresión de genes que codifican para proteínas clave del metabolismo de la glutamina en la célula de Sertoli inmadura.....	104
REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE GENES QUE CODIFICAN PARA PROTEÍNAS CLAVE DEL METABOLISMO DE LA GLUTAMINA POR FSH EN LA CÉLULA DE SERTOLI INMADURA.....	105
PARTICIPACIÓN DEL AMINOÁCIDO GLUTAMINA EN LA REGULACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN DE LA CÉLULA DE SERTOLI.....	107
Efecto de la privación de glutamina sobre la activación de la vía mTORC1 por FSH en células de Sertoli inmaduras.....	108
Efecto de la privación de glutamina sobre la proliferación de la célula de Sertoli estimulada por FSH.....	110
PARTICIPACIÓN DE LA GLUTAMINÓLISIS EN LA REGULACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN DE LA CÉLULA DE SERTOLI.....	117

Efecto de la inhibición de la glutaminólisis sobre la activación de la vía mTORC1 por FSH en células de Sertoli inmaduras.....	118
Efecto de la inhibición de la glutaminólisis sobre la proliferación de la célula de Sertoli estimulada por FSH.....	119
PARTICIPACIÓN DEL α-CETOGLUTARATO EN LA REGULACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN DE LA CÉLULA DE SERTOLI.....	124
Regulación de la vía mTORC1 en células de Sertoli inmaduras por α-cetoglutarato.....	124
Regulación de la proliferación de la célula de Sertoli por α-cetoglutarato.....	125
DISCUSIÓN.....	128
CONCLUSIONES.....	157
BIBLIOGRAFÍA.....	159

INTRODUCCIÓN

ASPECTOS HISTÓRICOS

Transcurría el año 1865 cuando el fisiólogo e histólogo Enrico Sertoli publicó un artículo titulado *Dell'esistenza di particolari cellule ramificate nei canalicoli seminiferi del testicolo umano*¹. En este trabajo, el investigador —sorprendentemente para la época— describió de manera detallada la morfología de las células que llevarían su nombre y, en base a ello, vaticinó la función de las mismas. En sus artículos posteriores, investigó su posible relación con el desarrollo del complejo proceso de multiplicación y diferenciación celular conocido como espermatogénesis, proceso que dará origen a las gametas masculinas. A pesar de la relevancia del descubrimiento de Sertoli, sus estudios no despertaron interés en la comunidad científica de la época, ya que las investigaciones estaban centradas, en ese entonces, en el estudio del epitelio germinal. No fue hasta principios de la década de 1950 que las investigaciones volvieron a poner el foco en el estudio de estas células, las cuales son uno de los pilares en los que se sustenta la fertilidad masculina.

En la actualidad, es sabido que la espermatogénesis cualitativa y cuantitativamente adecuada solamente es posible en presencia de una célula de Sertoli capaz de brindar un apropiado soporte físico y nutricional a las células germinales en desarrollo. De esta forma, el control de la funcionalidad de la célula de Sertoli es fundamental en el desarrollo del epitelio germinal. Considerando que cada célula de Sertoli es capaz de sustentar un número limitado de células germinales, el número alcanzado durante los períodos proliferativos de dicha célula determinará la capacidad espermatogénica del individuo adulto y, por ende, la función reproductiva masculina. En este contexto, es importante considerar que una menor producción de gametas puede comprometer la fertilidad del adulto.

¹ Traducción: “Sobre la existencia de células ramificadas peculiares en los canalículos seminíferos del testículo humano.”

Si bien ya han pasado ciento sesenta años desde el descubrimiento de la *cellula ramificata* de Enrico Sertoli, y próximamente se habrán alcanzado casi veinte mil trabajos publicados al respecto, aún queda mucho por investigar. Es importante destacar que la gran mayoría de los estudios se centran en los aspectos fisiológicos de células de Sertoli maduras, cuyas características distan mucho de aquellas descritas para la célula de Sertoli inmadura. Hoy en día, no solo es poco lo que se sabe sobre la regulación de la proliferación de la célula de Sertoli inmadura, sino que, además, se desconoce la regulación metabólica en esta etapa del desarrollo y de qué manera ésta podría influir en la proliferación.

CARACTERÍSTICAS DEL TESTÍCULO

La producción de espermatozoides en los mamíferos ocurre en el testículo, palabra que tiene su origen en el vocablo latino *testis*, que significa 'testigo'. Si bien su derivación no es clara, se presume que se debe al hecho de que, bajo la ley de la antigua Roma, solo los hombres adultos estaban autorizados a atestiguar. Desde épocas ancestrales se sabe que los testículos están relacionados con el desarrollo sexual y el poder reproductivo del macho. Sin embargo, varios siglos pasaron hasta que se describieron los túbulos seminíferos en el testículo.

Histológicamente, se ha demostrado que el testículo de los mamíferos está organizado en dos compartimientos: un compartimiento intersticial y un compartimiento tubular, como se puede observar en la figura 1.

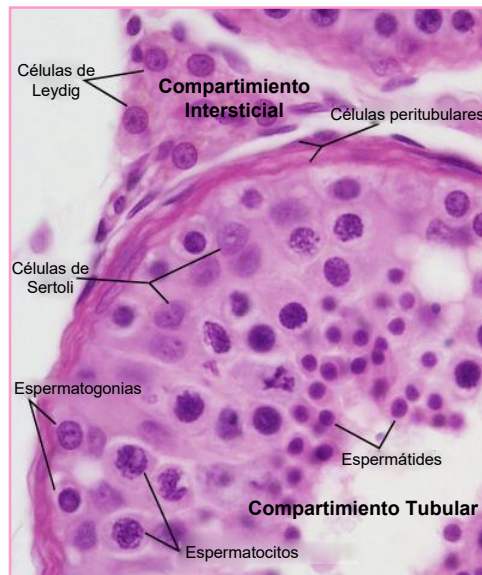


Figura 1. Imagen histológica testicular donde pueden observarse el compartimiento tubular y el compartimiento intersticial. El compartimiento tubular se encuentra rodeado por una capa de células aplanadas de características mioideas denominadas células peritubulares. En el interior del mismo se observan células de Sertoli, espermatogonias, espermatocitos y espermátides. En el compartimiento intersticial se observa una población de células que aparecen en grupos, las células de Leydig. Imagen tomada de: https://embryology.med.unsw.edu.au/embryology/index.php/Testis_Development y adaptada digitalmente.

El compartimiento intersticial está compuesto fundamentalmente por las células de Leydig, que se presentan generalmente asociadas formando agregados celulares y que son responsables de la producción de testosterona. Además, se observan fibroblastos, macrófagos, linfocitos y mastocitos. Todas las células presentes en este compartimiento están embebidas en una matriz conectiva laxa en la que se observan vasos sanguíneos de variado calibre, nervios y vasos linfáticos (Fawcett y col., 1973). Por otro lado, el compartimiento tubular es un sector avascularizado, rodeado por una capa de células mioideas denominadas peritubulares. Hacia el interior del túbulo seminífero se puede observar a las células de Sertoli apoyadas sobre una membrana basal en contacto directo con las células germinales en distintos estadios de maduración. Las células de Sertoli presentan como característica particular la capacidad de formar una barrera de permeabilidad, denominada barrera hemato-testicular (BHT), que separa al túbulo seminífero en dos compartimientos: uno basal —que contiene espermatogonias y

espermaticitos meióticos hasta el estadio de preleptotene— y otro adluminal —que contiene espermaticitos y espermátides en distintos estadios de maduración—. La consecuencia directa del establecimiento de la BHT es que las células germinales presentes en el compartimiento adluminal quedan aisladas de la circulación sistémica. En este contexto, estas células pasan a depender 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 DE LA CÉLULA DE SERTOLI

La célula de Sertoli fue bautizada así por Von Ebner en 1888 en honor a la labor descriptiva realizada por Enrico Sertoli en su artículo publicado en 1865. En su obra, Sertoli describía a estas células como se observan en la figura 2: “irregularmente cilíndricas o cónicas con bordes delicados y con núcleos que invariablemente contienen un nucléolo. El citoplasma es transparente, homogéneo y siempre contiene gotitas finas de grasa. Estas células están casi siempre provistas de prolongaciones finas muy transparentes en las que también se encuentran gotitas de grasa (...). En algunas de estas células se ve una bifurcación u otras prolongaciones secundarias. Otras células de este tipo envían más prolongaciones que se ramifican y a veces envuelven a otras células”.



Figura 2. Dibujos originales de Enrico Sertoli, que ilustran perfectamente la forma ramificada de estas células y la función de sostén a la espermatogénesis que él imaginó para ellas. De *Sertoli E. Il Morgagni 1865*.

En este contexto, se puede decir que estas “células ramificadas” que el fisiólogo-histólogo observó por primera vez al microscopio se condicen con el fenotipo maduro de las células de Sertoli. Para realizar una descripción histológica de esta célula es necesario tener en cuenta que la misma sufre grandes cambios madurativos que van de un fenotipo inmaduro, etapa en la cual es capaz de proliferar; a uno maduro, etapa en la cual es incapaz de proliferar, ha establecido la BHT y ha adquirido la capacidad de mantener a la población germinal. Por lo tanto, la transición a un fenotipo maduro es un proceso fundamental para lograr la adquisición de las complejas características de la célula de un individuo adulto capaz de sostener la espermatogénesis. En otras palabras, para este tipo celular “la composición morfológica está estrechamente relacionada con las manifestaciones funcionales” (Patriarca y col., 2019).

Pasados los años, y haciendo uso de microscopios con mayor poder de aumento y resolución, se pudo realizar una descripción más exacta de la célula de Sertoli, que increíblemente, no distaba mucho de la ya efectuada por Enrico Sertoli. La célula de Sertoli madura es una célula de tipo columnar que se extiende desde la membrana basal hasta la luz tubular. Presenta un núcleo grande, mayoritariamente integrado por eucromatina, ubicado en la región basal, que exhibe indentaciones y con uno o dos nucléolos prominentes. En el citoplasma es posible observar ribosomas, mitocondrias pleomórficas y abundantes gotas de lípidos. También se encuentra 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. Sin embargo, no se detectan gránulos de secreción, lo que sugiere que las proteínas no son almacenadas dentro de la célula, sino que se secretan inmediatamente después de ser sintetizadas (Russell, 1993). Por otro lado, se encuentran numerosos lisosomas y vacuolas que participan en el proceso de fagocitosis y digestión de células germinales en degeneración. Una característica de la célula de Sertoli a destacar es la distribución desigual de las organelas en su citoplasma. Este hecho

probablemente demuestre un funcionamiento sectorizado que está relacionado con las necesidades fisiológicas de las distintas células germinales con las que contacta. Otra característica destacable es la presencia de un citoesqueleto prominente y elaborado, responsable del sostén y arquitectura particular del epitelio seminífero. Asimismo, es importante mencionar la existencia de uniones entre células de Sertoli vecinas y entre células de Sertoli y células germinales asociadas al citoesqueleto (especializaciones ectoplásmicas apicales y complejos tubulobulbares), que también participan en la función de sostén (Russell y Malone, 1980). Se puede decir que, en el organismo adulto, las células de Sertoli presentan una de las morfologías más complejas descritas en el campo de la biología celular.

Utilizando como modelo la rata Sprague-Dawley, este trabajo de tesis se centrará en el estudio de la célula de Sertoli inmadura, cuyas características histológicas difieren notablemente de aquellas descritas para la célula de Sertoli madura, en virtud de la función que las células cumplen en este período del desarrollo. Debido a su capacidad proliferativa, el fenotipo inmaduro presenta una forma columnar con una orientación irregular con respecto a la membrana basal. Su núcleo es redondo a oval con mínimas indentaciones, de ubicación basal y presenta un nucléolo poco aparente. El citoplasma muestra un aspecto indiferenciado con organelas bastante separadas entre sí. Se destacan mitocondrias angostas y elongadas, poco desarrollo del retículo endoplásmico, así como un escaso aparato de Golgi.

Como se puede evidenciar, las características morfológicas de la célula de Sertoli son variables ya que sufren cambios constantes en su estructura tridimensional que se relacionan con su desarrollo para adquirir las características del fenotipo maduro y, por ende, para poder mantener el transcurso de los estadios de la espermatogénesis. En este sentido, algunos investigadores consideran que esta célula es uno de los ejemplos más bellos de la relación entre morfología y función que podemos encontrar en la naturaleza.

En palabras del propio Enrico Sertoli: “La forma adquiere su verdadera importancia cuando se la reconoce como función” (Patriarca y col., 2019).

En la figura 3 se muestra en forma esquemática la morfología que presenta la célula de Sertoli de rata inmadura (panel A) y la que adquiere luego de la maduración (panel B).

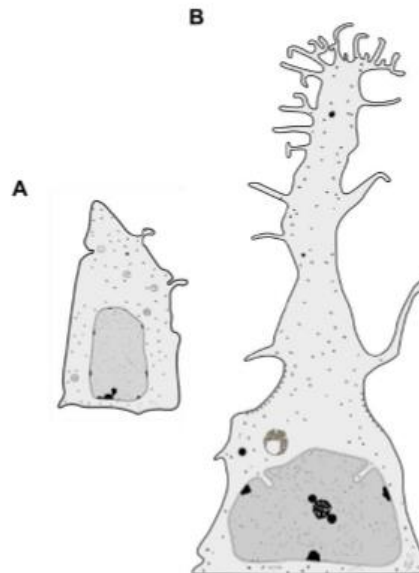


Figura 3. Esquema comparativo de la morfología de la célula de Sertoli en diferentes estadios de maduración: A) inmadura, B) madura. Figura obtenida del libro “Sertoli Cell”, Gondos y Berndston (1993) y modificada digitalmente.

PROLIFERACIÓN DE LAS CÉLULAS DE SERTOLI

El primer estudio cuantitativo acerca de la proliferación de células de Sertoli fue realizado por Clermont y Perey a mediados del siglo XX. Los autores utilizaron cortes histológicos de testículos de rata y realizaron el recuento de “células de soporte” en mitosis en los cordones sexuales y en los túbulos seminíferos. Como resultado, observaron un alto número de células en proliferación en el período fetal y neonatal, una disminución progresiva de las figuras mitóticas con la edad del animal y ausencia de dichas figuras a partir de los 18 días de edad de la rata (Clermont y Perey, 1957). Más de 10 años después, Steinberger y Steinberger (1971) determinaron *in vitro* la incorporación de [³H]-timidina en cultivos organotípicos de testículos aislados de ratas de diferentes edades, confirmando

que la proliferación de la célula de Sertoli decae con la edad. Utilizando la misma técnica, Orth (1982) determinó en un modelo de rata *in vivo* que el período fetal es el momento de mayor expansión de la población de células de Sertoli e indicó que, al nacer, la proliferación de estas células disminuye de forma constante hasta los 21 días de edad. Más recientemente, Angelopoulou y colaboradores (2008) analizaron el porcentaje de células de Sertoli en proceso de proliferación, mediante el análisis de la presencia de dos marcadores proliferativos: el antígeno Ki-67 y el antígeno nuclear de células proliferantes (PCNA) en cortes de testículos de ratas de distintas edades. Es importante destacar que ambos marcadores se expresan en células que están atravesando el ciclo celular, mientras que están ausentes en las células quiescentes. De esta manera, los autores corroboraron que las células de Sertoli proliferan durante los períodos fetal y neonatal en las ratas.

En cuanto a la proliferación de la célula de Sertoli humana, se ha observado que la primera etapa proliferativa ocurre durante el periodo fetal y neonatal hasta alrededor de los 12-18 meses de vida. Una segunda etapa de proliferación, separada de la primera por un período de al menos 8 años, ocurre al inicio de la pubertad entre los 9 y los 13 años de edad (Sharpe y col., 2003; Rey y col., 2016). El conjunto de estos estudios ha configurado la visión actual que indica que la célula de Sertoli prolifera en los periodos fetal, neonatal y peripuberal y cesa su proliferación en la pubertad en la mayoría de las especies. En el caso especial de los roedores como la rata, el periodo neonatal y peripuberal se solaparían constituyendo una única etapa de proliferación. De esta forma, alrededor de los 15-18 días postnatales en la rata se alcanzaría el número final de la población de células de Sertoli que se mantendría estable a lo largo de la vida.

El dogma actual establece que las células de Sertoli se diferencian de manera terminal cuando los machos alcanzan la pubertad. Sin embargo, cabe destacar que ciertos estudios han evidenciado que estas células son capaces de dividirse en individuos adultos, incluidos ratones, hámsteres y humanos (Ahmed y col., 2009; Figueiredo y col., 2016). En

su conjunto, estos estudios sugieren que, aunque las células de Sertoli pueden proliferar en la vida adulta, dicho proceso estaría más relacionado con la preservación de la población celular frente a posibles daños que con el hecho de contribuir en sí al tamaño final de la población de células de Sertoli en el individuo adulto. Una vez más, se vuelve relevante destacar que las tasas de proliferación nunca son tan altas como en las etapas tempranas, lo que sugiere que el tamaño final de la población de células de Sertoli está determinado principalmente por las fases tempranas de desarrollo. De allí se desprende la importancia de estudiar el proceso de proliferación en células de Sertoli en dicho período, cuando las mismas son inmaduras.

Se ha reportado que existe una correlación positiva entre el número de células de Sertoli presentes en el túbulo seminífero y la capacidad espermatogénica del individuo en diversas especies, incluida la humana. En este contexto, Orth y colaboradores (1988) realizaron una administración intratesticular de citarabina —análogo de la citosina que inhibe la síntesis de ADN— en las 36 horas posteriores al nacimiento de ratas para suprimir la proliferación de la célula de Sertoli sin modificar la población germinal. Los investigadores observaron que los animales que habían sido tratados durante el periodo neonatal presentaban una reducción a la mitad del número de células de Sertoli acompañada de una disminución en la misma magnitud de espermátidas redondas a los 60 días de edad, sugiriendo que cada célula de Sertoli es capaz de sustentar un número limitado de células germinales. Estudios posteriores determinaron que el número de células germinales que mantiene cada célula de Sertoli varía entre las especies. Por ejemplo, se observó que la célula de Sertoli de rata es capaz de mantener 2,4 espermátocitos primarios y alrededor de 8 espermátides de las fases más tempranas de maduración y que envuelve 10 espermátides de las últimas fases (Wing y Christensen, 1982; Wong y Russell, 1983), lo que permite definir que la célula de Sertoli de rata da soporte a aproximadamente 20 células germinales. Por otro lado, se demostró que la célula

de Sertoli humana mantiene alrededor de 1,6 espermatocitos primarios y solo 4 espermátides redondas y un número similar de espermátides en fase final de maduración, lo que muestra que cada célula de Sertoli en el humano sostiene un número considerablemente menor de células germinales que el observado para otras especies (Johnson y col., 1984; Sinha Hikim y col., 1985). Por consiguiente, cuanto mayor sea el número alcanzado de células de Sertoli durante los periodos proliferativos, más cantidad de células germinales podrán ser sustentadas para su desarrollo y, por lo tanto, mayor será la producción diaria de espermatozoides.

CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL CICLO CELULAR

La proliferación de la célula de Sertoli durante etapas tempranas del desarrollo depende de la regulación de su ciclo celular. Este ciclo consiste en una secuencia de eventos que se dividen en 2 etapas principales llamadas interfase y mitosis (fase M). A su vez, la interfase se divide en 3 fases que son: G1, S y G2. En cada una de las distintas fases ocurren eventos específicos. Dentro de la interfase, la fase G1 es una etapa de preparación, en la que se lleva a cabo la síntesis de proteínas, ARN y membranas, permitiendo el aumento del tamaño celular, lo que se conoce como crecimiento de la célula. De ello se desprende que la fase G1 es una etapa de alta actividad metabólica. En la fase S ocurre la síntesis de ADN, en la que se duplica el material genético. En la fase G2 ocurre otro proceso de crecimiento celular y preparación para la siguiente fase, denominada M, donde tendrá lugar la mitosis, que permite la obtención de dos células hijas con el mismo número de cromosomas, la misma información genética y el tamaño similar a la célula madre (Johnson y Walker, 1999; Cuyàs y col., 2014).

Es ampliamente conocido que una célula avanza a través del ciclo celular de manera sumamente regulada, para lo cual debe atravesar distintos mecanismos de vigilancia llamados “puntos de control”. Uno de ellos es el punto de restricción o punto R

que se da durante la transición de la fase G1 a la fase S. El mismo involucra el censado de señales externas, como la presencia de estímulos mitogénicos, como son los factores de crecimiento u hormonas, así como también de señales internas, como la disponibilidad de nutrientes. Como es sabido, la disponibilidad de nutrientes es esencial para que una célula se comprometa a la división celular. En condiciones óptimas —presencia de factores de crecimiento, fuentes de energía, carbono y nitrógeno— la célula es capaz de afrontar la alta demanda metabólica que implica la proliferación. En este punto, es necesario remarcar que las células con capacidad proliferativa deben adaptar su metabolismo de tal forma que les permita crecer —aumentar su biomasa— con el objeto de que las dos células hijas resultantes de la división posean un tamaño similar a la célula madre original (Agathocleous y Harris, 2013; Cuyàs y col., 2014).

Es así como el punto de restricción R, al ser atravesado, compromete a la célula a cumplir el resto de las etapas sin requerimientos externos, es decir, de manera autónoma. En el caso de que los estímulos mitogénicos o la disponibilidad de nutrientes sean insuficientes, las células no podrán atravesar dicho punto de restricción, saldrán del ciclo y entrarán en un estado de quiescencia denominado G0. Sí, por el contrario, la célula logra superar el punto R, dará lugar, entonces, a la progresión del ciclo celular. Para tomar este tipo de decisión, diversos estudios sugieren la existencia de un posible mecanismo molecular encargado de integrar las señales extracelulares e intracelulares mencionadas anteriormente, con el fin de generar una respuesta celular acorde al contexto en el que dicha célula se encuentre. Se presume que este mecanismo se encuentra comandado por el complejo blanco de acción de la rapamicina en mamíferos (mTORC) 1 (Yecies y Manning, 2011; Cuyàs y col., 2014). La descripción de dicho mecanismo se abordará con más detalle en secciones posteriores.

Por otro lado, se pueden mencionar otros mecanismos de vigilancia, entre los que se destacan la evaluación de daño al ADN en fase G1, el punto de control de G2/M y la

transición de la metafase a la anafase durante la mitosis. Sin embargo, el ya descrito punto R es el determinante del compromiso a la división celular debido a los requerimientos externos de nutrientes y estímulos hormonales o de factores de crecimiento necesarios para superarlo. Es así como, en caso de superar todos los puntos de control, la célula completará todas las fases del ciclo y se formarán dos células hijas idénticas.

El estímulo de agentes mitogénicos y la disponibilidad de nutrientes necesarios para traspasar el punto de restricción R inducen un aumento en la transcripción y la posterior traducción de factores de transcripción que promueven la progresión del ciclo celular, entre los cuales se destaca la proteína codificada por el oncogén de mielomatosis celular (c-Myc) (Spencer y Groudine, 1990; Liu y Levens, 2006; Wall y col., 2008). Se trata de un factor de transcripción multifuncional perteneciente a la familia de proteínas de cremallera de leucina/hélice-bucle-hélice con una vida media muy corta (15-30 min) (Kalkat y col., 2017), capaz de regular una gran variedad de genes implicados en múltiples procesos biológicos, como el crecimiento, el metabolismo, la proliferación celular y la apoptosis (Cole, 1986; Prendergast, 1999; Dang, 2012). La activación de la transcripción por c-Myc depende de la formación de complejos heterodiméricos de dicho factor con proteínas MAX. Los heterodímeros c-Myc/MAX se unen a secuencias de ADN llamadas *E-boxes* (CACGTG) en las regiones reguladoras de los promotores de sus genes diana y reclutan coactivadores transcripcionales (Dang, 1999; Eisenman, 2001). Entre dichos genes diana se encuentran aquellos que codifican para las proteínas ciclinas (Bretones y col., 2015). En este punto cabe aclarar que distintos estudios de perfiles de expresión génica en diferentes modelos experimentales han demostrado que la sobreexpresión de c-Myc, además de regular la expresión de genes involucrados en el control del ciclo celular, regula genes implicados en la biosíntesis de nucleótidos, en la biogénesis de ribosomas, la replicación del ADN y el control del ARN (Perna y col., 2012). A su vez, muchos de los genes

diana de c-Myc están involucrados en la síntesis de proteínas y el metabolismo energético (Schmidt, 1999; Liu y col., 2008; Dang y col., 2009; Van Riggelen y col., 2010), sin ser menos importantes aquellos relacionados a la incorporación de nutrientes para sostener la gran demanda metabólica que implica la división celular (Dang, 1999). Dado que la célula debe aumentar su tamaño a lo largo del ciclo celular, sintetizando todos los componentes celulares necesarios, es evidente la importancia de c-Myc en la biología de una célula en proliferación.

En este contexto, es crucial el control celular sobre la abundancia de este factor de transcripción, dado que su desregulación conlleva al desarrollo de neoplasias. Es por este motivo que los mecanismos moleculares de regulación de c-Myc están descritos principalmente en células tumorales. Sin embargo, dichos mecanismos también forman parte de las estrategias desarrolladas por las células normales con capacidad proliferativa para cumplir con el mismo objetivo. Teniendo en cuenta lo mencionado anteriormente, se puede decir que, para garantizar la regulación adecuada de los niveles de c-Myc, la célula lleva adelante distintos mecanismos, desde transcripcionales a modificaciones postraduccionales, de los cuales algunos se desarrollarán con mayor detalle en secciones posteriores. Sin embargo, dada la complejidad de dicha regulación, es posible determinar que el resultado de la sumatoria de todos los mecanismos regulatorios converge finalmente en la actividad transcripcional de c-Myc. De ello se desprende la importancia, no solo de evaluar la expresión, sino también su actividad.

Como fue mencionado anteriormente, entre los genes diana de c-Myc se encuentran aquellos que codifican para las ciclinas. Estas proteínas interactúan y forman complejos con las quinasas dependientes de ciclina (CDK), de manera que la ciclina actúa como la subunidad regulatoria necesaria para activar la subunidad catalítica, la CDK, del heterodímero. De esta manera, cada complejo ciclina-CDK conforma una quinasa de residuos de serina/treonina, bajo cuyo control se encuentra la progresión del ciclo celular.

Como su nombre lo indica, la expresión de las ciclinas dependerá de variaciones cíclicas, contrariamente a lo que ocurre con las CDKs, cuya expresión permanece relativamente constante a lo largo del ciclo celular (Deshpande y col., 2005; Sánchez y Dynlacht, 2005). Son las CDKS 1, 2, 4 y 6 y las ciclinas de tipo A, B, D y E las que se identifican como los principales reguladores del ciclo celular. Si bien las ciclinas fueron nombradas con caracteres alfabéticos según el orden en que fueron descubiertas, su participación en el ciclo de división celular muestra una distribución diferente de actividades. Particularmente, las ciclinas D (D1, D2 y D3, codificadas por los genes *Ccnd1*, *Ccnd2* y *Ccnd3*, respectivamente) se expresan en la fase G1, de manera que controlan la entrada al ciclo celular y la progresión a lo largo de esta fase. Las ciclinas D se unen a CDK4 y CDK6 y las activan. Es así como el complejo ciclina D-CDK4/6 activado fosforila a la proteína relacionada al retinoblastoma (pRb) y dicha fosforilación permite que pRb libere al factor de transcripción E2F. De esta manera, el factor E2F liberado favorece la expresión del siguiente grupo de ciclinas, la ciclina E y la ciclina A. La ciclina E asociada a la CDK2 también promoverá la fosforilación de pRb, de tal forma de incrementar aún más los niveles de ciclina A que permitirán el pasaje desde G1 a S. A su vez, el factor E2F estimula la expresión de genes que codifican proteínas necesarias para la fase S promoviendo, así, la progresión del ciclo celular (Dyson, 1998; Nevins, 2001; Bretones y col., 2015).

Como mencionamos anteriormente, una vez que se alcanza la fase S del ciclo celular el resto de las etapas ocurren en forma autónoma sin la necesidad de estímulos externos, de manera tal que, si las condiciones son óptimas y hay nutrientes suficientes, aquellas hormonas que promuevan la proliferación celular actuarán regulando los eventos relacionados al ingreso a la fase G1 y a la transición G1-S.

Por otro lado, cabe mencionar que existe otro grupo de proteínas que regulan el ciclo celular, pero de manera negativa: los inhibidores del ciclo. Se han caracterizado dos familias de estas proteínas: la familia CIP/KIP, integrada por las proteínas p21^{Cip1}, p27^{Kip1} y

p57^{Kip2}; y la familia INK4, conformada por los miembros p15^{INK4b}, p16^{INK4a}, p18^{INK4c} y p19^{INK4d}. Mientras que los inhibidores de la familia CIP/KIP se unen a complejos ciclina-CDK e inhiben su actividad quinasa, los miembros de la familia INK4 se unen a las CDK4 e impiden su interacción con las ciclinas. Independientemente del modo de acción, ambos tipos de inhibidores limitan la fosforilación por las CDKs de la proteína pRb y de esta forma impiden el pasaje a la fase S (Vidal y Koff, 2000).

La figura 4 muestra esquemáticamente las proteínas involucradas en el punto de restricción R.

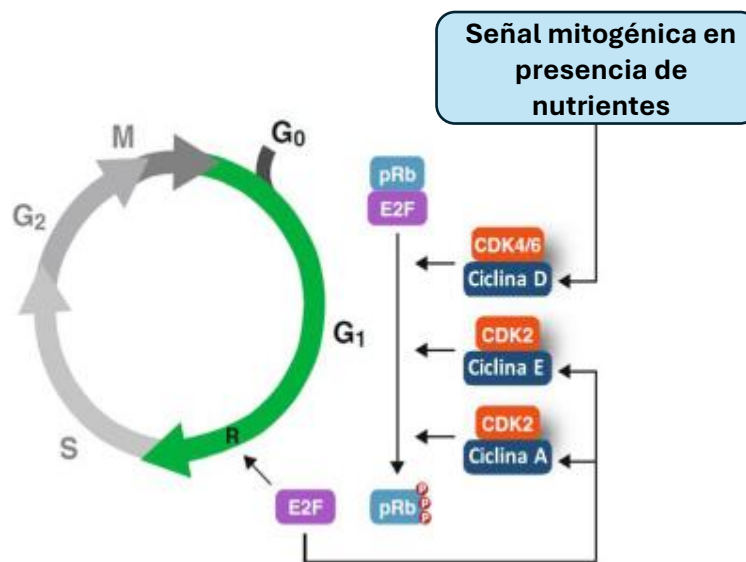


Figura 4. El esquema muestra en forma simplificada a las proteínas involucradas en el pasaje de la fase G1 a la S del ciclo celular, en el cual se observa el punto de control R. Imagen obtenida de Poon, (2016) y posteriormente editada.

Ante lo expuesto en estos párrafos, se desprende un concepto de suma importancia: la división celular es un proceso de alta demanda metabólica, requiriendo de la producción de grandes cantidades de energía y fuentes de carbono para la biosíntesis de nuevas macromoléculas, lo que dará lugar al aumento de biomasa, requerimiento fundamental para el crecimiento celular. Por lo tanto, no es sorprendente que la progresión del ciclo celular esté finamente regulada, y la proliferación de la célula de Sertoli no es la excepción.

En este contexto, debe existir un mecanismo molecular mediante el cual la célula coordine el censado de nutrientes —fuentes de carbono, nitrógeno y energía— y las señales tróficas de hormonas o factores de crecimiento que van a inducir la proliferación para garantizar el crecimiento y la progresión del ciclo celular. Existe evidencia de que dicho mecanismo está gobernado por la activación del complejo mTORC1. Dado que el proceso de activación de mTORC1 es sumamente intrincado, los siguientes párrafos solo intentarán explicar los requerimientos necesarios para converger en la activación del complejo proteico y describir algunas de sus importantes acciones biológicas.

COMPLEJOS BLANCO DE ACCIÓN DE LA RAPAMICINA EN MAMÍFEROS (mTORC)

Como su nombre lo indica, mTORC es un complejo de proteínas asociadas, siendo su componente catalítico clave la proteína blanco de acción de la rapamicina en mamíferos (mTOR). mTOR es una serina/treonina quinasa de características singulares, entre las que se destaca su capacidad de unión a la rapamicina, un antibiótico macrólido derivado de *Streptomyces hygroscopicus* con reconocidas propiedades antiproliferativas. A su vez, mTOR forma parte de dos asociaciones funcionalmente distintas: mTORC1 y mTORC2 (Cuyàs y col., 2014). Además de la subunidad catalítica mTOR, mTORC1 se encuentra integrado por:

- la proteína asociada a la regulación de mTOR (Raptor), proteína de andamiaje que permite el reconocimiento y reclutamiento de los sustratos de mTOR;
- la proteína 8 letal para mamíferos con Sec13 (GβL, también conocida como mLST8), la cual promueve la actividad mTORC1 al estabilizar la unión mTOR-Raptor;
- el sustrato de Akt rico en prolina de 40 kDa (PRAS40), que inhibe la actividad de mTORC1 cuando se encuentra unida al complejo proteico;
- la proteína con dominio DEP (Deptor), un inhibidor de la señalización mTORC1;

- el complejo Tit1/Tel2, proteínas de andamiaje reguladoras del ensamblaje y estabilidad del complejo.

Por su parte, mTORC2 queda estructurado, además de la subunidad catalítica mTOR, GβL, Deptor y Tit1/Tel2 —comunes a mTORC1—, por la asociación de:

- la proteína de andamiaje insensible a la rapamicina (Rictor), necesaria para el reclutamiento de sustrato y la actividad catalítica del complejo proteico,
- la proteína 1 que interactúa con la quinasa Map activada por estrés (mSin1), que proporciona estabilidad estructural a mTORC2.
- la proteína de unión a Rictor 1 y 2 (Protor).

En este punto es relevante aclarar que, a diferencia de mTORC1, mTORC2 es insensible a la rapamicina debido a la presencia de Rictor en su constitución. Por lo tanto, la rapamicina constituye una herramienta muy valiosa para el estudio de las acciones biológicas de mTORC1.

En la figura 5 se esquematizan sencillamente las estructuras de ambos complejos proteicos.

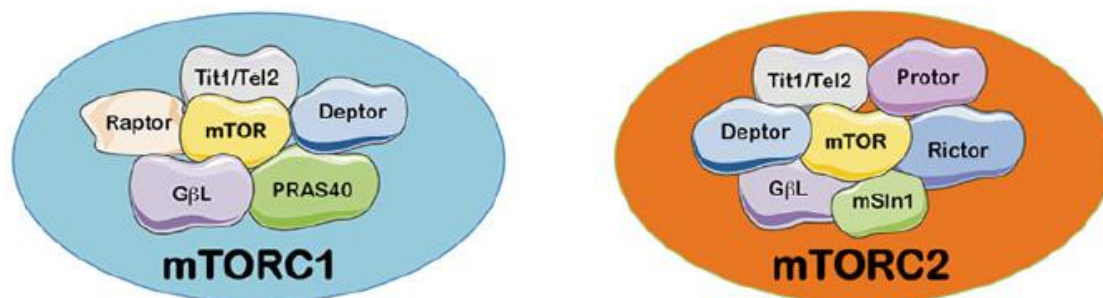


Figura 5. Componentes proteicos de los complejos mTORC1 y mTORC2. mTOR: subunidad catalítica. Raptor (proteína regulatoria asociada a mTOR) y Rictor (compañero insensible a la rapamicina de mTOR): proteínas de andamiaje necesarias para el ensamblaje y la unión de sustratos en el complejo respectivo. GβL: regulador positivo de la actividad de los complejos, que estabiliza la unión mTOR-Raptor y mTOR-Rictor. DEPTOR y PRAS40: reguladores negativos de la actividad del respectivo complejo. Tit1/Tel2: reguladoras del ensamblaje y la estabilidad de ambos complejos. Imagen obtenida de Cuyàs y col. (2014) y modificada digitalmente.

En comparación con mTORC1, la regulación de la actividad mTORC2 está poco establecida. Hasta el momento se ha descrito que la activación de mTORC2 es a expensas

de estímulos hormonales o de factores de crecimiento, independientemente de la ausencia o presencia de nutrientes. Una vez que mTORC2 adquiere actividad, el complejo fosforila la serina (Ser) 473 presente en el motivo hidrofóbico de la proteína quinasa B (PKB, más ampliamente conocida como Akt) cooperando así con el incremento de la actividad quinasa de esta proteína (Copp y col., 2009).

Al igual que mTORC2, los estímulos mitogénicos dados por hormonas o factores de crecimiento activan la vía mTORC1, pero solo si el estado energético celular es adecuado y existe disponibilidad de nutrientes. En particular, la activación de mTORC1 ocurre a expensas de su interacción con la proteína G monomérica, Rheb, unida a GTP, la cual se localiza en la superficie lisosomal. Rheb permanecerá unida a GTP siempre y cuando su actividad GTPasa no sea promovida por el complejo de esclerosis tuberosa (TSC)1-TSC2. Para que ello no suceda, TSC1-TSC2 debe ser fosforilado por Akt, lo que conduce a la supresión de su acción potenciadora de la actividad GTPasa (GAP) de proteínas G monoméricas. Asimismo, Akt puede promover la señalización de mTORC1 de manera TSC1-TSC2 independiente a través de la fosforilación directa de la subunidad inhibitoria PRAS40, provocando su disociación del complejo (Sancak y col., 2007; Thedieck y col., 2007; Vander Haar y col., 2007). Es así como la interacción con Rheb-GTP y la disociación de PRAS40 conllevan a la activación completa del complejo mTORC1 en la superficie del lisosoma. Una vez activo, mTORC1 fosforilará a la quinasa de la proteína ribosomal S6 de 70 kDa (p70S6K), uno de sus sustratos principales. De esta manera, producto de la interacción mTORC1-p70S6K, mTORC1 es fosforilado en el residuo Ser2448 de la subunidad catalítica mTOR por la p70S6K activada. Por lo tanto, la evaluación de los niveles de fosforilación de mTOR en Ser2448 es el reflejo de su actividad (Chiang y Abraham, 2005).

Hasta este punto siempre se remarcó que la activación de mTORC1 ocurre por estímulos tróficos/mitogénicos. Sin embargo, si bien se hizo alusión a la necesidad de la presencia de nutrientes para promover el aumento de actividad del complejo, aún no se ha

explicado con profundidad este requerimiento. Para poder detallar este aspecto de suma importancia, se debe recordar que Rheb se encuentra constitutivamente en la superficie lisosomal, por lo que el complejo mTORC1 debe translocarse a esa localización subcelular para poder interactuar con Rheb-GTP y, en consecuencia, adquirir actividad. El reclutamiento de mTORC1 a la superficie lisosomal solo es posible si las proteínas G monoméricas de la superficie lisosomal llamadas Rag —A, B, C o D— se encuentran asociadas de una manera específica a los nucleótidos de guanina: el reconocimiento de la superficie lisosomal por mTORC1 ocurre si y solo si RagA/B está unida a GTP y RagC/D está unida a GDP. En este escenario, surge la necesidad de aclarar que la actividad de las proteínas activadoras de GTPasa (GAP) específicas de RagC/D depende de la presencia de nutrientes, más específicamente de ciertos aminoácidos esenciales y/o sus metabolitos. Este mecanismo molecular convierte a mTORC1 en un censor de nutrientes intracelular (Lama-Sherpa y col., 2023). En este punto cabe aclarar que ha sido de gran sorpresa para la comunidad científica el hallazgo de varios grupos de investigación que evidenciaron que la glutamina (L-gln), a pesar de ser un aminoácido no esencial, juega un rol preponderante en la translocación del mTORC1 a la superficie lisosomal en células de cáncer, aspecto que será abordado en secciones posteriores.

De estos párrafos se desprende que la presencia conjunta de nutrientes —más específicamente aminoácidos y/o sus metabolitos, que aún no se conocen en su totalidad— y factores mitogénicos es condición *sine qua non* para la activación de mTORC1 en la superficie lisosomal. En la figura 6 que se muestra a continuación se esquematiza de forma simplificada la activación completa del complejo mTORC1.

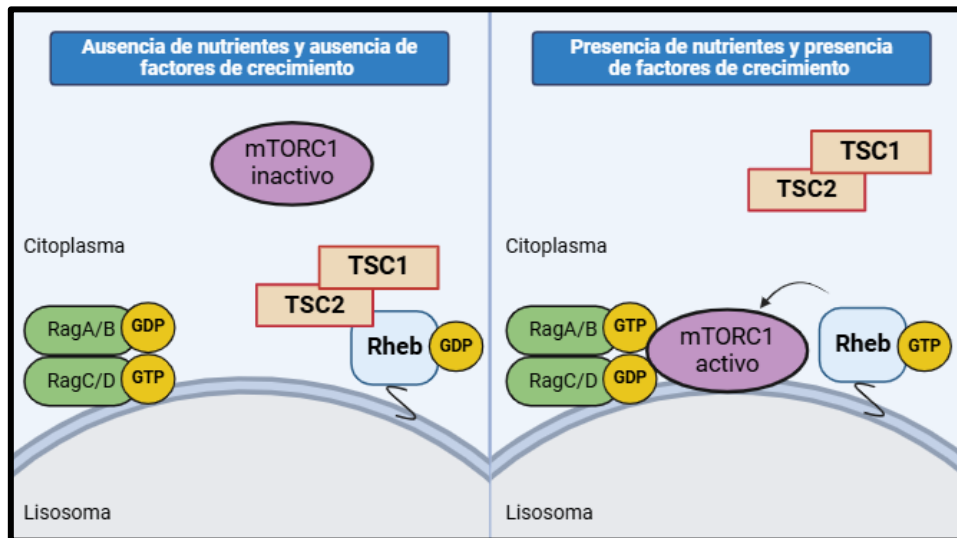


Figura 6. Esquema del proceso de activación del complejo proteico mTORC1 en la superficie lisosomal, el cual se da únicamente ante la presencia conjunta de nutrientes y factores de crecimiento. Idea tomada de Carroll y col. (2016) y modificada digitalmente.

La mayoría de los estudios que dilucidaron estos intrincados mecanismos moleculares que convergen en la activación del mTORC1 se han llevado a cabo en líneas celulares tumorales. En la actualidad, poco se sabe sobre lo que ocurre en células no neoplásicas que proliferan normalmente.

Una vez activo mTORC1, una de las acciones primarias del complejo es —como se mencionó anteriormente— la fosforilación de p70S6K en el residuo treonina (Thr389), clave para la activación de su acción quinasa. Cuando p70S6K adquiere actividad, fosforila a la proteína S6 (Nemenoff y col., 1988; Proud, 1996; Pullen y Thomas, 1997), un componente de la subunidad 40S de los ribosomas. Como resultado de esta cascada de señalización se ve incrementada la traducción de aquellos ARN mensajeros (ARNm) que presentan motivos de oligopirimidina en sus extremos 5' terminales (5'-TOP). Cabe mencionar que el ARNm de c-Myc presenta motivos 5'-TOP (Stoneley, 1998), por lo que la activación de mTORC1 contribuiría a un aumento de la biosíntesis proteica del factor de transcripción. Por otro lado, mTORC1 también fosforila a la proteína de unión 1 al factor de iniciación 4E (eIF4E-BP1), evento que induce la liberación de eIF4E, un factor de inicio de la

traducción. Esta disociación permite que eIF4E se una a eIF4G, lo que facilita la formación del complejo de iniciación de la traducción y, como consecuencia, la traducción de ARNm a proteína, siendo este un mecanismo más que coopera con el aumento de la biosíntesis proteica en la célula, pero siempre favoreciendo la traducción de aquellos ARNm con 5'-TOP, como es el caso de c-Myc.

Es por ello que, como resultado de la activación de la cascada de señalización mTORC1, en lesiones tumorales se ha evidenciado un incremento de la actividad transcripcional de c-Myc, desencadenando así el aumento de la tasa transcripcional de genes diana del factor, entre los cuales destacan aquellos que codifican para las ciclinas D (West y col., 1998; Guertin y Sabatini, 2007; Averous y col., 2008). Debido a que la inducción de las ciclinas es fundamental para permitir el avance del ciclo celular, se asume la relevancia que presenta el complejo mTORC1 en este proceso. Particularmente, las células de Sertoli inmaduras expresan c-Myc (Lim y Hwang, 1995) y ciertos mitógenos específicos de este tipo celular activan la vía de señalización mTORC1 (Riera y col., 2012). Sin embargo, hasta el momento de realizar este trabajo de tesis no existían estudios que vincularan estos dos hechos biológicos.

A raíz de lo mencionado en los párrafos anteriores, se puede establecer que la actividad de mTORC1 debe estar finamente regulada. En este escenario, es relevante mencionar que la señal de mTORC1 es apagada por el aumento de la actividad GAP del complejo TSC1-TSC2 que se traduce en la elevación de los niveles Rheb-GDP, evento que ocurre cuando se activa la proteína quinasa activada por AMP (AMPK) en contextos de ausencia de estímulos tróficos o privación energética —aumento de la relación [AMP]/[ATP] (Hardie y col., 2016). Por consiguiente, mTORC1 solo se activa cuando los niveles energéticos intracelulares son adecuados. Es posible plantear, entonces, que ambas quinasas, mTOR y AMPK, ejercen efectos celulares fundamentales y opuestos en la regulación del metabolismo y la homeostasis energética celular. Diversos estudios han

demostrado que estas dos vías de señalización —de naturaleza antagónica y de gran implicancia biológica— juegan un papel fundamental en la regulación del ciclo celular. En particular, se ha evidenciado que en células de Sertoli con capacidad proliferativa tanto la vía mTORC1 como la AMPK intervienen activamente en la regulación de la progresión y arresto del ciclo celular, respectivamente (Riera y col., 2012).

En la sección que se desarrollará a continuación, se describirán aquellos factores endocrinos, paracrinicos y autocrinos de gran relevancia fisiológica, algunos de los cuales utilizan dichas vías de señalización como mecanismos moleculares para regular tanto la proliferación de la célula de Sertoli como el cese de la misma.

REGULACIÓN ENDOCRINA, PARACRINA Y AUTOCRINA DE LA PROLIFERACIÓN DE LA CÉLULA DE SERTOLI

Como se describió previamente, la célula de Sertoli se divide en determinados periodos de la vida para luego detener su proliferación. En este contexto, existen moduladores endocrinos, paracrinicos y autocrinos que estimulan la proliferación de este tipo celular, mientras que otros promueven el cese de la misma conforme la célula va adquiriendo madurez. Esto implica que existe una coordinación entre estos factores, que articula hormonas, vías de transducción de señales y mecanismos moleculares, para regular la transición de la célula de Sertoli de un fenotipo inmaduro a uno maduro, hito clave para la fertilidad futura.

Teniendo esto en cuenta, en las siguientes secciones se describirán los factores más relevantes que están implicados tanto en la proliferación como en el cese de la misma, y los mecanismos moleculares involucrados en dichos procesos.

Factores que estimulan la proliferación

En particular, en esta sección se resumirá el conocimiento actual sobre el papel de la hormona folículo estimulante (FSH), los factores de crecimiento de la familia de la insulina (IGFs) y activinas e inhibinas, los cuales poseen una relevancia fisiológica destacable en la promoción de la proliferación de la célula de Sertoli.

- **Hormona folículo estimulante**

La FSH es una gonadotrofina sintetizada y secretada por las células gonadotróficas de la glándula pituitaria anterior, y constituye un regulador central de la función reproductiva en los mamíferos. Esta hormona es uno de los principales agentes que controlan la funcionalidad de la célula de Sertoli y sus acciones biológicas son mediadas por su interacción con el receptor específico de FSH (FSHR), una proteína de siete dominios transmembrana que pertenece a la superfamilia del receptor acoplado a proteína G (GPCR) (Simoni y col., 1997; Heckert y Griswold, 2002). En este contexto, Simoni y colaboradores (1997) han demostrado que en el testículo el FSHR se encuentra solamente expresado en la célula de Sertoli. En consonancia con la presencia de receptores, las acciones de la FSH pueden demostrarse durante la vida fetal y durante toda la vida posnatal. Sin embargo, la respuesta fisiológica a la FSH varía según el estado de maduración de las células de Sertoli (Sharpe y col., 2003). La FSH regula la proliferación de este tipo celular solo durante la vida fetal y postnatal temprana, mientras que regula la maduración de la misma después del cese de la mitosis en la pubertad. En el año 1976, Griswold y colaboradores llevaron adelante el primer estudio acerca de la regulación por FSH de la proliferación de la célula de Sertoli. En su trabajo, los autores observaron que el agregado de FSH en cultivos de células de Sertoli aisladas de animales de 10 días de edad causaba un incremento en la incorporación de [³H]-timidina. Asimismo, Orth (1984) analizó la respuesta a FSH de células de Sertoli fetales. El autor demostró, tanto *in vivo* como *in vitro*, que la FSH actúa

como factor principal en el control de la expansión de la población de células de Sertoli durante el desarrollo fetal de la rata. En ensayos *in vivo* observó que tanto la decapitación de los fetos *in utero* al día 18 de gestación, por un lado, como el tratamiento de los fetos sin ser decapitados con un anticuerpo anti-FSH, por el otro, producen una marcada disminución en la incorporación de [³H]-timidina en células de Sertoli. Estos resultados sugerían que la disminución en los niveles de FSH conduce a una menor proliferación de la célula de Sertoli. Respecto de los ensayos *in vitro*, el autor realizó cultivos de órganos de testículos de fetos intactos o decapitados, con o sin hormona FSH exógena, y demostró que FSH incrementa la incorporación de [³H]-timidina en células de Sertoli. La importancia de la FSH en la regulación de la proliferación de las células de Sertoli fue confirmada, además, por un estudio realizado por Almirón y Chemes (1988) en el que los investigadores demostraron que la administración de ratas inmaduras con altas dosis de propionato de testosterona —que conduce a una disminución de los niveles de FSH por retroalimentación negativa— redujo el índice mitótico; y que cuando los niveles de FSH se restauraron mediante la inyección de FSH humana, el índice mitótico fue semejante al de los animales controles. En su conjunto, estos resultados indicaban que FSH es capaz de regular la proliferación de la célula de Sertoli durante el periodo fetal y postnatal.

La importancia de la FSH en la regulación de la proliferación de células de Sertoli fue reconfirmada posteriormente por varios estudios. Por un lado, utilizando un modelo de ratones hipogonadotróficos (hpg) —deficientes en FSH y LH debido a la delección del gen de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH)— el cual evidenciaba que el número de células de Sertoli que se alcanzan en el animal adulto es menor que en los ratones controles, y que la administración neonatal de FSH recombinante es capaz de incrementar la población de células de Sertoli (Singh y Handelsman, 1996). Además, Haywood y colaboradores (2003) demostraron que la expresión de FSH humana en ratones hpg transgénicos también aumenta el número de células de Sertoli. Asimismo, en un trabajo

publicado por O'Shaughnessy y colaboradores (2012), los autores demostraron que los ratones que poseen la delección o *knock-out* (KO) del receptor de FSH (FSHRKO) tienen un menor número de células de Sertoli que los animales controles.

Una vez demostrado fehacientemente el rol mitogénico de la FSH en las células de Sertoli, investigaciones posteriores se centraron en dilucidar los mecanismos moleculares y las vías de transducción de señales implicados en la regulación de la proliferación de dicho tipo celular desencadenada por la hormona. Es así como varios estudios *in vitro* realizados en cultivos de células de Sertoli aisladas de ratas en el período neonatal han analizado los mecanismos moleculares involucrados en la transición G1-S del ciclo celular —el punto de restricción R—, a través de los cuales la FSH promueve la proliferación. En el año 1995, Lim y Hwang demostraron que la incubación con FSH induce un aumento del ARNm del factor de transcripción c-Myc. Por otro lado, ese mismo año, Ravnik y colaboradores (1995) demostraron que las tres ciclinas de tipo D se expresan en el testículo. Los autores observaron que las ciclinas D1 y D2 se expresan en el compartimento somático, especialmente en las células de Sertoli, mientras que la ciclina D3 es más abundante en el epitelio germinal. En este contexto, se ha demostrado que FSH incrementa la expresión de ciclina D1 y la actividad transcripcional del factor E2F en células de Sertoli con capacidad proliferativa, que se refleja en un mayor número de células en fase S (Crépieux y col., 2001). Se demostró, además, que FSH incrementa los niveles de expresión de c-Myc, así como también su actividad transcripcional, y que ello conlleva a un aumento en la expresión de ciclina D2, sin modificar la expresión de ciclina D3 (Gorga y col., 2018). Estos estudios demuestran que, en células de Sertoli con capacidad proliferativa, FSH es capaz de incrementar la expresión de las ciclinas D1 y D2 y del factor de transcripción c-Myc, así como también su actividad transcripcional, promoviendo la transición G1-S del ciclo celular. Ahora bien, ¿cuáles son los mecanismos moleculares subyacentes a través

de los cuales la FSH promueve la expresión de dichos factores para favorecer la proliferación de la célula de Sertoli?

Como fue mencionado con anterioridad, las acciones biológicas de la gonadotropina son mediadas por su interacción con su receptor específico, FSHR, perteneciente a la superfamilia de receptores GPCR. La unión de dicho receptor con su ligando lleva a la activación de la proteína G α s y, en consecuencia, la estimulación de la enzima adenilato ciclasa, que cataliza la formación de adenosina 3', 5'-monofosfato cíclico (AMPc) a partir de ATP. El AMPc, actuando como segundo mensajero, se une a las subunidades regulatorias de la proteína quinasa dependiente de AMPc (PKA), permitiendo la activación de las subunidades catalíticas de PKA y de esta forma se transmite la señal.

Durante más de 20 años, se ha aceptado ampliamente que la vía canónica Gs/AMPc/PKA era el único mecanismo que contribuía a las acciones de la FSH (Means y Huckins, 1974; Dattatreya Murty y col., 1987). El aumento de la incorporación de [3 H]-timidina en células de Sertoli inmaduras causado por incubaciones con N6, 2'-O-dibutilil AMPc (dbAMPc) —análogo lipofílico del AMPc, capaz de atravesar la membrana plasmática— fue la primera evidencia de la participación de las vías dependientes de AMPc en la regulación de la proliferación de células de Sertoli (Orth, 1984). Sin embargo, hoy en día, cada vez hay más evidencia que indica la complejidad asociada con la señalización celular inducida por FSH. En tal sentido, en células de Sertoli inmaduras aisladas de ratas se ha demostrado que la FSH activa la vía de quinasas activadas por mitógenos (MAPK), en particular la vía dependiente de ERK1/2 (Crépieux y col., 2001). En dicho trabajo, se observó un aumento en la fosforilación y en la translocación nuclear de ERK1/2 de manera dependiente de AMPc y de la activación de PKA. Asimismo, se observó que la inhibición de la vía de ERK1/2 en respuesta a FSH conlleva a una disminución de los niveles de ciclina D1, de la actividad del factor E2F y del número de células en fase S. Estos estudios, en

conjunto, sugieren que la vía de ERK1/2 también participa en la regulación por FSH de la proliferación de células de Sertoli.

Por otro lado, en células de Sertoli inmaduras, Riera y colaboradores (2012) observaron que FSH activa la vía de señales que involucra a la enzima fosfatidilinositol 3 quinasa (PI3K) y la posterior activación de la quinasa Akt. Asimismo, demostraron que la presencia de un inhibidor específico de PI3K genera una disminución en el estímulo por FSH de la expresión de c-Myc, de la incorporación de [³H]-timidina y del número de células positivas para la incorporación de 5-bromo-2-desoxiuridina (BrdU), un nucleósido sintético análogo de la timidina. Siguiendo con sus estudios, los mismos autores también analizaron la activación por FSH tanto del complejo mTORC1, así como también de su sustrato principal, p70S6K, y evidenciaron que la hormona induce un incremento en los niveles de fosforilación tanto del residuo Ser2448 de mTOR como del residuo Thr389 de p70S6K en células de Sertoli inmaduras. De manera similar, observaron que el estímulo ejercido por FSH sobre los niveles de fosforilación de dichas proteínas ensayadas era contrarrestado por la presencia de un inhibidor específico de PI3K, lo que sugiere que FSH es capaz de activar mTORC1 en forma PI3K dependiente. La participación del mTORC1 en la regulación de la proliferación fue demostrada al observar una disminución del estímulo por FSH de la incorporación de [³H]-timidina y del número de células de Sertoli BrdU positivas en presencia de rapamicina, el inhibidor específico de mTORC1 (Riera y col., 2012). No obstante, el mecanismo molecular subyacente a la activación de mTORC1 y cómo este complejo proteico promueve la proliferación hasta el momento de este trabajo de tesis no ha sido evaluado en la célula de Sertoli.

En conjunto, estos resultados sugieren que FSH, además de las vías de AMPc/PKA y ERK1/2, regula la proliferación a través de la vía de señalización PI3K/Akt/mTORC1. Sin embargo, muchos de los mecanismos moleculares por los cuales la FSH ejerce sus acciones biológicas aún no han sido esclarecidos completamente. En este contexto, se

torna relevante el estudio de la regulación hormonal sobre el metabolismo de la célula de Sertoli inmadura. De la misma manera, resulta de interés estudiar si el metabolismo, a su vez, es capaz de influenciar dicha acción hormonal para inducir la proliferación en este tipo celular.

- **Factores de crecimiento de la familia de la insulina**

La familia de factores de crecimiento de la insulina —insulina y factores de crecimiento similares a la insulina I (IGF-1) y II (IGF-2)— son pequeños polipéptidos responsables del control del crecimiento, el metabolismo y las funciones reproductivas en diversos tipos celulares. IGF-1 y IGF-2 se expresan de forma ubicua, a diferencia de la insulina, la cual se expresa exclusivamente en las células β de los islotes de Langerhans del páncreas. Los efectos fisiológicos de IGF-1 e insulina están mediados por la activación de dos receptores de tirosina quinasa relacionados: el receptor de insulina (InsR) y el receptor de IGF-1 (IGF-1R). Las funciones de estos péptidos en el testículo han sido extensamente estudiadas. Se ha demostrado que células de Sertoli aisladas de testículos de embriones y ratones neonatales expresan IGF-1 e IGF-1R y que el tratamiento con IGF-1 promueve la progresión del ciclo celular y la proliferación (Villalpando y col., 2008). En cuanto al papel de la insulina, esta hormona también promueve la proliferación; sin embargo, dado que se requirió una mayor concentración de insulina que de IGF-1 para obtener la respuesta biológica, se sugirió que la insulina actuó a través de los receptores de IGF-1 (Saez y col., 1988). En relación con la vía de transducción de señales desencadenada por el sistema insulina/IGF-1 en células de Sertoli, es ampliamente aceptado que activan las vías de señalización de PI3K/Akt y ERK1/2 a través de distintas isoformas del sustrato del receptor de insulina (IRS), las cuales están asociadas con la proliferación, la diferenciación, el metabolismo y la supervivencia celular (Villalpando y col, 2008).

En la actualidad es sabido que los efectos de la FSH sobre las células de Sertoli inmaduras pueden estar mediados, al menos en parte, por el IGF-1 (Smith y col., 1990; Yamamoto y col., 2001; Pitetti y col., 2013), habiendo quedado demostrado que el sistema insulina/IGF-1 es un componente esencial de la red endocrina y paracrina que regula la proliferación de las células de Sertoli, el tamaño de los testículos y la producción de esperma en los mamíferos.

- **Activinas e inhibinas**

Las activinas e inhibinas son péptidos gonadales que pertenecen a la superfamilia del factor transformante de crecimiento beta (TGF- β) y que cumplen funciones importantes durante el desarrollo y en la reproducción. Estos péptidos fueron descubiertos y denominados en función de su capacidad para estimular o inhibir la liberación de FSH por los gonadotropos (Franchimont y col., 1979; Ling y col., 1986). Las activinas son homodímeros formados por subunidades β de inhibina, siendo la activina A un dímero de subunidades βA ($\beta A\beta A$) y la activina B un dímero de subunidades βB ($\beta B\beta B$). Por otro lado, las inhibinas son heterodímeros de una de las subunidades β (βA o βB) con una subunidad α común de la inhibina: la inhibina A ($\alpha\beta A$) y la inhibina B ($\alpha\beta B$), respectivamente (Mason y col., 1985; Barton y col., 1989).

Toda información relacionada con la regulación de la función de la célula de Sertoli por parte de la activina fue obtenida utilizando activina A. Se ha demostrado que la activina A es secretada por diversos tipos celulares en el testículo durante el período fetal y postnatal (Roberts y col., 1989; de Winter y col., 1994; Barakat y col., 2008; Archambeault y Yao, 2010). Cabe destacar que se ha demostrado que la activina A está presente en los testículos humanos fetales y que la misma aumenta el porcentaje de células de Sertoli marcadas con Ki-67 de testículos fetales humanos en cultivo (Anderson y col., 2002; Archambeault y col., 2011). Con respecto a las acciones de activina A en el período posnatal, se ha observado que este péptido tiene un efecto sinérgico con FSH sobre la

proliferación celular (Boitani y col., 1995; Buzzard y col., 2003a). Adicionalmente, se observó que ratones que poseen una delección del gen para el receptor de activina presentan un menor número de células de Sertoli (Matzuk y col., 1995). En conjunto, los estudios sugieren que la activina A estimula la proliferación de la célula de Sertoli tanto en el período fetal como postnatal. Por otro lado, en lo que respecta a la activina B, existe evidencia que sugiere que la misma no participa en la proliferación de las células de Sertoli ni en el desarrollo testicular (Schrewe y col., 1994).

En cuanto a las inhibinas, se ha demostrado que la inhibina B es la principal inhibina circulante en machos y que es producida principalmente por las células de Sertoli en los testículos (Anawalt y col., 1996; Anderson y col., 2002; Barakat y col., 2008). Además, un estudio postuló que la inhibina B ejerce una inhibición de la proliferación de la célula de Sertoli (Matzuk y col., 1992). En resumen, se puede decir que la activina A estimula la proliferación de células de Sertoli durante el período fetal y posnatal, y es el aumento de los niveles de inhibina B en la pubertad lo que contrarresta los efectos de la activina A.

Factores que promueven el cese de la proliferación

El cese de la proliferación de las células de Sertoli se acompaña de un proceso de maduración que consiste en cambios profundos que conllevan a la adquisición de la capacidad para sustentar el desarrollo de las células germinales. En la siguiente sección se resumirá el conocimiento actual sobre el papel de los andrógenos, los estrógenos, el ácido retinoico y las hormonas tiroideas, los cuales poseen una relevancia fisiológica destacable en el cese de la proliferación y la maduración de la célula de Sertoli.

- **Andrógenos**

Los andrógenos juegan un papel central en el desarrollo y mantenimiento de los caracteres sexuales secundarios y, asimismo, en la espermatogénesis. Estas hormonas ejercen la mayoría de sus efectos mediante acciones genómicas, que implican la difusión a través de la membrana plasmática para unirse al receptor de andrógenos (AR). La interacción del esteroide con el AR provoca un cambio conformacional en el receptor, de manera que el AR unido al ligando se transloca posteriormente al núcleo, donde interactúa con los elementos de respuesta a los andrógenos (ARE) en las regiones promotoras de genes, reclutando proteínas correguladoras y regulando la transcripción génica. Estudios realizados sobre cortes de testículo utilizando técnicas de inmunohistoquímica e hibridización *in situ* demostraron que el AR se expresa en células de Sertoli, células de Leydig y células peritubulares (Sar y col., 1990; Shan y col., 1995, 1997), mientras que su expresión en células germinales hoy en día sigue siendo controversial ya que los estudios realizados hasta el momento no arrojaron resultados concluyentes (Bremner y col., 1994; Vornberger y col., 1994; Zhou y col., 1996; Grootegoed y col., 1977). Respecto a la expresión del AR a lo largo del desarrollo de las células de Sertoli, se ha observado que el mismo está ausente en el periodo fetal, y su nivel de expresión aumenta de manera progresiva a lo largo del desarrollo postnatal (Buzek y Sanborn, 1988; Bremner y col., 1994; You y Sar, 1998). En general, se creía que los andrógenos no desempeñaban un papel relevante en la regulación de la proliferación de células de Sertoli en roedores, principalmente porque el AR se expresa débilmente en las células de Sertoli durante la vida postnatal temprana. Precisamente, el hecho de que el tratamiento de ratones neonatos con propionato de testosterona no modificara la expresión de marcadores de proliferación (c-Myc y PCNA) en células de Sertoli se interpretó como consecuencia de los bajos niveles de expresión de AR (Zhou y col., 2005). Sin embargo, Tan y colaboradores (2005) postularon un efecto positivo de los andrógenos en la proliferación de la célula de Sertoli. Estos autores trataron a ratas

neonatas con flutamida, que tiene acción antiandrogénica, y observaron un número reducido de células de Sertoli a pesar de la presencia de niveles elevados de FSH. El estudio realizado en ratones con KO selectivo del AR en células de Sertoli (SCARKO) abrió nuevas posibilidades para dilucidar el papel que juegan los andrógenos en la regulación de la proliferación. En contraste con lo que se observó en animales tratados con flutamida, el número final de células de Sertoli en ratones SCARKO no se vio modificado (Tan y col., 2005). Los resultados en conjunto indicaban que los andrógenos no regulan en forma directa la proliferación de las células de Sertoli y sugerían que podrían ejercer un efecto proliferativo en forma indirecta. En este contexto, las células peritubulares expresan el AR a lo largo de la vida fetal y postnatal (You y Sar, 1998; Pelletier y col., 2000). Asimismo, se ha demostrado que los ratones con KO selectivo del AR en células peritubulares (PTMC- $Ar^{-/y}$) exhiben una disminución en el peso testicular y en el recuento de espermatozoides, y aunque no se ha determinado el número de células de Sertoli en dichos animales, es razonable pensar que la reducción en el número de células germinales en este modelo podría ser una consecuencia de una disminución en el número de células de Sertoli (Zhang y col., 2006). Teniendo en cuenta que existe evidencia de que la activina A producida por las células peritubulares puede estimular la proliferación de células de Sertoli (Buzzard y col., 2003a), se propuso que dicho péptido podría ser el factor paracrino involucrado en la acción indirecta de los andrógenos. El desarrollo de un modelo transgénico que expresa prematuramente el AR de manera específica en células de Sertoli permitió demostrar que los andrógenos inducen la maduración celular de forma directa. Además, una expresión prematura de AR en las células de Sertoli conlleva la reducción de la cantidad de células inmaduras disponibles para la expansión mitótica inducida por FSH y deriva en unas pocas células de Sertoli en la adultez (Hazra y col., 2013). De acuerdo con estos descubrimientos, Buzzard y colaboradores (2003b) habían demostrado con anterioridad que la testosterona

inhibe la proliferación de la célula de Sertoli de rata en cultivos primarios a través de la inducción de los inhibidores del ciclo celular de la familia CIP/KIP, p21^{Cip1} y p27^{Kip1}.

En resumen, mientras que los efectos directos de los andrógenos sobre la célula de Sertoli parecerían estar relacionados con el cese de la proliferación y, por ende, con la maduración de este tipo celular, los efectos indirectos de estas hormonas esteroideas se relacionarían con la inducción de la proliferación a través de la secreción de activina A.

- **Estrógenos**

Otras hormonas que desempeñan un papel importante en la regulación del desarrollo testicular y la espermatogénesis son los estrógenos (Hess y Carnes, 2004; Carreau y Hess, 2010). El 17 β -estradiol (E2) es el estrógeno predominante y más activo, producido a partir de la testosterona por la enzima aromatasa citocromo P45019A1, codificada por el gen *Cyp19a1* (Santen y col., 2009), y presente en las células de Sertoli y Leydig, espermatoцитos y espermátidas (Tsai-Morris y col., 1985; Nitta y col., 1993). Los estrógenos también ejercen la mayoría de sus efectos mediante acciones genómicas, que están mediadas, en este caso, por el receptor nuclear clásico de estrógeno alfa (ER α) y el receptor de estrógeno beta (ER β). En cuanto a la expresión del receptor en el testículo, estudios de hibridación *in situ* e inmunohistoquímicos realizados en ratas de todas las edades sugirieron que ER β estaba presente en los núcleos de las células de Sertoli y Leydig, mientras que ER α solo estaba presente en el espacio intersticial (Fisher y col., 1997; Van Pelt y col., 1999). Sin embargo, la presencia de ER α en las células de Sertoli fue evidenciada años más tarde (Lucas y col., 2008). Existe evidencia que sugiere que el tratamiento con estrógenos reduce el número de células de Sertoli en roedores durante los períodos proliferativos (Atanassova y col., 1999). Por otro lado, es sabido que los estrógenos podrían regular tanto la proliferación como la maduración celular dependiendo de la isoforma del receptor a través de la cual ejercen su efecto. La proliferación de las células de Sertoli es modulada a través del ER α , mientras que la salida del ciclo celular y la maduración

involucran al ER β . Teniendo en cuenta que la expresión del ER α disminuye mientras que la del ER β aumenta con la edad de los animales, se postuló que la relación ER α /ER β es fisiológicamente relevante para determinar el final de la proliferación celular y el inicio de la diferenciación celular (Lucas y col., 2014). En cuanto a las vías de señalización implicadas en la acción del estrógeno en las células de Sertoli, Lucas y colaboradores (2014) han demostrado que la interacción de E2 con ER β promueve la salida del ciclo celular y la maduración celular a través de la activación de CREB de manera dependiente de PI3K.

- **Ácido retinoico**

Continuando con la descripción de los factores que regulan el cese de la proliferación y la maduración de las células de Sertoli, se puede mencionar a la vitamina A, cuya forma biológicamente activa es el ácido retinoico (RA). Durante décadas se ha reconocido que la señalización a través de este factor es esencial para la reproducción masculina. Diversos estudios demostraron que la actividad del receptor de RA aumenta considerablemente en el momento del cese de la proliferación de las células de Sertoli, disminuyendo el estímulo ejercido por FSH y por activina A sobre la proliferación de este tipo celular (Cavazzini y col., 1996; Buzzard y col., 2003b; Nicholls y col., 2013). Se podría decir, entonces, que el RA participa en el cese de la proliferación de la célula de Sertoli.

- **Hormonas tiroideas**

Por último, se puede mencionar a las hormonas tiroideas (TH), la triyodotironina (T3) y la tetrayodotironina (T4), las cuales son reguladoras críticas del crecimiento, el desarrollo y el metabolismo en prácticamente todos los tejidos. Ha sido demostrado, mediante diversos estudios *in vivo* e *in vitro*, que las hormonas tiroideas participan en la detención de la proliferación de la célula de Sertoli (De Franca y col., 1995). En estudios *in vivo* en animales adultos hipotiroideos ha sido reportado un incremento en el número de

células de Sertoli y, en consecuencia, una aumentada producción diaria de espermatozoides y gran tamaño testicular (Cooke y col., 1991; Cooke y Meisami, 1991). Por otro lado, en estudios *in vitro* se observó que T3 inhibía el estímulo por FSH de la incorporación de [³H]-timidina en cultivos de células de Sertoli (Cooke y col., 1994; Palmero y col., 1995), y que esto estaba acompañado por un aumento en la expresión de los inhibidores del ciclo celular (Buzzard y col., 2003b). Asimismo, ha sido demostrado que el tratamiento con hormonas tiroideas incrementó la expresión de marcadores de maduración —inhibina B y AR— y disminuyó la expresión de marcadores de células de Sertoli inmaduras, como la aromatasa y la hormona antimülleriana (AMH) (Cooke y col., 1994; Ulisse y col., 1994; Palmero y col., 1995; Arambepola y col., 1998).

Respecto de la participación de las vías de transducción de señales en los efectos de la hormona tiroidea sobre las células de Sertoli inmaduras, la misma ha sido escasamente analizada. Dado que una de las funciones bien conocidas de la hormona tiroidea está relacionada con el metabolismo energético, se puede proponer que el efecto de esta hormona sobre la proliferación de las células de Sertoli podría estar vinculado a la regulación metabólica. En este contexto, —y considerando que se ha demostrado que la hormona tiroidea activa AMPK en varias líneas celulares (Irrcher y col., 2008; Yamauchi y col., 2008; Videla y col., 2014)—, se podría plantear la hipótesis de que la hormona tiroidea utiliza sensores energéticos celulares como la proteína quinasa AMPK, mencionada con anterioridad, como mediadora de sus acciones sobre las células de Sertoli inmaduras. En conjunto, la evidencia indica que las acciones de las hormonas tiroideas son centrales en la transición de un fenotipo de células de Sertoli inmaduro a uno funcionalmente maduro.

A lo largo de las secciones desarrolladas hasta este punto, se ha hecho hincapié en la idea de que la proliferación celular es un proceso minuciosamente regulado, en el cual participan tanto hormonas como factores de producción local. Asimismo, es posible considerar a este proceso biológico extremadamente exigente ya que, para satisfacer las

altas demandas de nutrientes —como glucosa y aminoácidos— necesarias para sostener las vías biosintéticas que acompañan el crecimiento (aumento de biomasa) y la división celular (aumento del número de células), las células en proliferación llevan adelante una reorganización de su metabolismo. En la siguiente sección se expondrán las implicancias de la reprogramación metabólica, donde se destacan dos vías metabólicas clave para el sostenimiento de la proliferación celular: la glucólisis aeróbica y la glutaminólisis.

CARACTERÍSTICAS METABÓLICAS DE LAS CÉLULAS QUE PROLIFERAN

Mientras que las células maduras que ya no proliferan dependen principalmente de la fosforilación oxidativa para generar la energía necesaria para los procesos celulares, las células en proliferación sufren cambios metabólicos para permitir el avance del ciclo celular. Estos cambios ocurren principalmente en dos vías metabólicas clave: la glucólisis aeróbica y el metabolismo del aminoácido L-gln/glutaminólisis. Pese al creciente interés en el estudio del metabolismo celular, es importante destacar que actualmente existen escasos trabajos en la literatura que describan los cambios metabólicos que ocurren como consecuencia de la progresión del ciclo celular en células que proliferan fisiológicamente, debido a que la mayoría han sido llevados a cabo en células tumorales o líneas inmortalizadas. Los siguientes párrafos, de forma resumida, nos adentrarán en ciertos cambios claves del metabolismo que ocurren en las células que entraron en ciclo celular, centrándose en la glucólisis aeróbica y el metabolismo de L-gln/glutaminólisis.

Glucólisis aeróbica. Efecto Warburg

A mediados del siglo XX, el fisiólogo alemán Otto Warburg, al estudiar el metabolismo de las células tumorales, observó por primera vez que las mismas eran capaces de oxidar rápidamente glucosa a lactato, incluso en presencia de cantidades adecuadas de oxígeno, lo que derivó en el fenómeno actualmente conocido como efecto

Warburg o glucólisis aeróbica (Warburg, 1956). Este trabajo fue pionero ya que permitió develar el fenotipo metabólico de las células tumorales y sentó las bases para estudios posteriores en el campo de la oncología y para la formalización del oncometabolismo como una subdisciplina de la biología del cáncer. No obstante, a pesar de considerar la glucólisis aeróbica como un sello distintivo del cáncer, el hallazgo de Warburg generó debate, además, sobre el papel de la glucólisis en la proliferación celular fisiológica. Años de investigaciones han permitido establecer que, hoy en día, el efecto Warburg también es relevante para sustentar las necesidades metabólicas en las células que proliferan fisiológicamente (Vander Heiden y col., 2009; Agathocleous y Harris, 2013). De aquí se desprenden dos ideas clave: por un lado, que el metabolismo energético celular, ante un ciclo celular activo, debe ser estrictamente regulado; y, por el otro, que existe una correlación muy estrecha entre el flujo glucolítico y la proliferación. Hasta el momento de este trabajo de tesis, este último aspecto en particular no ha sido evaluado en la célula de Sertoli con capacidad proliferativa.

En lo que respecta a la vía glucolítica, es bien sabido que la misma se modula ralentizando o acelerando ciertos pasos clave de la vía. El primero de ellos es la fosforilación de la glucosa a glucosa-6-fosfato (Glc-6-P), catalizado por acción de la hexoquinasa (HK). Si bien la actividad enzimática de la HK puede considerarse como regulatoria, la misma no es específica de la glucólisis dado que la Glc-6-P es un sustrato común a más de una ruta metabólica. Es por ello que podría considerarse que la actividad HK no reflejaría de manera completa la actividad de la vía glucolítica. Por el contrario, la actividad de la enzima 6-fosfofructo-1-quinasa (PFK1) es específica de la glucólisis y cataliza el paso limitante de la vía, estrictamente controlado. Esta enzima presenta varios sitios alostéricos intervinientes en la activación o desactivación de su acción catalítica. Entre los efectores alostéricos, la fructosa 2,6-bifosfato (Fru-2,6-P₂) es el activador más potente de la PFK1 e indudablemente aumenta el flujo glucolítico (Hue y Rider, 1987). En

este contexto, los niveles celulares de Fru-2,6-P2 dependen enteramente de la actividad de la enzima bifuncional 6-fosfofructo-2-quinasa/fructosa-2,6-bisfosfatasa (PFKFB), que cataliza tanto la síntesis como la degradación de Fru-2,6-P2. En mamíferos, se han descrito cuatro isoformas de PFKFB, PFKFB1-4, que presentan propiedades distintivas, como los perfiles de expresión tisular, la proporción de sus actividades quinasa/fosfatasa y su respuesta a señales hormonales y de factores de crecimiento (Rider y col., 2004). Entre ellas se destaca la actividad de la PFKFB3, ya que es la única cuya actividad fructosa-2,6-bisfosfatasa es casi nula, por lo que su solo aumento de expresión correlaciona con un aumento de los niveles de Fru-2,6-P2 y, por lo tanto, del flujo glucolítico (Sakakibara y col., 1997; Ros y Schulze, 2013). En el testículo, se ha demostrado la expresión de PFKFB1-3 en células de Sertoli y de PFKFB4 en células germinales (Gomez y col., 2009; Regueira y col., 2015).

Si bien PFK1 cataliza un punto clave en el control de la velocidad de la vía, la actividad enzimática de la piruvato quinasa (PK), responsable de la conversión de fosfoenolpiruvato en piruvato, también está comprometida en la regulación del flujo glucolítico. Además de las isoformas hepática (L) y eritrocitaria (R), esta enzima presenta otras dos isoformas en mamíferos: las isoformas musculares M1 y M2 (Jurica y col., 1998). En particular, la actividad de PK en testículos de rata solo puede atribuirse a PKM2 (Imamura y Tanaka, 1972). Cabe destacar que PKM2 puede encontrarse como dímero, el cual posee baja afinidad por su sustrato, fosfoenolpiruvato, o como tetrámero, el cual presenta alta afinidad por el mismo (Mazurek, 2010). La relación dímero/tetrámero en una célula está regulada por los niveles de fructosa-1,6-bisfosfato, ya que el producto de la reacción catalizada por PFK1 induce la reasociación de dos dímeros de PKM2 y, en consecuencia, estabiliza la forma tetramérica (Christofk y col., 2008). De esta manera, la actividad PKM2 correlaciona con un aumento del flujo glucolítico.

Como se mencionó previamente, la glucólisis aeróbica se caracteriza por el hecho de que la mayoría del piruvato no se destina a la descarboxilación oxidativa, sino que es reducido a lactato, reacción catalizada por la enzima lactato deshidrogenasa (LDH), incluso en presencia de oxígeno. En este contexto, la LDH se convierte en una enzima clave del efecto Warburg (Li y Zhang, 2016). Hasta ahora se han descrito seis isoenzimas de la LDH: 1-5 y C4. Estas isoenzimas son tetraméricas, cuyas subunidades están codificadas por tres genes diferentes: *Ldha*, *Ldhb* y *Ldhc* (Li y col., 1989). La isoenzima LDHC4 es un homotetrámero conformado por cuatro subunidades LDHC que solo presenta expresión en el testículo maduro, específicamente en las células germinales y los espermatozoides (Markert y col., 1975). Las combinaciones de los otros dos productos génicos dan lugar a cinco isoenzimas LDH homo o heterotetraméricas, LDH1 (B4), LDH2 (A1B3), LDH3 (A2B2), LDH4 (A3B1) y LDH5 (A4), las cuales presentan patrones de expresión variables en diferentes tejidos somáticos, incluyendo las células de Sertoli de rata (Santiemma y col., 1987) y, a su vez, ostentan propiedades cinéticas distintivas (Figura 7). Cabe destacar que LDH1 (B4), también conocida como isoenzima cardíaca, es inhibida por altas concentraciones de piruvato, mientras que LDH5 (A4), isoenzima muscular, no se inhibe en esas condiciones (Cahn y col., 1962; Pesce y col., 1964). De esta manera, aquellas isoenzimas que presentan en su constitución una mayor proporción de subunidades LDHA poseen características cinéticas que favorecen la producción de lactato.

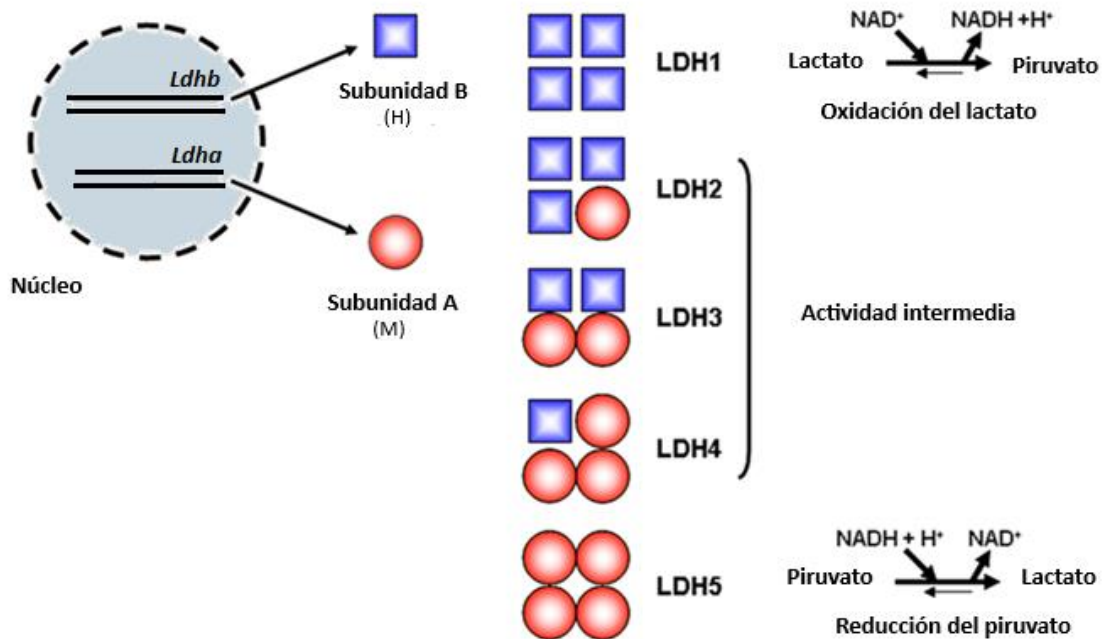


Figura 7. Isoenzimas LDH. Los productos de expresión de los genes *Ldhb* y *Ldha* se combinan para dar lugar a cinco enzimas distintas, LDH1-5. LDH5 cataliza preferentemente la reducción de piruvato en lactato, mientras que LDH1 cataliza preferentemente la oxidación de lactato en piruvato. LDH2, LDH3 y LDH4 tienen actividades enzimáticas intermedias. Imagen obtenida de Porporato y colaboradores (2011) y modificada digitalmente.

Al profundizar en los estudios metabólicos realizados en células de cáncer, los análisis de patrones de expresión de varios tipos de tumores permitieron aseverar que la expresión de proteínas implicadas en la vía glucolítica estaba incrementada, destacándose: la isoforma 3 de la PFKFB (PFKFB3), la isoforma PKM2 y la subunidad LDHA (Estévez-García y col., 2014). En este punto, cabe aclarar que la expresión de estas enzimas glucolíticas está estrechamente controlada para regular el flujo glucolítico según las necesidades metabólicas de la célula. Existe evidencia que sugiere que, en contextos tumorales, los cambios en el metabolismo celular asociados con la progresión del ciclo celular son controlados por mTORC1 (Lunt y Vander Heiden, 2011), por ejemplo, a través de la inducción de la expresión de genes que codifican para proteínas involucradas en vías metabólicas clave (Yecies y Manning, 2011). De esta manera, es posible considerar que las señales que promueven la proliferación celular también reorganizan la actividad metabólica. Curiosamente, se ha demostrado que la expresión de muchos de los genes que codifican para proteínas intervinientes en la glucólisis, conocidos en su conjunto como

genes glucolíticos, depende de la actividad del factor de transcripción c-Myc, entre ellos, *Ldha*, *Pkm2* y *Pfkfb3* (Broecker-Preuss y col., 2017; Kleszcz y col., 2018; Pang y col., 2024). Dado que los niveles proteicos de c-Myc dependen de la actividad de mTORC1, lógicamente se plantea la posible existencia de una estrecha relación entre la actividad de mTORC1, la actividad transcripcional de c-Myc, y la expresión de genes glucolíticos en conjunto con aquellos que promueven la progresión del ciclo celular. Por lo tanto, la activación de mTORC1 conllevaría a un incremento del flujo glucolítico conjuntamente con la inducción de la proliferación. Asimismo, existe evidencia que sugiere que la glucólisis podría cooperar con factores de crecimiento u hormonas para modular la vía de señalización de mTORC1 (Otto, 2020). Considerando este escenario biológico, se ha propuesto una regulación recíproca entre mTORC1 y la glucólisis aeróbica, avalando la existencia de un fenómeno “glycolysis-mTORC1 crosstalk”. En este contexto, cabe destacar que en diversos estudios se observó, por un lado, que la inhibición del mTORC1 conduce a la disminución del flujo glucolítico (Sun y col., 2011; Shi y col., 2018); y, por el otro, que la inhibición de la glucólisis conlleva a la inhibición de la vía mTORC1 y, en consecuencia, al arresto del ciclo celular de distintas líneas celulares tumorales y no tumorales inmortalizadas (Lee y col., 2009; Byun y col., 2019; Orozco y col., 2020). Esto sugiere que el flujo glucolítico podría estar ejerciendo cierta influencia en la actividad de mTORC1. No obstante, los mecanismos moleculares que subyacen a este proceso aún no han sido plenamente dilucidados. En consecuencia, se propone que la actividad de mTORC1 podría estar controlada no solo por mitógenos, sino también por metabolitos de la vía glucolítica. En este punto cabe destacar que Byun y colaboradores (2019) propusieron al lactato como potencial modulador de la actividad de mTORC1.

Dado que se ha descrito que las células que proliferan fisiológicamente presentan las mismas necesidades metabólicas que las células tumorales, hipotetizamos que las células de Sertoli inmaduras posean perfiles metabólicos semejantes. Considerando que

la proliferación de la célula de Sertoli es regulada por FSH de manera mTORC1 dependiente, es posible inferir que dicha vía podría regular la expresión de aquellas proteínas implicadas en la vía glucolítica. En consecuencia, esto aumentaría el flujo glucolítico que, a su vez, podría modular la actividad mTORC1 con el objeto de afrontar la elevada demanda metabólica inherente al crecimiento celular. Cabe mencionar que dichos aspectos continúan aún sin ser esclarecidos.

Por otro lado, las características metabólicas del fenotipo maduro de la célula de Sertoli han sido ampliamente descritas. Es sabido que las células de Sertoli maduras metabolizan activamente la glucosa a lactato. Numerosos estudios permitieron definir que el lactato producido por la célula de Sertoli cumple una función nutricional fundamental para el desarrollo de las células germinales (Jutte y col., 1981; Robinson y Fritz, 1981; Grootegoed y col., 1986). En este contexto, es el metabolismo lipídico el que satisface las demandas energéticas de la propia célula de Sertoli madura (Xiong y col., 2009). Si bien la regulación del metabolismo energético en células de Sertoli maduras se ha explorado exhaustivamente, aún no se han evaluado los cambios metabólicos que ocurren en las células de Sertoli que aún mantienen su capacidad de proliferación. En conjunto, hasta el momento de la escritura de esta tesis aún no se ha investigado si la glucólisis aeróbica está regulada por la FSH a través de la vía mTORC1 en células de Sertoli inmaduras, así como tampoco se ha evaluado la participación de la glucólisis en la regulación de la proliferación de células de Sertoli.

Metabolismo del aminoácido glutamina/glutaminólisis

El hallazgo de Otto Warburg dio lugar a un sinnúmero de trabajos que han contribuido significativamente al conocimiento actual sobre las características metabólicas de células proliferantes. Pese a que la mayoría de los estudios han sido llevados a cabo en células de cáncer o líneas inmortalizadas, hoy en día es ampliamente sabido que el metabolismo de

las células que ingresan al ciclo celular, tanto normales como tumorales, no solo es dependiente de glucosa, sino que también puede depender de L-gln (Krebs, 1980; McKeehan, 1982; Kovacevic y McGivan, 1983; Yoo y col., 2020). Existe evidencia que establece que el consumo de L-gln en las células con capacidad proliferativa supera con creces las demandas de cualquier otro aminoácido (Willems y col., 2013; Wang Q y col., 2014; Wang y col., 2015; Ye y col., 2018). Dado que la tasa de metabolización de L-gln supera la capacidad biosintética de la célula, a pesar de ser un aminoácido no esencial, el mismo se considera condicionalmente esencial en estas circunstancias (Yoo y col., 2020). De aquí se desprende que la dependencia de la L-gln es considerada un sello metabólico distintivo de las células que proliferan, aspecto descrito por primera vez en células tumorales. Con el correr de los años y las investigaciones, este fenómeno ha derivado en lo que se conoce como “adicción” a la L-gln (Wise y Thompson, 2010). Teniendo esto en mente, se vuelve fundamental considerar que existe una correlación muy estrecha entre la demanda de L-gln y la proliferación que hasta el momento de este trabajo de tesis no ha sido estudiada en la célula de Sertoli con capacidad proliferativa.

El aminoácido L-gln es el más abundante en sangre, alcanzando concentraciones séricas cercanas a 1 mM. En cuanto a la disponibilidad de L-gln dentro de las células, además de la degradación proteica, el aminoácido puede obtenerse mediante i) biosíntesis *de novo* mediante la acción de la enzima glutamina sintetasa (GS) (Eisenberg y col., 2000), cuya expresión es ubicua, pero sus niveles son notables en el hígado, el cerebro y el músculo (Frieg y col., 2021); o ii) su entrada desde el medio extracelular a través de transportadores específicos de aminoácidos neutros. Se cree que los miembros de la familia 38 de transportadores de solutos (SLC) son los principales transportadores de L-gln (Bhutia y Ganapathy, 2016), y es sabido que el miembro A5 de la misma (SLC38A5) se expresa en el testículo (Nakanishi y col., 2001). Además, las células de Sertoli expresan el transportador de L-gln más estudiado, SLC1A5 (Mateus y col., 2018). Es así que una vez

dentro de la célula, el aminoácido puede utilizarse como principal fuente de nitrógeno para las bases de nucleótidos y la biosíntesis de proteínas y, además, puede secretarse de la célula a cambio de otros nutrientes, como los aminoácidos de cadena ramificada. En este último caso, se ha demostrado que la L-gln promueve el ingreso de aminoácidos esenciales, principalmente de leucina (L-leu), a través de un transporte bidireccional mediado por el dímero SLC7A5/SLC3A2. De esta manera, la salida de la L-gln permite el ingreso de aminoácidos esenciales facilitado por el transportador (Nicklin y col., 2009).

Otro destino intracelular de la L-gln es ser metabolizada mediante glutaminólisis (Yoo y col., 2020). Esta vía metabólica convierte la L-gln en un metabolito intermediario del ciclo de Krebs, el α -cetoglutarato (α -KG). El primer paso —y el limitante de la velocidad— de la glutaminólisis es la desamidación de L-gln para obtener glutamato (L-glu), reacción catalizada por las isoenzimas glutaminasa (GLS) 1 o GLS2. Ambas enzimas difieren en sus propiedades cinéticas y perfiles de expresión específicos de tejido: mientras que GLS1 se expresa de forma ubicua con niveles más altos en el riñón, GLS2 está restringida a unos pocos tejidos, y particularmente se encuentra enriquecida en el hígado (Smith y Watford 1990, Curthoys y Watford 1995). En una segunda reacción, catalizada por la enzima glutamato deshidrogenasa (GLUD o GDH), el L-glu es desaminado oxidativamente para dar lugar a α -KG y amoníaco. La GDH está regulada alostéricamente por varios efectores, entre ellos el GTP como regulador negativo y la L-leu como activador (Sener y Malaisse, 1980; Frigerio y col., 2008; Li y col., 2012). De esta manera, el aminoácido esencial L-leu se une a la enzima GDH y la activa para estimular la desaminación del L-glu y, por consiguiente, la producción de α -KG. En células que proliferan activamente se ha demostrado que, en la mitocondria, el α -KG puede tener dos destinos posibles: continuar su oxidación en el ciclo de Krebs o ser convertido en isocitrato y luego en citrato para, finalmente, promover la síntesis *de novo* de ácidos grasos (Durán y col., 2012).

Existe evidencia que sugiere que las células en proliferación exhiben una mayor expresión de genes que codifican proteínas involucradas en el metabolismo de la L-gln (Shen y col., 2021). En este contexto, es posible pensar que la expresión de estas enzimas se encuentra estrechamente controlada según las necesidades metabólicas de la célula. Teniendo en cuenta que se ha descrito que la expresión de los genes que codifican para proteínas intervinientes en el metabolismo de la L-gln depende de la actividad transcripcional de c-Myc (Wise y col., 2008; Xiao y col., 2015), y que —como se ha hecho hincapié en párrafos anteriores— los niveles proteicos de dicho factor de transcripción dependen de la actividad mTORC1 (Bautista y col., 2018), sería de esperar que las mismas señales que regulan positivamente la proliferación, también aumentan la metabolización de la L-gln. Por lo tanto, en este escenario biológico, y paralelamente a lo observado para la glucólisis aeróbica, no sería ilógico pensar en la existencia de una posible relación estrecha entre la actividad de mTORC1, la actividad transcripcional c-Myc, y la expresión de genes que codifican proteínas involucradas en el metabolismo de la L-gln, que promueve la progresión del ciclo celular. De esta manera, juntamente con la inducción de la proliferación, la activación de mTORC1 conllevaría a un incremento de la demanda de L-gln. Dado que se ha descrito que las células que proliferan fisiológicamente presentan las mismas necesidades metabólicas que las células tumorales, sería de esperar que las células de Sertoli inmaduras posean perfiles metabólicos semejantes. Considerando que la proliferación de la célula de Sertoli es regulada por FSH de manera mTORC1 dependiente, se podría deducir que dicha vía podría regular la expresión de aquellas proteínas implicadas en el metabolismo de la L-gln y, en consecuencia, incrementar el requerimiento de dicho aminoácido con el objeto de afrontar la elevada demanda metabólica inherente al crecimiento celular. En este punto, cabe mencionar que dichos aspectos continúan sin ser dilucidados aún.

Por otro lado, debe considerarse que, pese a que los aminoácidos son la señal primordial para modular la actividad de mTORC1, son los aminoácidos esenciales — principalmente L-leu— los que mantienen al complejo proteico activo (Yao y col., 2017). No obstante, considerando que la disponibilidad celular de aminoácidos esenciales, más específicamente de L-leu, depende de su transporte mediado por L-gln, puede inferirse que es L-gln *per se* el aminoácido necesario para la completa activación de mTORC1 (Nicklin y col., 2009). De esta manera, la L-gln podría cooperar en la inducción de la proliferación a través de esta vía (Yuan y col., 2015; Li y Yan, 2019; Hu y col., 2023). En este contexto, se ha propuesto la existencia de una regulación recíproca entre mTORC1 y el metabolismo de la L-gln. Tal es así, que se ha observado que la inhibición de la entrada de L-gln a las células tumorales o el bloqueo de la actividad de enzimas intervinientes en su metabolización — específicamente la actividad GLS—, conduce a un arresto del ciclo celular como consecuencia de la disminución de la actividad de mTORC1 (Seltzer y col., 2010; Wang y col., 2010; Lee y col., 2014). De esta forma, se propone que la actividad de mTORC1 podría estar controlada también por la propia L-gln y/o por los metabolitos derivados de su degradación. En este contexto, un estudio realizado por Durán y colaboradores (2012) sugirió al α -KG como un posible modulador de la actividad de mTORC1.

Son pocos los trabajos existentes en la literatura que abordan el estudio del metabolismo de la L-gln en la célula de Sertoli, y los pocos que existen fueron realizados en cultivos de células de Sertoli maduras (Kaiser y col., 2005; Matheus y col., 2018). Dado que la L-gln se torna condicionalmente esencial ante las demandas metabólicas incrementadas en células en estado proliferativo, no sería ilógico pensar que durante la progresión del ciclo celular en la célula de Sertoli aumentaría la demanda de L-gln, lo que llevaría a la célula a un estado metabólico “adicto” a dicho aminoácido. Pese a que el rol de la L-gln en la regulación de la proliferación celular ha despertado interés en la última década, hasta el momento de este trabajo de tesis no existen conocimientos sobre la

regulación del metabolismo de dicho aminoácido y su relación con la proliferación de la célula de Sertoli. Más específicamente, aún se desconoce la participación de la L-gln en la regulación de la proliferación de células de Sertoli mediada por FSH; si la FSH es capaz de modular el metabolismo de la L-gln; y, a su vez, si el metabolismo de la L-gln coopera con la FSH en el control de la progresión del ciclo celular en células de Sertoli inmaduras.

Regulación de la función celular por metabolitos

Las secciones anteriores intentaron describir de forma simplificada los cambios metabólicos y sus respectivas regulaciones que se suceden en una célula con capacidad proliferativa. Dichos cambios están acompañados del aumento de intermediarios metabólicos/metabolitos producto de las vías metabólicas más activas. A lo largo de estas últimas décadas, surgió un interrogante debido a evidencias ligadas a la activación de vías de señalización desencadenadas por un mayor flujo metabólico. El razonamiento lógico condujo a diversos grupos de investigación a postular ciertos metabolitos como moléculas reguladoras o segundos mensajeros. Dado que el aumento del flujo glucolítico y la glutaminólisis conducen a un incremento de los niveles celulares de sus respectivos productos finales, se consideran al lactato y al α -KG como excelentes candidatos. En esta sección se desarrollará este concepto con mayor detalle.

- **Lactato**

Desde su descubrimiento en 1780 por Carl Wilhelm Scheele, el lactato ha sido erróneamente considerado como desecho celular o una simple fuente energética. Sin embargo, evidencias recientes sugieren un papel crucial del hidroxiaácido en la biología celular (Certo y col., 2022). Las células de mamífero típicamente presentan concentraciones de lactato entre 1 y 3 mM en un estado de reposo, pero pueden elevarse hasta más de 15 mM durante el ejercicio físico e incluso en presencia de una lesión tumoral

activa, los niveles del hidroxiaácido pueden alcanzar concentraciones cercanas a 40 mM en las inmediaciones del tumor (Kes y col., 2020). Tanto la glucosa como el aminoácido L-alanina son la principal fuente de carbono para la producción del lactato a través de la glucólisis —siendo responsable del 85% del hidroxiaácido circulante— y la transaminación, respectivamente (Rogatzki y col., 2015). Particularmente en el testículo, al lactato se le ha asignado durante décadas únicamente el rol de principal fuente energética de espermatoцитos y espermátides, permitiendo mantener la viabilidad de estos tipos celulares, al menos en parte, a expensas de la conservación de los niveles de ATP. Esto fue así hasta que, en 2014, Galardo y colaboradores demostraron que el lactato ejercía funciones de molécula señal promoviendo su propia metabolización a través del aumento de especies reactivas del oxígeno en espermatoцитos y espermátides. De esta manera, no sería de extrañar que en las células de Sertoli cumpla también funciones regulatorias. Teniendo en mente que las células tumorales presentan un flujo glucolítico incrementado, y que las células que proliferan fisiológicamente podrían presentar las mismas necesidades metabólicas que las neoplásicas, postulamos que las células de Sertoli inmaduras metabolizan activamente la glucosa y ello se vería reflejado en niveles de lactato elevados. Y es acá donde surge el interrogante si el lactato podría ser una de las moléculas clave que participe en la regulación conjunta del metabolismo y la progresión del ciclo celular. Precisamente, en estos últimos años se han presentado evidencias que permiten afirmar que el lactato induce la proliferación celular, pero los mecanismos moleculares no han sido esclarecidos hasta el momento (Lampe y col., 2009; Grist y col., 2018; Pötzsch y col., 2021). Sin embargo, los estudios llevados adelante por Byun y colaboradores (2019) podrían dar indicios de los mismos ya que demuestran la existencia de una estrecha cooperación en la señalización entre el lactato y mTORC1.

En consecuencia, y en base a lo expuesto en estos últimos párrafos, se desprende la relevancia que cobra el estudio de la existencia de posibles regulaciones de respuestas

biológicas por lactato en las células de Sertoli ya que el lactato podría estar ejerciendo un rol regulador al participar de los mecanismos que utiliza la FSH para regular la proliferación de la célula de Sertoli inmadura.

- **α -cetoglutarato**

El α -KG ha sido considerado históricamente solo un intermediario del ciclo de Krebs. Sin embargo, evidencias más recientes sugieren un papel crucial del metabolito en múltiples procesos metabólicos. Varios reportes de la literatura sugieren que el α -KG participa en la regulación del metabolismo de los aminoácidos, la modulación de las vías de señalización y la eliminación de especies reactivas de oxígeno (ROS), garantizando así la homeostasis celular y la supervivencia en contextos celulares adversos (Liu y col., 2018). Pese a ser considerado un metabolito principalmente intracelular, diversos estudios han detectado α -KG en el torrente sanguíneo de mamíferos (Rocchiccioli y col., 1984; Martin y col., 1989; Wagner y col., 2010), determinándose concentraciones séricas de entre 10-40 μ M en estado de reposo (Zdzisińska y col., 2017). Curiosamente, se han observado aumentos fisiológicos de los niveles de α -KG en suero después del ejercicio físico, pudiendo llegar a concentraciones de hasta 150 μ M en estas circunstancias (Yuan y col., 2020).

En los últimos años, numerosos estudios han analizado la versatilidad del α -KG como metabolito regulador del metabolismo celular (Zdzisińska y col., 2017; Wilson y Matschinsky, 2021; Hansen y Gibson, 2022). En este contexto, diversos estudios sugieren que el α -KG participa en la proliferación en distintos tipos celulares (Song y col., 2018; Shi y col., 2024); sin embargo, los mecanismos moleculares subyacentes a dicho proceso continúan aún sin ser dilucidados completamente. Existe evidencia que propone una cooperación en la señalización entre el α -KG y mTORC1 en contextos de regulación metabólica. Es así que, si bien se han planteado posibles destinos del α -KG en células que proliferan activamente, existe evidencia que establece que este metabolito, producto de la

glutaminólisis, es suficiente para estimular la activación del complejo proteico mTORC1. En este contexto, en el año 2012, Durán y colaboradores reportaron que en líneas celulares inmortalizadas la glutaminólisis debía estar activa para que ocurra la translocación al lisosoma y la subsiguiente activación de mTORC1. Curiosamente, los investigadores sugirieron una fuerte contribución del α -KG al mecanismo responsable de dicho proceso. Estos últimos hallazgos descriptos llevan a plantear el interrogante de si el α -KG podría ser una de las moléculas clave que participe en la regulación conjunta del metabolismo y la progresión del ciclo celular en las células de Sertoli inmaduras.

Dado que, como fue abordado previamente, el consumo de L-gln en las células proliferantes supera con creces las demandas de cualquier otro aminoácido, se podría pensar que las células de Sertoli inmaduras posean niveles elevados de α -KG, derivados de una glutaminólisis activa, capaces de cooperar en el mecanismo de activación de mTORC1. En este contexto, se torna relevante el estudio de la existencia de un posible rol regulatorio del metabolito α -KG en las células de Sertoli, ya que podría estar formando parte de los mecanismos que utiliza la FSH para regular la proliferación de la célula de Sertoli inmadura.

En conjunto, se puede aseverar que el estudio del posible rol de metabolitos intermediarios de vías metabólicas —como el lactato y el α -KG— como moléculas señal permitirá una mejor comprensión de los mecanismos moleculares que conducen a una normal proliferación de la célula de Sertoli inmadura.

De todo lo expuesto en esta introducción se desprende que la proliferación de la célula de Sertoli inmadura es un proceso que debe ser finamente regulado. Los mecanismos moleculares que participan en dicha regulación, así como la influencia del metabolismo celular en dicho proceso —más específicamente, la participación de la glucólisis y la glutaminólisis en el mismo—, son terreno que no ha sido aún investigado en profundidad. Este trabajo de tesis buscará aportar, entonces, al conocimiento de la

fisiología de la célula de Sertoli que permitirá, en el futuro, entender de manera exhaustiva los aspectos de la fisiopatología testicular que, hasta el momento, se hallan lejos de nuestra comprensión.

OBJETIVOS

El objetivo general de la tesis fue estudiar los complejos mecanismos que operan en el túbulo seminífero que conducen a una normal proliferación a través de la reprogramación metabólica de la célula de Sertoli inmadura.

Los objetivos específicos fueron los siguientes:

1. Evaluar la regulación del metabolismo glucolítico por FSH y la posible participación de la glucólisis en los mecanismos moleculares utilizados por la hormona para inducir la proliferación de la célula de Sertoli.
2. Evaluar la regulación del metabolismo de la glutamina por FSH y la posible participación de la glutaminólisis en los mecanismos moleculares utilizados por la hormona para inducir la proliferación de la célula de Sertoli.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES

Los medios de cultivo de tejidos habituales que contienen L-gln 2.5 mM (DMEM - D5523-, F12 -N6760-) y sin L-gln (DMEM -D5546-, F12 -N4888-) se adquirieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE. UU.). La FSH ovina (NIH-oFSH-S-16) se obtuvo del Programa Nacional de Hormonas e Hipófisis, Instituto Nacional de Diabetes y Enfermedades Digestivas y Renales, NIADDK (Bethesda, MA, EE. UU.). El inhibidor de PFKFB3, 3-(3-piridinil)-1-(4-piridinil)-2-propen-1-ona (3PO), se adquirió de Calbiochem (EMD Millipore Corporation, Chicago, IL, EE. UU.); y el inhibidor de LDH, el oxamato de sodio (OXA), el inhibidor de los transportadores de L-gln, γ -glutamil-p-nitroanilida (GPNA), y el inhibidor de GLS, 6-Diazo-5-oxo-L-norleucina (DON), se adquirieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE. UU.). Los anticuerpos y la rapamicina (Rap; inhibidor de mTOR) se adquirieron de Cell Signaling Technology (New England Biolabs, Ipswich, MA, EE. UU.). Todos los demás reactivos se adquirieron de Sigma-Aldrich.

Los animales fueron provistos por el Bioterio de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires, Argentina. Los animales fueron manipulados de acuerdo con las recomendaciones del Instituto Nacional de la Salud de Estados Unidos (NIH). Todos los protocolos en los que se utilizaron animales fueron aprobados por la Comisión Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) del Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez (Resolución N° 2018/001).

MÉTODOS

Aislamiento y cultivo de células de Sertoli de ratas de 8 días de edad

Las células de Sertoli fueron aisladas a partir de testículos de ratas de 8 días de edad. Los animales fueron decapitados y los testículos fueron extraídos en condiciones de esterilidad. Todo el procedimiento posterior fue realizado bajo flujo laminar. Para el aislamiento de células de Sertoli se utilizó la técnica descrita por Riera y colaboradores (2012). Los testículos fueron decapsulados y sometidos a un tratamiento enzimático con colagenasa 0.03% P/V conteniendo inhibidor de tripsina de soja al 0.003% P/V dejando actuar hasta la liberación de las células intersticiales. El medio utilizado fue 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, penicilina 100 UI/ml, anfotericina B 2.5 µg/ml y albúmina de suero bovino (BSA) 0.1% P/V. Después de la dispersión inicial, los túbulos seminíferos fueron sedimentados y el sobrenadante conteniendo las células intersticiales fue descartado. Los túbulos seminíferos obtenidos por sedimentación fueron lavados dos veces con medio, 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 (solución reguladora 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 liberar las células peritubulares. Dicho tratamiento fue detenido por dilución con 10 volúmenes de medio. A continuación, se realizó una sedimentación de los fragmentos de túbulo seminífero por 15 minutos. Luego de la sedimentación, los fragmentos tubulares fueron tratados nuevamente con una solución de colagenasa 0.03% P/V conteniendo inhibidor de tripsina de soja 0.003% P/V y desoxirribonucleasa 0.03% P/V por 10 minutos. 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 medio. Finalmente, los agregados de

células de Sertoli fueron resuspendidos en medio completo habitual (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 y anfotericina B 2.5 µg/ml) con insulina 5 µg/ml y sembrados a una densidad de 5 µg ADN/cm², en placas de cultivo de 6 o 24 pozos o en portaobjetos multicámara de ocho pozos (Permanox) según corresponda. 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 sin insulina.

Determinación de la viabilidad de células de Sertoli de ratas de 8 días de edad

Las células de Sertoli cultivadas en placas de 24 pozos se lavaron dos veces con PBS y luego las células se recuperaron por el tratamiento con una solución de Tripsina 0.05% P/V y EDTA 0.02% P/V en PBS. La suspensión celular se centrifugó a 400xg durante 5 minutos y se recuperó el sedimento celular. Las células fueron resuspendidas en medio completo y se añadió 0.4% P/V de Azul de Tripán en solución fisiológica. Las células que excluyeron el colorante —viables— y las que resultaron teñidas —no viables— fueron contadas en una cámara de Neubauer. Los resultados fueron expresados como porcentaje (%) del número de células viables respecto al recuento celular total.

Extracción de ARN total y síntesis de ADN copia

El ARN total fue extraído de los cultivos de células de Sertoli cultivadas en placas de 6 pozos utilizando Tri-Reagent (Sigma-Aldrich) de acuerdo con las especificaciones del proveedor. La cantidad de ARN obtenido en cada muestra fue determinada espectrofotométricamente a 260 nm y el ARN fue luego utilizado para la técnica de síntesis de ADN copia (ADNc). El ADNc fue sintetizado a partir de 2 µg de ARN total utilizando 125 ng de cebadores aleatorios, 0.5 mM de la mezcla de dNTPs y 200 UI de la enzima

transcriptasa reversa MMLV (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.) en un volumen final de 20 μ l. Luego de la retrotranscripción (RT), las muestras fueron diluidas hasta un volumen final de 40 μ l.

Análisis de la expresión de genes por RT-reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)

Para cada uno de los genes a analizar se utilizaron 2 μ l de ADNc de células de Sertoli de ratas de 8 días de edad obtenido de la RT que se agregaron a 23 μ l de mezcla de reacción (dNTPs 0.2 mM, cebadores sentido y antisentido 0.5 μ M, GoTaq[®] DNA polimerasa 1.25 UI - Promega, Madison, WI, EE. UU.- y 1X Colorless GoTaq[®] Reaction Buffer -Promega-). Asimismo, se utilizó ADNc de hígado, riñón e intestino delgado de rata como controles positivos de expresión de los genes a estudiar. El programa de amplificación utilizado fue: desnaturalización inicial a 94°C por 5 minutos, 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 segundos seguidos de una hibridización a 60°C por 30 segundos y extensión a 72°C por 30 segundos, sumado a una etapa de elongación final a 72°C por 10 minutos. Los productos de PCR y un marcador de pares de bases (50-pb DNA Ladder, Promega) fueron separados electroforéticamente en gel de agarosa 1% P/V en solución reguladora TBE (Tris 0.44 M, ácido bórico 0.44 M y EDTA 10 mM, pH 8) conteniendo 1X SYBR Safe DNA Gel Stain (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.) lo que permitió la visualización de un único fragmento específico por gen analizado por transiluminación.

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

La RT-qPCR fue realizada utilizando el equipo *StepOnePlus Real Time PCR System* (Applied Biosystems, Warrington, RU). La mezcla de reacción fue preparada usando 12 μ l de SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), con una concentración adecuada (400-900 nM) de los cebadores sentido y antisentido específicos y 3 μ l de la dilución de ADNc de cada muestra en un volumen final de reacción de 15 μ l. 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 fusión. 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 normalizados con β 2-microglobulina como gen control.

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 70 y 150 pares de bases, que estuviesen formados por regiones de más de un exón y que no formasen estructuras secundarias. Una vez seleccionados los pares de cebadores, se verificó su especificidad utilizando el programa NCBI-PrimerBLAST y la amplificación de un único producto a través de la técnica de RT-PCR. En la tabla 1 se muestran las secuencias de los cebadores diseñadas para cada gen analizado.

Gen	Número de entrada	Cebadores
<i>Pfkfb1</i>	NM_012621.4	Sentido: 5'-CCATTACTGAGCCCTTTTCAAG-3' Antisentido: 5'-TGCTACGGACTTCTTCACTGG-3'
<i>Pfkfb2</i>	NM_01033964.1	Sentido: 5'-GTGGTGGCAGTGTTC AAGAG-3' Antisentido: 5'-TTCCCCGTCCGTCTTCTATC-3'
<i>Pfkfb3</i>	NM_057135	Sentido: 5'-CACCTTCTGTCTTTGTTC-3' Antisentido: 5'-GCATCTTCGTTGCTGTATTTCG-3'
<i>Pkm2</i>	XM_003751952.2	Sentido: 5'-AGGCTGCCATCTACCACTTG-3' Antisentido: 5'-CACTGCAGCACTTGAAGGAG-3'
<i>Ldha</i>	NM_017025.1	Sentido: 5'-TCATCGTCTCAAACCCAGTG-3' Antisentido: 5'-ATGAACTCCCAGCCTTTCTC-3'
<i>Ldhb</i>	NM_012595.2	Sentido: 5'-TCTCCAGACTCCGAAAATCG-3' Antisentido: 5'-TTGACGTTTCTCTGCACCAG-3'
<i>c-Myc</i>	NM_012603.2	Sentido: 5'-CACCAGCAGCGACTCTGAA-3' Antisentido: 5'-GACCCTGACTCGGACCTCTT-3'
<i>Ccnd1</i>	NM_171992.4	Sentido: 5'-CTACCGCACAACGCACTTTC-3' Antisentido: 5'-AAGGGCTTCAATCTGTTCCCTG-3'
<i>Ccnd2</i>	NM_022267.1	Sentido: 5'-CTGACCAAGATCACCCACAC-3' Antisentido: 5'-CTCTTAGACGGAAGTCTGAAG-3'
<i>Slc1a5</i>	NM_175758.3	Sentido: 5'-CTCGGCAAATACATCGTGTG-3' Antisentido: 5'-GGTTTTTGC GGGTAAAGAGG-3'
<i>Slc38a5</i>	NM_138854.2	Sentido: 5'-GCAGGAACCAAAGATGAACG-3' Antisentido: 5'-ATGTCTTCCCCTCGAAATCC-3'
<i>Gs</i>	NM_017073.3	Sentido: 5'-ACCCGAGTGGAACTTTGATG-3' Antisentido: 5'-ACTTCGCAGAACACCAGCTT-3'
<i>Gls1</i>	NM_012569.4	Sentido: 5'-GTAGATGGGCAAAGGCATTC-3' Antisentido: 5'-TTGGCTCCTTCCCAACATAG-3'
<i>Gls2</i>	NM_001270786.1	Sentido: 5'-CAATGCTGGTGCTATTGTGG-3' Antisentido: 5'-CTGACTGGAATGTGGCATTG-3'
<i>B2m</i>	NM_012512.2	Sentido: 5'-CGTGATCTTTCTGGTGCTTG-3' Antisentido: 5'-GAGGTGGGTGGAAGTGAAGAC-3'

Tabla 1. Pares de cebadores específicos de rata para el análisis mediante RT-qPCR.

Determinación de los niveles de mTOR y p70S6K fosforiladas

Las células de Sertoli cultivadas en placas de 6 pozos fueron levantadas en hielo con 200 μ l de solución reguladora hipotónica que contenía Tris 10 mM pH 7.5, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, Triton X100 1% P/V, NaF 100 mM, $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ 10 mM, Na_3VO_4 10 mM y cocktail inhibidor de proteasas en concentraciones recomendadas por el fabricante (cOmplete™, Mini, EDTA-free, Protease inhibitor cocktail tablets, Roche, Mannheim, Alemania). Los extractos celulares fueron obtenidos por centrifugación a 1600xg durante 30 minutos a 4°C. Dichos extractos fueron diluidos en una proporción 3:1 con solución reguladora 4x Laemmli (Tris-HCl 0.25 M pH 6.8, SDS 8% P/V, glicerol 40% V/V, β -mercaptoetanol 8% V/V, azul de bromofenol 0.008% P/V), incubados a 100°C por 5 minutos y colocados en hielo. Para la separación de proteínas, 45 μ l de cada muestra (60 μ g de proteínas totales) fueron sembrados en un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes. El gel stacking superior estaba formado por acrilamida/bisacrilamida 4.3% T-2.6% C y el gel resolutivo inferior estaba formado por acrilamida/bisacrilamida 7% T-2.6% C tanto para mTOR como para p70S6K. La electroforesis fue realizada en solución 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.). Luego de la corrida electroforética, los geles fueron equilibrados 10 minutos en solución de transferencia (Tris 0.025 M, glicina 0.192 M; metanol 20% V/V, pH 8.3) y electrotransferidos a membranas de difluoruro de polivinilideno (PVDF) a 100 V por 1 hora usando una celda Mini Trans-Blot (Bio-Rad, Hercules, CA, EE.UU.). Para la detección de cada proteína en particular, las membranas fueron incubadas por 1 hora a temperatura ambiente con solución de bloqueo: TBS (Tris 20 mM, NaCl 140 mM, pH 7.4), Tween-20 0.1% P/V, leche en polvo descremada 5% P/V. Luego del bloqueo se realizaron 3 lavados por 5 minutos con TBS que contenía Tween-20 0.1% P/V (TBS-T). Las membranas fueron incubadas en agitación durante toda la noche a 4°C con el primer anticuerpo en una dilución 1/2000 para mTOR y 1/1000 para p70S6K en solución TBS-T

conteniendo BSA 5% P/V. Se utilizaron anticuerpos comerciales de Cell Signaling Technology para la detección de mTOR fosforilado (P-mTOR), mTOR total (mTOR), p70S6K fosforilada (P-p70S6K) y p70S6K total (p70S6K), los cuales se detallan a continuación: Phospho-mTOR (Ser2448) (D9C2) Antibody #5536; mTOR Antibody (7C10) #3662; Phospho-p70 S6 Kinase (Thr389) (108D2) Antibody #9234; p70S6 Kinase Antibody #9202.

Luego de la incubación, las membranas fueron lavadas 3 veces por 5 minutos con TBS-T. Las membranas se incubaron 1 hora a temperatura ambiente con el segundo anticuerpo anti-Inmunoglobulina de conejo conjugado con peroxidasa (#7074, Cell Signaling Technology) en una dilución 1/3000 en TBS-T conteniendo leche descremada 5% P/V. Finalizada la incubación, se realizaron 3 lavados por 5 minutos con TBS-T. Finalmente, las membranas se revelaron por quimioluminiscencia incubando las membranas por 1 minuto en una solución que contiene Tris-HCl 0.1M pH 8.8, ácido cumárico (Sigma-Aldrich, C9008) 450 μ M, luminol (Sigma-Aldrich, A8511) 1.25 mM y H₂O₂ 0.15 volúmenes. Las imágenes autorradiográficas se obtuvieron utilizando el equipo C-DiGit[®] Blot Scanner (P/N 3600, Li-Cor INC, Lincoln, NE, EE. UU.). La intensidad de las bandas autorradiográficas fue estimada por densitometría utilizando el programa NIH Image (Scion Corporation, Frederick, MD, EE. UU.). Los niveles de mTOR total y p70S6K total fueron utilizados como control de carga proteica en las distintas calles. Los resultados fueron expresados como veces de variación respecto del Basal o de la condición de incubación sin L-gln (0 mM L-gln) de la relación P-mTOR/mTOR o P-p70S6K/p70S6K.

Determinación de los niveles de lactato

La cuantificación de lactato fue evaluada en el medio condicionado proveniente de cultivos de células de Sertoli inmaduras cultivadas en placas de 24 pozos. La determinación fue realizada utilizando un kit comercial (Sigma-Aldrich) cuya técnica se basa en la oxidación de lactato a piruvato por la enzima lactato deshidrogenasa usando β -

NAD⁺ como coenzima. Brevemente, 200 µl de medio de cultivo fueron desproteinizados mediante el agregado de 400 µl de ácido perclórico 8% P/V por 5 minutos en baño de hielo y centrifugados a 1600xg por 10 minutos a 4°C. Una alícuota (55 µl) del sobrenadante recuperado fue depositada sobre 280 µl de solución de reacción compuesta por 2.8 mM de β-NAD⁺ y 20 UI/ml de LDH en solución reguladora de glicina e hidracina (pH 9.2). Las muestras fueron incubadas por 15 minutos a 37°C en baño con agitación. Al finalizar la incubación, el NADH producido, que es igual a la cantidad de lactato presente en la muestra, fue evaluado por espectrofotometría determinando la absorbancia a 340 nm. Asimismo, se determinó el contenido de ADN por pozo. Los resultados fueron expresados como µg de lactato/µg ADN.

Determinación de ADN

El contenido de ADN fue determinado según 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 intercala entre las bases de las moléculas de ADN. Los resultados obtenidos se compararon contra una curva estándar de ADN de timo de ternera.

Transfección y ensayo de gen reportero luciferasa/actividad β-galactosidasa

Las células se sembraron en una placa de 24 pozos, y 48 horas más tarde se cotransfectaron con los plásmidos pGL3-E-box (Kieśliling y col., 2006) /pMIR-REPORT™ Betagalactosidase Reporter Control Vector (Applied Biosystems, Warrington, Reino Unido) o PGL3-Basic (Promega Corporation, Madison, EE.UU.) /pMIR-REPORT™ Betagalactosidase Reporter Control Vector utilizando Lipofectamina LTX con Plus Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las células se incubaron durante 24 horas en presencia del complejo Lipofectamina-plásmidos. Finalizada la

incubación, se reemplazó el medio (con o sin L-gln), y se efectuaron los estímulos correspondientes en conjunto con el agregado de inhibidores. Luego de 24 horas, las células fueron lisadas por agregado de 40 μ l de la solución comercial Cell Culture Lysis 5X Reagent (CLR, Promega) diluída 1/5 en agitación durante 30 minutos a temperatura ambiente. La actividad luciferasa fue determinada por medición de la luz emitida en un luminómetro (Junior LB9509, Berthold Technologies, Bad Wildbad, Alemania) incubando 9 μ l del lisado celular con 45 μ l del reactivo comercial Luciferase Assay Reagent II (Promega). Por otro lado, para la determinación de la actividad β -galactosidasa, la técnica se basa en la reacción de hidrólisis del orto-nitrofenil- β -D-galactopiranosido (ONPG), un análogo incoloro de la lactosa, por acción de la enzima β -galactosidasa para generar un producto final de color amarillo, el o-nitrofenol. Para ello, 20 μ l del lisado celular fueron incubados durante 2 horas en estufa a 37°C con 60 μ l de mezcla de reacción (Na_2HPO_4 15 mM, NaH_2PO_4 10 mM, KCl 2.5 mM, MgSO_4 0.25 mM, 2 β -mercaptoetanol 12.5 μ M y ONPG 3.3 mM). Finalizado el tiempo de incubación, se detuvo la reacción por agregado de 44 μ l de Na_2CO_3 3M. Al finalizar, el o-nitrofenol producido, proporcional a la actividad enzimática, fue evaluado por espectrofotometría determinando la absorbancia a 420 nm. Los resultados se expresaron como la relación de la actividad luciferasa Firefly/actividad β -galactosidasa en unidades arbitrarias.

Ensayo de incorporación de BrdU

Las células de Sertoli cultivadas en portaobjetos de ocho cámaras (Permanox) se incubaron con BrdU 10 μ M durante las últimas 24 horas de cultivo. Posteriormente, las células se lavaron con PBS y se fijaron con metanol: ácido acético (3:1) durante 30 minutos para realizar la inmunocitoquímica. El ADN se desnaturalizó mediante el tratamiento con etanol al 70% V/V y NaOH 0.2 M durante 3 minutos, seguido de etanol al 70% V/V y etanol absoluto frío por 1 minuto cada uno. Luego, la peroxidasa endógena y los sitios

inespecíficos fueron bloqueados mediante la incubación por 30 minutos con H₂O₂ al 3% y con una dilución de suero de caballo 1/50 en PBS, respectivamente. Finalmente, las células fijadas se incubaron con anticuerpo anti-BrdU (dilución 1/200, ab136650, Bu20a, Abcam; Cambridge, Reino Unido) en cámara húmeda a 4°C durante la noche y fueron reveladas de acuerdo con el protocolo recomendado por el fabricante para el sistema estreptavidina biotina/peroxidasa de rábano picante (Vectastain Kit Élite ABC HRP; Vector Labs, Burlingame, CA, EE. UU.) utilizando 3,3'-diaminobencidina como cromógeno. Los núcleos se contrastaron con hematoxilina y las imágenes fueron obtenidas utilizando un microscopio Nikon Eclipse 50i acoplado a una cámara Nikon DS-Fi1 (Japón). Se contaron alrededor de 5000 células utilizando el software Image J (National Institutes of Health, EE. UU.). El porcentaje de células de Sertoli BrdU positivas se calculó como (células positivas para BrdU/células de Sertoli totales) × 100.

Determinación de Ki-67 mediante inmunofluorescencia

Las células fueron sembradas sobre cubreobjetos preincubados por 2 horas con bromhidrato de poli-L-lisina 50 µg/µl (P1524, Sigma-Aldrich). Posteriormente, las células fueron lavadas con PBS y fijadas utilizando metanol durante 10 minutos a temperatura ambiente. Luego de 3 lavados con PBS, se permeabilizaron las membranas celulares durante 10 minutos en cámara húmeda utilizando una solución de PBS-0.25% V/V Tritón X100. Luego de un lavado con PBS, se bloquearon los sitios inespecíficos utilizando una solución de bloqueo de 1% P/V BSA en PBS-0.25% V/V Tritón X100 durante 30 minutos. La incubación con el anticuerpo primario anti-Ki-67 (dilución 1/200; ab15580, Abcam, Cambridge, Reino Unido) se realizó en cámara húmeda a 4°C durante toda la noche. El anticuerpo primario unido se reconoció mediante un segundo anticuerpo acoplado al fluorocromo Alexa Fluor 488 (#A21206; Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.). Las células se incubaron durante 1 hora con una solución de 1% P/V BSA en PBS conteniendo tanto el

anticuerpo secundario (dilución 1/250) como Hoechst para marcar los núcleos. Se utilizó VECTASHIELD® Antifade Mounting Medium (H-1000-10, Vector Laboratories, Newark, CA, EE. UU.) como medio de montaje y se observaron células en un microscopio de fluorescencia Zeiss Axio Imager 2 Upright Microscope (Göttingen, Alemania). Se realizó el recuento de 2000 células utilizando el software Image J y el porcentaje de células de Sertoli Ki-67 positivas se calculó como (células positivas para Ki-67/células de Sertoli totales) × 100.

Análisis estadístico

Para cada variable se realizó en primera instancia un análisis de homogeneidad de varianzas (Test de Levene) y de distribución normal (Test de Shapiro-Wilk). Luego, se realizó el análisis estadístico de los datos utilizando análisis de varianza de una vía (ANOVA), seguido de un test de Tukey-Kramer para la comparación de múltiples grupos. Probabilidades <0.05 fueron consideradas estadísticamente significativas. Para el análisis, se utilizó el programa estadístico GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, La Jolla, CA, EE. UU.)

DISEÑO EXPERIMENTAL

Para los estudios realizados en este trabajo de tesis se utilizó como modelo experimental cultivos de células de Sertoli aisladas de ratas Sprague-Dawley de 8 días de edad, las cuales son inmaduras y tienen capacidad proliferativa.

Diseño para el estudio de la participación de la glucólisis en la regulación de la proliferación por FSH en la célula de Sertoli.

Estudio de la regulación de la expresión de genes involucrados en la vía glucolítica

Las células de Sertoli aisladas de ratas de 8 días de edad fueron sembradas en placas de cultivo de 6 pozos (día 1). En el día 3 de cultivo se cambió el medio y en el día 4 las células fueron mantenidas en condiciones basales o estimuladas con FSH en las concentraciones indicadas en los pies de figura por distintos tiempos (2, 4 o 6 horas). Finalizado el periodo de incubación, se extrajo el ARN total de las células. Para la determinación de los niveles de ARNm por RT-qPCR de PFKFB1, PFKFB2, PFKFB3, PKM2, LDHA y LDHB se realizó la síntesis de ADNc y luego el ensayo de RT-qPCR específico para cada gen. Para aquellos genes cuya expresión resultó incrementada por la hormona, se evaluó la participación de la señal de transducción mTORC1 y la glucólisis de la siguiente forma: en el día 3 de cultivo se realizó el cambio de medio y las células fueron mantenidas en condiciones basales o en presencia de Rap, 3PO u OXA en las concentraciones indicadas en los pies de figura. En el día 4, las células fueron estimuladas con FSH en ausencia o presencia de Rap, 3PO y OXA por 4 horas (tiempo de incubación en el que se observa el máximo estímulo hormonal sobre la expresión génica). Finalizado el periodo de incubación, se extrajo el ARN total de las células. Para la determinación de los niveles de ARNm por RT-qPCR de PFKFB3 y LDHA se realizó la síntesis de ADNc y luego el ensayo de RT-qPCR específico para cada gen.

Evaluación de los niveles de lactato como metabolito marcador del flujo glucolítico

Las células de Sertoli aisladas de ratas de 8 días de edad fueron sembradas en placas de cultivo de 24 pozos (día 1). En el día 3 de cultivo se cambió el medio y las células fueron mantenidas en condiciones basales o estimuladas con FSH en ausencia o presencia de Rap, 3PO u OXA por 24 horas en las concentraciones indicadas en los pies de figura. Finalizado el periodo de incubación, se recogió el medio de cultivo condicionado para la medición de lactato. Por otro lado, las células adheridas fueron lisadas por ultrasonido para la determinación de ADN.

Estudio de los niveles de mTOR y de p70S6K fosforiladas

Las células de Sertoli aisladas de ratas de 8 días de edad fueron sembradas en placas de cultivo de 6 pozos (día 1). En el día 3 de cultivo se cambió el medio y las células fueron mantenidas en condiciones basales o en presencia de Rap, 3PO u OXA en las concentraciones indicadas en los pies de figura. En el día 4, las células fueron estimuladas con FSH en ausencia o presencia de Rap, 3PO y OXA por 1 hora. Para el estudio del efecto del lactato sobre la vía mTORC1, en el día 3 de cultivo se realizó el cambio de medio y en el día 4 las células fueron mantenidas en condiciones basales o en presencia de lactato por 0.5, 1 o 2 horas en la concentración indicada en los pies de figura. Una vez finalizadas todas las incubaciones, las células fueron lisadas por agregado de una solución reguladora hipotónica y se determinaron los niveles de P-mTOR, mTOR, P-p70S6K y p70S6K por Western Blot para cada caso.

Estudio de la regulación de la expresión de c-Myc y ciclinas

Las células de Sertoli aisladas de ratas de 8 días de edad fueron sembradas en placas de cultivo de 6 pozos (día 1). En el día 3 de cultivo se cambió el medio y las células fueron mantenidas en condiciones basales o en presencia de Rap, 3PO u OXA en las

concentraciones indicadas en los pies de figura. En el día 4, las células fueron estimuladas con FSH en ausencia o presencia de Rap, 3PO y OXA por 2 horas para evaluar los niveles de ARNm de CCND1 o 4 horas para evaluar los niveles de ARNm de c-Myc y CCND2 (dicha elección estuvo basada en estudios previos en los que se observó el máximo estímulo hormonal sobre la expresión para cada gen). Finalizado el periodo de incubación, se extrajo el ARN total de las células y para la determinación de los niveles de ARNm por RT-qPCR de c-Myc y ciclinas CCND1 y CCND2, se realizó la síntesis de ADNc y luego el ensayo de RT-qPCR específico para cada gen. Adicionalmente, para el estudio del efecto del lactato sobre los niveles de expresión de las ciclinas, en el día 3 de cultivo se cambió el medio y en el día 4 las células fueron mantenidas en condiciones basales o en presencia de lactato por 0.5, 1 o 2 horas en la concentración indicada en los pies de figura. Finalizado el periodo de incubación, se extrajo el ARN total de las células y para la determinación de los niveles de ARNm por RT-qPCR de ciclinas CCND1 y CCND2, se realizó la síntesis de ADNc y luego el ensayo de RT-qPCR específico para cada gen.

Estudio de la regulación de la actividad transcripcional de c-Myc

Las células de Sertoli aisladas de ratas de 8 días de edad fueron sembradas en placas de cultivo de 24 pozos (día 1). En el día 3 de cultivo, luego del cambio de medio por medio sin penicilina, anfotericina ni insulina, se transfectaron las células con los plásmidos correspondientes. En el día 4 de cultivo, las células se mantuvieron en condiciones basales o fueron estimuladas con FSH en ausencia o presencia de Rap, 3PO u OXA en las concentraciones indicadas en los pies de figura. En el quinto día de cultivo se procesaron las muestras y se determinó la actividad transcripcional de c-Myc a partir del ensayo de gen reportero luciferasa y la actividad β -galactosidasa.

Estudio de la regulación de la proliferación celular

Para evaluar la proliferación, las células de Sertoli aisladas de ratas de 8 días de edad fueron sembradas sobre cubreobjetos preincubados por 2 horas con bromhidrato de poli-L-lisina 50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ o en portaobjetos multicámara de ocho pozos (Permanox) (día 1). En el día 3 de cultivo se cambió el medio y las células fueron mantenidas en condiciones basales o estimuladas con FSH en ausencia o presencia de Rap, 3PO u OXA por 24 horas en las concentraciones indicadas en los pies de figura. Para evaluar el efecto del lactato sobre la proliferación celular, en el día 3 de cultivo se cambió el medio y las células fueron mantenidas en condiciones basales o en presencia de lactato por 24 horas en la concentración indicada en los pies de figura. En ambos casos, luego del periodo de incubación, se determinó la presencia del antígeno Ki-67 por inmunofluorescencia. Asimismo, para evaluar la incorporación de BrdU, las células fueron incubadas en presencia de este análogo de la timidina en concentración 10 μM durante las últimas 24 horas, y se determinó la incorporación del mismo mediante inmunocitoquímica.

Diseño para el estudio de la participación de la glutaminólisis en la regulación de la proliferación por FSH en la célula de Sertoli

Caracterización de la expresión de genes que codifican para proteínas claves del metabolismo de la glutamina

Las células de Sertoli aisladas de ratas de 8 días de edad fueron sembradas en placas de cultivo de 6 pozos (día 1). En el día 3 de cultivo se cambió el medio y las células fueron mantenidas en condiciones basales durante 24 horas. En el día 4 de cultivo, se extrajo el ARN total de las células en conjunto con el ARN total de tejidos utilizados como controles positivos de expresión (hígado, riñón e intestino delgado de rata). Para la caracterización de la expresión de genes que codifican para proteínas clave del metabolismo de la glutamina se realizó la síntesis de ADNc y se analizó la expresión de SLC38A5, SLC1A5, GS, GLS1 y GLS2 por RT-PCR.

Estudio de la regulación de la expresión de genes involucrados en la glutaminólisis por FSH

Las células de Sertoli aisladas de ratas de 8 días de edad fueron sembradas en placas de cultivo de 6 pozos (día 1). En el día 3 de cultivo se realizó el cambio de medio y en el día 4 las células fueron mantenidas en condiciones basales o estimuladas con FSH por distintos períodos de tiempo (2, 4 o 6 horas) en la concentración que se indica en los pies de figura. Finalizado el periodo de incubación, se extrajo el ARN total de las células. Para la determinación de los niveles de ARNm por RT-qPCR de SLC38A5, SLC1A5, GS, GLS1 y GLS2 se realizó la síntesis de ADNc y luego el ensayo de RT-qPCR específico para cada gen.

Estudio la regulación de los niveles de mTOR y de p70S6K fosforiladas

Las células de Sertoli aisladas de ratas de 8 días de edad fueron sembradas en placas de cultivo de 6 pozos (día 1). En el día 3 de cultivo se cambió el medio y en el día 4 las células fueron mantenidas en condiciones basales o preincubadas por 2 horas con GPNA o DON en las concentraciones indicadas en los pies de figura. Posteriormente, las células fueron estimuladas con FSH por 1 hora en ausencia o presencia de GPNA o DON. Para los estudios realizados en medio de cultivo sin L-gln, en el día 3 de cultivo se cambió el medio y en el día 4 las células fueron privadas de L-gln mediante incubación en medios de cultivo sin L-gln durante 2 horas. Posteriormente, las células fueron mantenidas en ausencia de L-gln o suplementadas con L-gln en ausencia o presencia de FSH durante 1 hora en las concentraciones detalladas en los pies de figura. Para el estudio del efecto del α -KG sobre la señal de transducción mTORC1, en el día 3 de cultivo se realizó el cambio de medio y en el día 4 las células fueron mantenidas en condiciones basales o en presencia de α -KG por 0.5, 1 o 2 horas en la concentración que se detalla en los pies de figura. Una vez finalizadas todas las incubaciones, las células fueron lisadas por agregado de una solución reguladora hipotónica y se determinaron los niveles de P-mTOR, mTOR, P-p70S6K y p70S6K por Western Blot para cada caso.

Estudio de la regulación de la expresión de c-Myc y ciclinas

Las células de Sertoli aisladas de ratas de 8 días de edad fueron sembradas en placas de cultivo de 6 pozos (día 1). En el día 3 de cultivo se cambió el medio y en el día 4 las células fueron mantenidas en condiciones basales o preincubadas durante 2 horas en presencia de GPNA o DON en las concentraciones indicadas en los pies de figura. Posteriormente, las células fueron estimuladas con FSH en ausencia o presencia de GPNA o DON por 2 horas para evaluar los niveles de ARNm de CCND1 o 4 horas para evaluar los niveles de ARNm de c-Myc y CCND2 (dicha elección estuvo basada en estudios previos en

los que se observó el máximo estímulo hormonal sobre la expresión para cada gen). Para los estudios realizados en medio de cultivo sin L-gln, en el día 3 de cultivo se cambió el medio y en el día 4 las células fueron privadas de L-gln mediante incubación en medios de cultivo sin L-gln durante 2 horas. Posteriormente, las células fueron mantenidas en ausencia de L-gln o suplementadas con L-gln en ausencia o presencia de FSH durante 2 o 4 horas en las concentraciones detalladas en los pies de figura. Una vez finalizadas todas las incubaciones, se extrajo el ARN total de las células y para la determinación de los niveles de ARNm por RT-qPCR de c-Myc y ciclinas CCND1 y CCND2, se realizó la síntesis de ADNc y luego el ensayo de RT-qPCR específico para cada gen.

Estudio de la regulación de la actividad transcripcional de c-Myc

Las células de Sertoli aisladas de ratas de 8 días de edad fueron sembradas en placas de cultivo de 24 pozos (día 1). En el día 3 de cultivo, luego del cambio de medio por medio sin penicilina, anfotericina ni insulina, se transfectaron las células con los plásmidos correspondientes. En el día 4 de cultivo, las células fueron mantenidas en condiciones basales o preincubadas durante 2 horas en presencia de GPNA o DON en las concentraciones indicadas en los pies de figura. Posteriormente, las células fueron estimuladas con FSH en ausencia o presencia de GPNA o DON por 24 horas. Para los estudios realizados en medio de cultivo sin L-gln, en el día 3 de cultivo se cambió el medio y en el día 4 las células fueron privadas de L-gln mediante incubación en medios de cultivo sin L-gln durante 2 horas. Posteriormente, las células fueron mantenidas en ausencia de L-gln o suplementadas con L-gln en ausencia o presencia de FSH durante 24 horas en las concentraciones detalladas en los pies de figura. Finalizada la incubación, se lisaron las células para realizar la determinación de la actividad transcripcional de c-Myc a partir del ensayo de gen reportero luciferasa y de la actividad β -galactosidasa.

Estudio de la regulación de la proliferación celular

Para evaluar la proliferación, las células de Sertoli aisladas de ratas de 8 días de edad fueron sembradas sobre cubreobjetos preincubados por 2 horas con bromhidrato de poli-L-lisina 50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ o en portaobjetos multicámara de ocho pozos (Permanox) (día 1). En el día 3 de cultivo, se cambió el medio y las células fueron mantenidas en condiciones basales o preincubadas durante 2 horas en presencia de GPNA o DON en las concentraciones indicadas en los pies de figura. Posteriormente, las células fueron estimuladas con FSH en ausencia o presencia de GPNA o DON por 24 horas. Para los estudios realizados en medio de cultivo sin L-gln, en el día 3 de cultivo se cambió el medio y las células fueron privadas de L-gln mediante incubación en medios de cultivo sin L-gln durante 2 horas. Posteriormente, las células fueron mantenidas en ausencia de L-gln o suplementadas con L-gln en ausencia o presencia de FSH durante 24 horas en las concentraciones detalladas en los pies de figura. Para el estudio del efecto del α -KG sobre la proliferación celular, en el día 3 de cultivo se realizó el cambio de medio y las células fueron mantenidas en condiciones basales o en presencia de α -KG por 24 horas en las concentraciones que se detallan en los pies de figura. Una vez finalizadas las incubaciones, se determinó la presencia del antígeno Ki-67 por inmunofluorescencia. Asimismo, para evaluar la incorporación de BrdU, las células fueron incubadas en presencia de este análogo de la timidina en concentración 10 μM durante las últimas 24 horas, y se determinó la incorporación del mismo mediante inmunocitoquímica.

RESULTADOS

1) PARTICIPACIÓN DE LA GLUCÓLISIS EN LA REGULACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN DE LA CÉLULA DE SERTOLI POR FSH

Como fue mencionado en la introducción, la proliferación de la célula de Sertoli solamente ocurre durante un periodo de tiempo acotado y es fundamental para determinar la población de células de Sertoli que estará presente en la vida adulta, la cual está estrechamente relacionada con la capacidad espermatogénica que tendrá el individuo.

Por otro lado, la disponibilidad de nutrientes es esencial para que una célula se comprometa a la división celular. En condiciones óptimas, la célula es capaz de afrontar la alta demanda metabólica que implica la proliferación, ya que adapta su metabolismo de forma tal de poder aumentar su biomasa con el objeto de que las dos células hijas resultantes posean un tamaño similar a la célula madre original. Entre los cambios metabólicos asociados a la progresión del ciclo celular se destaca la glucólisis aeróbica, también conocida como efecto Warburg, que se caracteriza por la conversión de glucosa a lactato incluso en presencia de una adecuada disponibilidad de oxígeno. Por lo tanto, se ha postulado que existe una correlación muy estrecha entre el flujo glucolítico y la proliferación que, hasta el momento de este trabajo de tesis, no había sido evaluada en la célula de Sertoli.

El primer objetivo, entonces, fue evaluar la participación de la glucólisis en la regulación de la proliferación de la célula de Sertoli por FSH.

REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE GENES QUE CODIFICAN PARA ENZIMAS GLUCOLÍTICAS CLAVE POR FSH EN LA CÉLULA DE SERTOLI INMADURA

Considerando que la hormona FSH es el principal mitógeno de las células de Sertoli, y dado que la glucólisis sería importante para sostener las demandas metabólicas de la proliferación, se evaluó si dicha hormona podía regular la vía glucolítica. Si bien nuestro laboratorio había demostrado previamente que la FSH es capaz de aumentar la

entrada de glucosa y los niveles de lactato en células de Sertoli inmaduras, hasta el momento de este trabajo no se habían analizado los posibles mecanismos moleculares involucrados en este fenómeno. Con el fin de evaluar si la regulación de la glucólisis por la FSH podría explicarse por la modulación de la expresión de enzimas glucolíticas clave de esta vía, se realizaron cultivos primarios de células de Sertoli provenientes de animales de 8 días de edad —momento en el cual las células son inmaduras y, por ende, conservan la capacidad de proliferar—. Dichos cultivos fueron mantenidos en condiciones basales o estimulados con FSH por distintos períodos de tiempo. Finalizadas las incubaciones, se determinaron los niveles de expresión de las isoformas de fosfofructoquinasa-2/fructosa-2,6-bisfosfatasa (PFKFB), la isoforma M2 de la piruvato quinasa (PKM2) y las subunidades de lactato deshidrogenasa (LDH).

La figura 1 muestra los resultados obtenidos para la evaluación de la expresión génica de las distintas isoformas de la enzima bifuncional PFKFB, que cataliza tanto la síntesis como la degradación del principal efector alostérico positivo de la enzima fosfofructoquinasa-1 (PFK-1), la fructosa-2,6-bisfosfato (Fru-2,6-bisP). Se observa que el estímulo con FSH no modificó los niveles de ARNm de la isoforma 1 de esta enzima (panel A), reguló negativamente los niveles de ARNm de la isoforma 2 (panel B) e incrementó significativamente los niveles de ARNm de la isoforma 3 luego de 2, 4 y 6 horas de tratamiento (panel C). Dado que la isoforma 3 de la enzima bifuncional no posee actividad bisfosfatasa y que sus niveles de expresión correlacionan con las concentraciones intracelulares de Fru-2,6-bisP, se puede especular que el aumento de la expresión de la PFKFB3 podría ser uno de los mecanismos intervinientes en el incremento del flujo glucolítico comandado por FSH en células de Sertoli inmaduras.

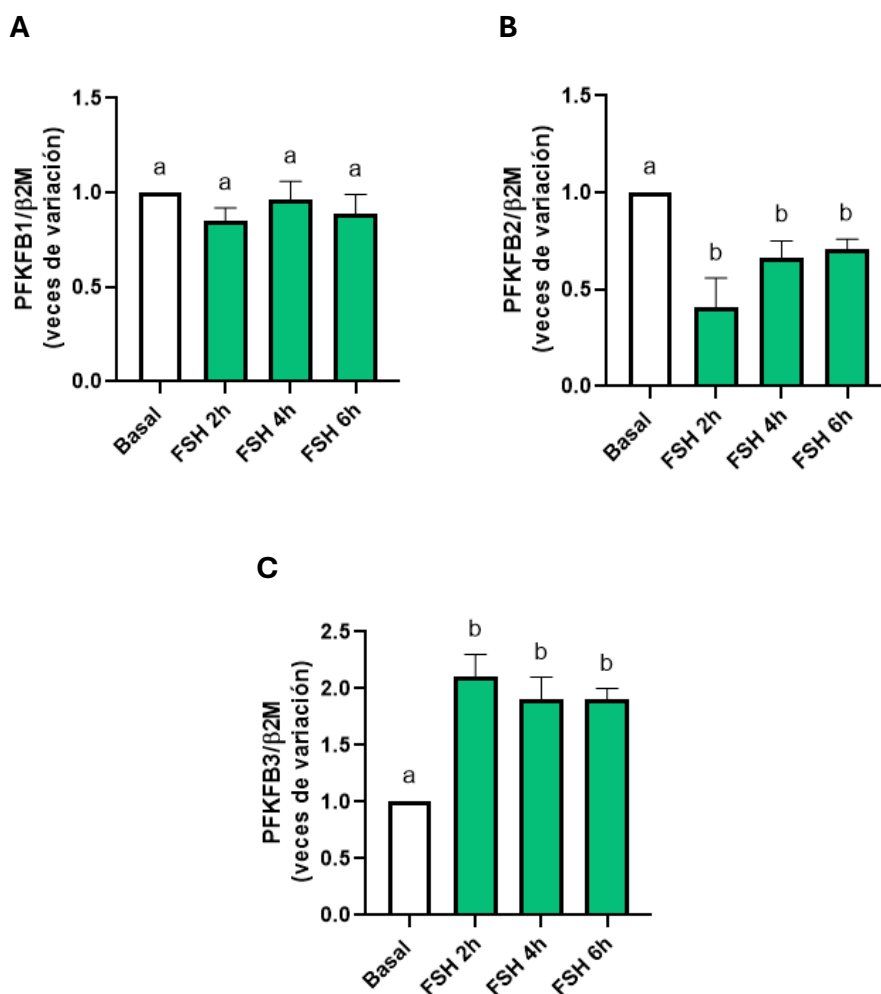


Figura 1. Regulación de los niveles de ARNm de las isoformas de PFKFB por FSH en células de Sertoli inmaduras.

Cultivos de células de Sertoli aisladas de testículos de rata de 8 días de edad fueron mantenidos en condiciones basales (Basal) o estimulados con FSH 100 ng/ml durante 2, 4 o 6 horas. Finalizado el período de incubación, se extrajo el ARN total y se determinaron los niveles de ARNm de PFKFB1 (**panel A**), PFKFB2 (**panel B**) y PFKFB3 (**panel C**) mediante la técnica de RT-qPCR. Los resultados se expresan como veces de variación respecto al valor Basal de la relación ARNm de interés/ARNm de referencia (β2-Microglobulina -β2M-) obtenidos de tres experimentos independientes ($X \pm DE$, letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas, $p < 0.05$).

Otra de las enzimas marcapasos del flujo glucolítico es la piruvato quinasa (PK), enzima encargada de catalizar la conversión de fosfoenolpiruvato a piruvato. En las células de Sertoli, la actividad PK es solamente atribuida a la isoforma muscular 2. Por lo tanto, bajo las mismas condiciones experimentales anteriormente descritas, se evaluaron también los niveles de expresión de la isoforma M2 de la enzima PK. En la figura 2 se puede observar que FSH no modificó los niveles de ARNm para esta enzima.

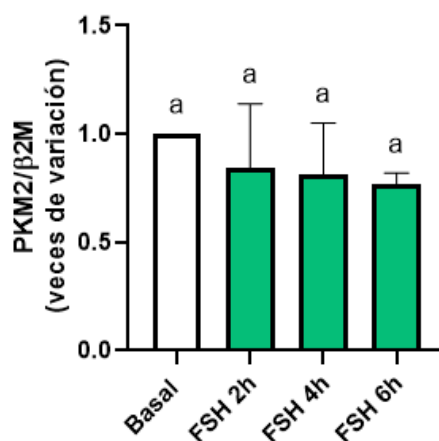


Figura 2. Regulación de los niveles de ARNm de PKM2 por FSH en células de Sertoli inmaduras. Cultivos de células de Sertoli aisladas de testículos de rata de 8 días de edad fueron mantenidos en condiciones basales (Basal) o estimulados con FSH 100 ng/ml durante 2, 4 o 6 horas. Finalizado el período de incubación, se extrajo el ARN total y se determinaron los niveles de ARNm de PKM2 mediante la técnica de RT-qPCR. Los resultados se expresan como veces de variación respecto al valor Basal de la relación ARNm de interés/ARNm de referencia (β 2-Microglobulina - β 2M-) obtenidos de tres experimentos independientes ($X \pm DE$, letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas, $p < 0.05$).

Respecto a la enzima lactato deshidrogenasa (LDH), si bien no es una enzima regulatoria de la glucólisis *per se*, es reconocido que su acción está ligada al sostenimiento de un flujo glucolítico continuo a través del mantenimiento de los niveles de NAD^+ , producto de la reducción del piruvato a lactato. Como se mencionó en la introducción, existen distintas isoenzimas LDH formadas por la combinación de dos subunidades distintas, las cuales son producto de la expresión de los genes *ldha* y *ldhb*. Dependiendo de las combinaciones de las distintas subunidades, se determinan distintas isoenzimas tetraméricas con diferentes propiedades cinéticas. Teniendo esto en mente, se evaluaron los niveles de ARNm de LDHA y LDHB en las células de Sertoli inmaduras en cultivo incubadas por distintos tiempos en condiciones basales o en presencia de FSH. En la figura 3 se observa que la hormona reguló positivamente los niveles de ARNm de LDHA luego de 2, 4 y 6 horas de tratamiento (panel A), mientras que no modificó los niveles de ARNm de LDHB (panel B). Este resultado, entonces, se encuentra en concordancia con el aumento del flujo glucolítico promovido por FSH, ya que un incremento en los niveles de expresión

de LDHA propicia el ensamblaje de tetrámeros LDH cuyas propiedades cinéticas favorecen la conversión de piruvato a lactato.

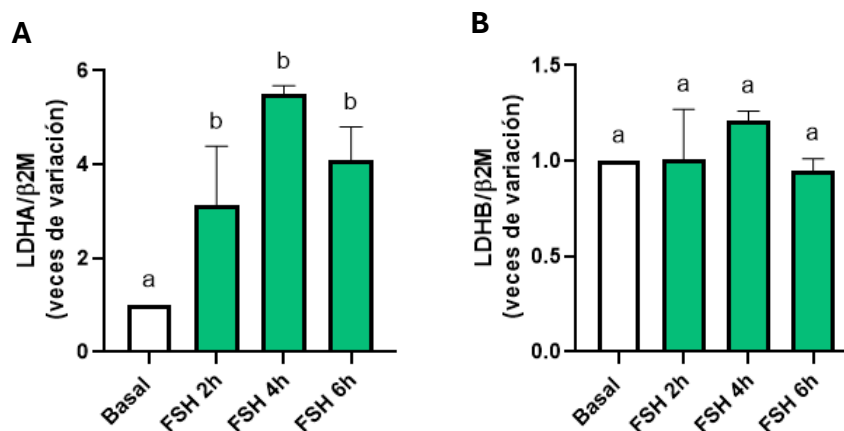


Figura 3. Regulación de los niveles de ARNm de las subunidades de LDH por FSH en células de Sertoli inmaduras.

Cultivos de células de Sertoli aisladas de testículos de rata de 8 días de edad fueron mantenidos en condiciones basales (Basal) o estimulados con FSH 100 ng/ml durante 2, 4 o 6 horas. Finalizado el período de incubación, se extrajo el ARN total y se determinaron los niveles de ARNm de LDHA (**panel A**) y LDHB (**panel B**) mediante la técnica de RT-qPCR. Los resultados se expresan como veces de variación respecto al valor Basal de la relación ARNm de interés/ARNm de referencia (β 2-Microglobulina - β 2M-) obtenidos de tres experimentos independientes ($X \pm DE$, letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas, $p < 0.05$).

En su conjunto, estos resultados indican que la FSH promueve un aumento del flujo glucolítico en células de Sertoli inmaduras, posiblemente a través de la inducción de genes que codifican para las enzimas clave de la glucólisis aeróbica: PFKFB3 y LDHA.

Evaluación de la participación de mTORC1 en la regulación de la glucólisis por FSH en células de Sertoli inmaduras

Como siguiente paso, nos propusimos evaluar las señales de transducción evocadas por la FSH que podrían participar en la regulación de la glucólisis aeróbica que, hasta el momento de realizar este trabajo de tesis, aún no habían sido esclarecidas. Sabiendo que la vía de transducción de señales mTORC1 es fundamental para el control metabólico en células que proliferan, y que la misma es una vía utilizada por la FSH para activar el ciclo celular en células de Sertoli, se analizó si la hormona podría utilizar esta

misma vía de señalización para modular la glucólisis. Como herramienta se utilizó un inhibidor farmacológico de mTORC1, rapamicina (Rap). En primer lugar, se evaluó el efecto del inhibidor sobre la viabilidad celular mediante el método de exclusión del colorante azul tripán. La rapamicina en concentración 1 nM no modificó la viabilidad de las células de Sertoli inmaduras en incubaciones de 24 horas (Basal: $95.3 \pm 2.0\%$, Rap 1 nM: $94.2 \pm 0.8\%$ de células viables, expresado como media \pm DE, $n=3$, ns vs Basal). Por lo tanto, la concentración de 1 nM fue la elegida para llevar a cabo el resto de los experimentos. Posteriormente, se evaluó por Western Blot la efectividad de Rap, para lo cual se determinaron los niveles de fosforilación de mTOR (P-mTOR) y de su sustrato p70S6K (P-p70S6K) en cultivos de células de Sertoli inmaduras mantenidas en condiciones basales o estimuladas con FSH en ausencia o en presencia del inhibidor. Se utilizó un anticuerpo que reconoce específicamente a la subunidad mTOR fosforilada en el residuo de serina 2448 (P-mTOR) y un anticuerpo que reconoce específicamente a p70S6K fosforilada en el residuo de treonina 389 (P-p70S6K), sitios que, al estar fosforilados, indican activación de las quinasas.

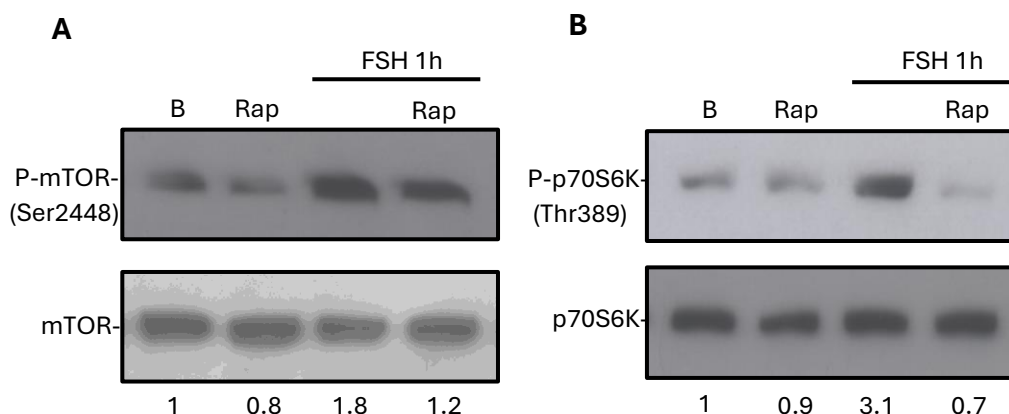


Figura 4. Efecto de la rapamicina sobre los niveles de fosforilación de mTOR y su sustrato, p70S6K, estimulados por FSH en células de Sertoli inmaduras.

Cultivos de células de Sertoli aisladas de testículos de rata de 8 días de edad fueron mantenidos en condiciones basales (B) o estimulados con FSH 100 ng/ml durante 1 hora en ausencia o presencia de Rap 1 nM. Los extractos celulares fueron utilizados para el análisis mediante Western Blot de P-mTOR y mTOR (**panel A**) y P-p70S6K y p70S6K (**panel B**). Los números debajo de cada calle indican las veces de variación con respecto al basal (B) de la relación P-mTOR/mTOR (**panel A**) y P-p70S6K/p-70S6K (**panel B**).

En la figura 4 se observa que Rap inhibió la acción de FSH sobre los niveles de fosforilación de ambas proteínas ensayadas (paneles A y B). De esta manera se comprobó que Rap, a la concentración utilizada, era efectiva para inhibir la activación de mTORC1 en nuestro modelo experimental.

Se continuaron los estudios para evaluar la participación de mTORC1 en la regulación de la glucólisis por FSH en células de Sertoli inmaduras. Para ello, los cultivos fueron mantenidos en condiciones basales o estimulados con FSH en ausencia o presencia de Rap. Una vez finalizadas las incubaciones, se analizaron parámetros indicadores de la actividad de la vía glucolítica: los niveles de lactato y los niveles de expresión de PFKFB3 y LDHA. En la figura 5 se observa que, en células de Sertoli inmaduras, FSH aumentó los niveles de lactato y que el tratamiento con Rap inhibió el efecto de la hormona sobre el mismo.

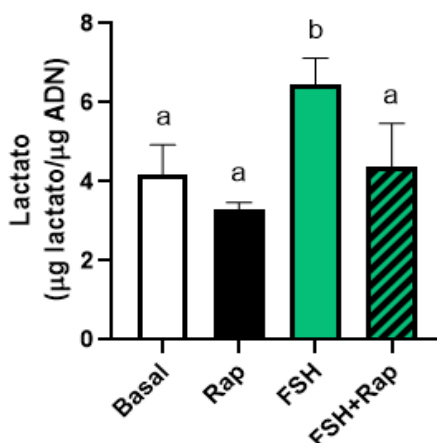


Figura 5. Efecto de Rap sobre los niveles de lactato estimulados por FSH.

Cultivos de células de Sertoli aisladas de testículos de rata de 8 días de edad se mantuvieron en condiciones basales (Basal) o se estimularon con FSH 100 ng/ml durante 24 horas en presencia o ausencia de Rap 1 nM. Finalizado el período de incubación, se determinaron los niveles de lactato en el medio condicionado. Las incubaciones se realizaron por triplicado y los resultados se expresan como $X \pm DE$ de un experimento representativo de tres realizados (letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas, $p < 0.05$).

Respecto de la expresión de genes regulados positivamente por la hormona FSH que codifican enzimas clave de la glucólisis, en la figura 6 se observa que FSH fue incapaz de aumentar los niveles de ARNm de PFKFB3 en presencia de Rap (panel A), y que Rap

también inhibió, al menos en parte, el efecto estimulador de FSH sobre la expresión de LDHA (panel B).

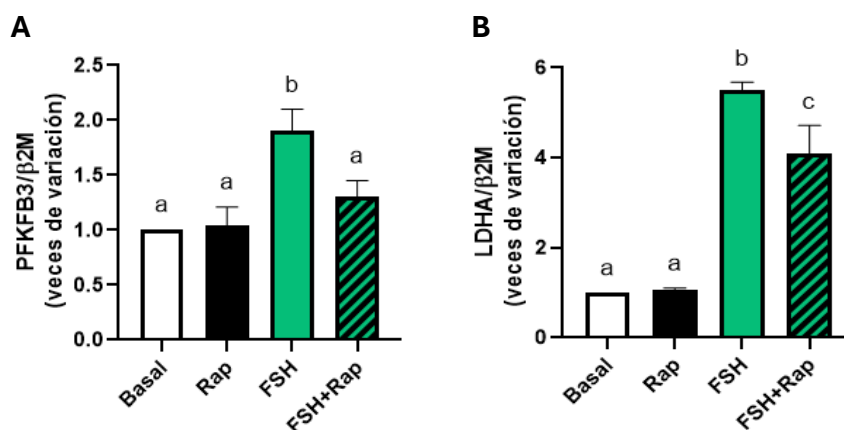


Figura 6. Efecto de Rap sobre los niveles de ARNm de PFKFB3 y LDHA estimulados por FSH.

Cultivos de células de Sertoli aisladas de testículos de rata de 8 días de edad se mantuvieron en condiciones basales (Basal) o se estimularon con FSH 100 ng/ml durante 4 horas en ausencia o presencia de Rap 1 nM. Finalizado el período de incubación, se extrajo el ARN total y se determinaron los niveles de ARNm de PFKFB3 (**panel A**) y LDHA (**panel B**) mediante la técnica de RT-qPCR. Los resultados se expresan como veces de variación respecto al valor Basal de la relación ARNm de interés/ARNm de referencia (β 2-Microglobulina - β 2M-) obtenidos de tres experimentos independientes ($X \pm DE$, letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas, $p < 0.05$).

Estos resultados sugieren que FSH regula la glucólisis y la proliferación (Riera y col., 2012) utilizando la misma señal de transducción, mTORC1.

Evaluación de la participación de mTORC1 en los mecanismos involucrados en la regulación de la proliferación de la célula de Sertoli por FSH

Como fue mencionado en la introducción, se ha descrito que la FSH utiliza diversos mecanismos moleculares que conducen a la progresión del ciclo celular en células de Sertoli inmaduras. Uno de los mecanismos mejor descritos es el incremento de los niveles de ARNm de c-Myc. Es por ello que se continuó este estudio analizando si la FSH es capaz de ejercer su acción regulatoria sobre los niveles de ARNm de c-Myc y su actividad transcripcional a través de la vía mTORC1. Para tal fin, las células de Sertoli inmaduras fueron cultivadas en condiciones basales o estimuladas con FSH en ausencia

o presencia de Rap. La figura 7 muestra que FSH aumentó los niveles de ARNm de c-Myc, y que Rap fue incapaz de inhibir dicho efecto (panel A). Sin embargo, al evaluar la actividad transcripcional de c-Myc por ensayo de gen reportero, se observó que el efecto de la FSH sobre la actividad transcripcional de c-Myc fue inhibido por Rap.

Estos resultados sugieren que la FSH promueve la actividad del factor de transcripción c-Myc a través de la vía mTORC1.

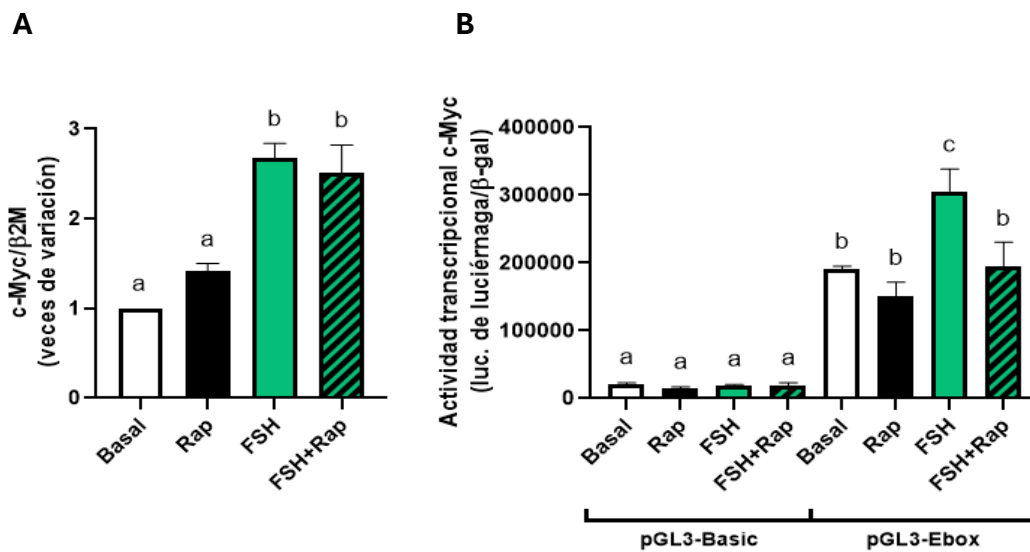


Figura 7. Efecto de Rap sobre los niveles de ARNm y la actividad transcripcional de c-Myc estimulados por FSH.

Cultivos de células de Sertoli fueron mantenidos en condiciones basales (Basal) o estimulados con FSH 100 ng/ml durante 4 horas en ausencia o presencia de Rap 1 nM. Finalizado el período de incubación, se extrajo el ARN total y se determinaron los niveles de ARNm de c-Myc mediante la técnica de RT-qPCR. Los resultados se expresan como veces de variación respecto al valor Basal de la relación ARNm de interés/ARNm de referencia (β 2-Microglobulina - β 2M-) obtenidos de tres experimentos independientes ($X \pm DE$, letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas, $p < 0.05$) (**panel A**). Las células de Sertoli cotransfectadas transitoriamente con el plásmido pGL3-Ebox o pGL3-Basic en combinación con el plásmido comercial pMIR-REPORT™ β -gal Control se mantuvieron en condiciones basales (Basal) o se estimularon con FSH 100 ng/ml durante 24 horas en ausencia o presencia de Rap 1 nM. Las incubaciones se realizaron por triplicado y los resultados se expresan como unidades de luz relativas para la actividad de la luciferasa (luc.) de luciérnaga normalizada a la actividad β -galactosidasa y representan la $X \pm DE$ de un experimento representativo de tres realizados (letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas, $p < 0.05$) (**panel B**).

Considerando que c-Myc regula la expresión de varias ciclinas como mecanismo de acción para promover la progresión del ciclo celular, y que mTORC1 está involucrado en la regulación de la actividad de este factor de transcripción, en el siguiente set de

experimentos se evaluó la participación de mTORC1 en la regulación de la expresión de las ciclinas inducidas por la FSH. Para tal fin, cultivos de células de Sertoli fueron mantenidos en condiciones basales o estimulados con FSH en ausencia o presencia de Rap. En la figura 8 observamos que FSH fue incapaz de inducir los niveles de ARNm de la ciclina (CCN) D1 y CCND2 en presencia de Rap (paneles A y B).

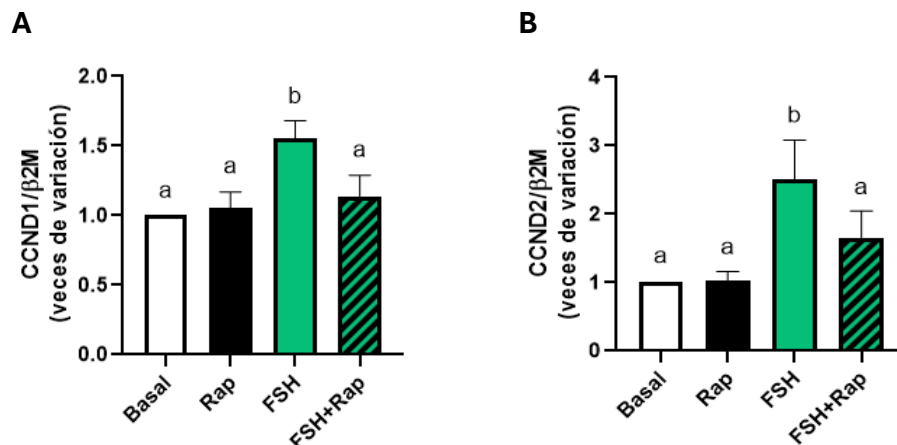


Figura 8. Efecto de Rap sobre los niveles de ARNm de CCND1 y CCND2 estimulados por FSH.

Cultivos de células de Sertoli aisladas de testículos de rata de 8 días de edad se mantuvieron en condiciones basales o se estimularon con FSH 100 ng/ml durante 2 (**panel A**) o 4 (**panel B**) horas en ausencia o presencia de Rap 1 nM. Finalizado el período de incubación, se extrajo el ARN total y se determinaron los niveles de ARNm de CCND1 (**panel A**) y CCND2 (**panel B**) mediante la técnica de RT-qPCR. Los resultados se expresan como veces de variación respecto al valor Basal de la relación ARNm de interés/ARNm de referencia (β 2-Microglobulina - β 2M-) obtenidos de tres experimentos independientes ($X \pm DE$, letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas, $p < 0.05$).

En su conjunto, estos resultados sugieren que la vía mTORC1 podría considerarse como parte de los mecanismos moleculares utilizados por la FSH para modular la progresión del ciclo celular en las células de Sertoli.

EFFECTO DE LA INHIBICIÓN DE LA GLUCÓLISIS SOBRE LA FUNCIONALIDAD DE LA CÉLULA DE SERTOLI INMADURA

En la última década se ha puesto de manifiesto la relevancia del metabolismo glucolítico como modulador de la proliferación al evidenciarse la regulación ejercida por la vía metabólica sobre la actividad de mTORC1 en varios tipos celulares. Para analizar si la

glucólisis presentaba a su vez un papel modulador en las células de Sertoli inmaduras, se utilizaron inhibidores de las enzimas clave de la vía glucolítica como herramienta experimental para evaluar la participación de la vía metabólica en la activación de la señal de transducción mTORC1 y la proliferación celular promovida por FSH. Específicamente se utilizó:

1. Un inhibidor específico de la enzima bifuncional PFKFB3, el 3-(3-piridinil)-1-(4-piridinil)-2-propen-1-ona (3PO). Si bien este inhibidor es altamente específico y selectivo, se ha demostrado que su utilización conduce a un desbalance energético al reducir los niveles de ATP intracelulares
2. Un inhibidor de la enzima LDH, oxamato (OXA). Dado que la enzima LDH cataliza la última reacción de la glucólisis aeróbica, la inhibición de su actividad no genera modificaciones en los niveles de ATP intracelulares.

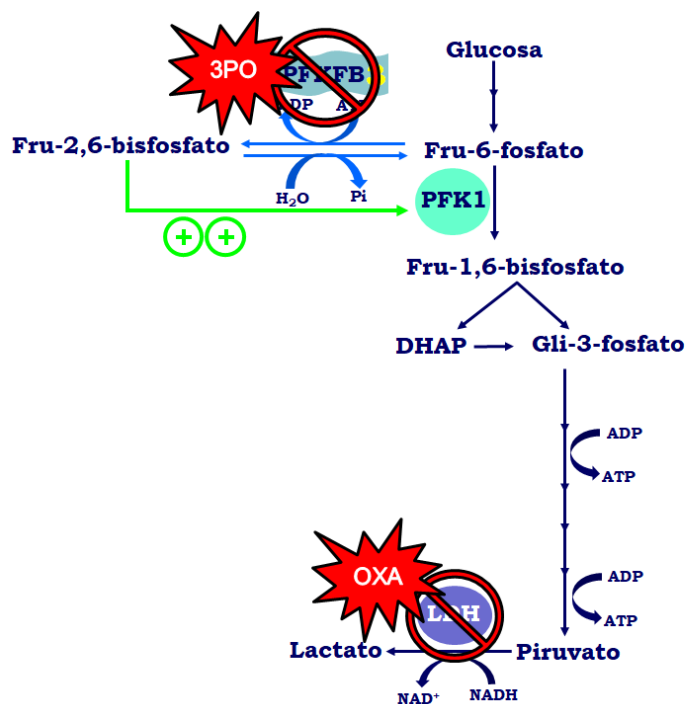


Figura 9. Esquema que ilustra de forma simplificada la vía glucolítica y las enzimas que inhibe cada una de las drogas utilizadas.

En la figura 9 se indican los blancos de acción de ambos inhibidores farmacológicos de la glucólisis empleados.

Las siguientes secciones estarán enfocadas en la descripción de los resultados obtenidos en las incubaciones con cada uno de los inhibidores mencionados.

Efecto de la inhibición de PFKFB3 sobre la activación de la vía mTORC1 por FSH en células de Sertoli inmaduras

En primera instancia, se evaluó la viabilidad de las células de Sertoli en cultivo en presencia de 3PO 30 μ M y se observó que dicho inhibidor no modificó la viabilidad celular en incubaciones de 24 horas (Basal: $94.8 \pm 1.6\%$, 3PO 30 μ M: $93.6 \pm 2.6\%$ de células viables, expresado como media \pm DE, $n=3$, ns vs Basal). Por lo tanto, la concentración de 30 μ M fue la elegida para llevar a cabo el resto de los experimentos. Luego, se prosiguió a evaluar el efecto del 3PO 30 μ M sobre los niveles de lactato como parámetro indicativo del flujo glucolítico, de manera de evaluar la efectividad del inhibidor como herramienta experimental. Como era de esperar, en la figura 10 podemos observar que 3PO impidió el efecto de la FSH sobre los niveles de lactato.

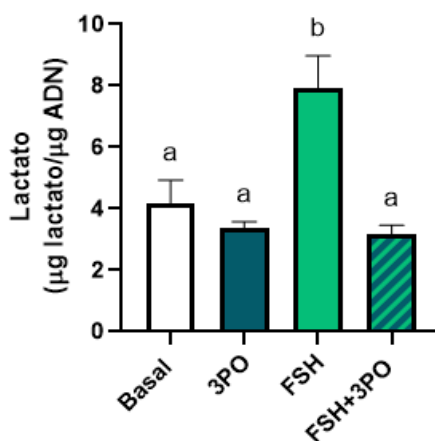


Figura 10. Efecto de 3PO sobre los niveles de lactato estimulados por FSH.

Cultivos de células de Sertoli aisladas de testículos de rata de 8 días de edad se mantuvieron en condiciones basales (Basal) o se estimularon con FSH 100 ng/ml durante 24 horas en presencia o ausencia de 3PO 30 μ M. Finalizado el período de incubación, se determinaron los niveles de lactato en el medio condicionado. Las incubaciones se realizaron por triplicado y los resultados se expresan como $\bar{X} \pm$ DE de un experimento representativo de tres realizados (letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas, $p < 0.05$).

Habiendo comprobado la efectividad del inhibidor, se procedió a evaluar su efecto sobre la actividad de mTORC1. Para cumplir con dicho propósito, cultivos de células de Sertoli fueron mantenidos en condiciones basales o estimulados con FSH en ausencia o presencia de 3PO. Finalizadas las incubaciones, se determinaron los niveles de P-mTOR y de su sustrato fosforilado, p70S6K, por Western Blot. En la figura 11 se observa que 3PO inhibió el estímulo de FSH sobre los niveles de P-mTOR y P-p70S6K (paneles A y B).

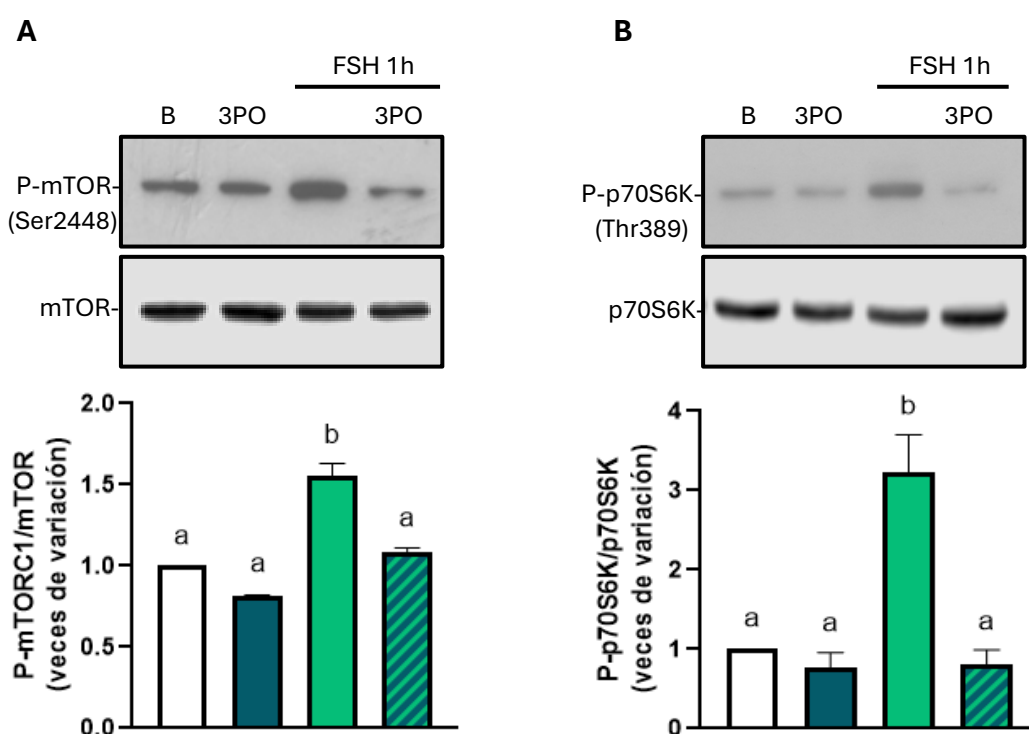


Figura 11. Efecto de 3PO sobre los niveles de fosforilación de mTOR y su sustrato, p70S6K, estimulados por FSH en células de Sertoli inmaduras.

Cultivos de células de Sertoli aisladas de testículos de rata de 8 días de edad fueron mantenidos en condiciones basales (B) o estimulados con FSH 100 ng/ml durante 1 hora en ausencia o presencia de 3PO 30 μ M. Los extractos celulares fueron utilizados para el análisis mediante Western Blot de P-mTOR y mTOR (**panel A**) y P-p70S6K y p70S6K (**panel B**). En el panel superior (autorradiografías) se muestra un experimento representativo de tres realizados. En el panel inferior (gráficos de barras), los resultados se muestran como veces de variación con respecto al basal (B) de la relación P-mTOR/mTOR (**panel A**) y P-p70S6K/p-70S6K (**panel B**) de tres experimentos independientes ($X \pm DE$; letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas, $p < 0.05$).

Estos resultados sugieren que la FSH requeriría del metabolismo glucolítico para activar la vía mTORC1.

Efecto de la inhibición de PFKFB3 sobre la proliferación de la célula de Sertoli estimulada por FSH

Sabiendo que mTORC1 está involucrado en la regulación por FSH de la proliferación de células de Sertoli, y habiendo evidenciado que la inhibición de la actividad de PFKFB3 se traduce en una menor actividad de la vía mTORC1, se desprende el interrogante si la glucólisis participa en la regulación por FSH de la progresión del ciclo celular. Para poder resolver esta incógnita, cultivos primarios de células de Sertoli fueron mantenidos en condiciones basales o estimulados con FSH en ausencia o presencia del inhibidor 3PO. Finalizadas las incubaciones, se determinaron: la actividad transcripcional de c-Myc, los niveles de ARNm de c-Myc, los de CCND1 y CCND2 y se evaluó la proliferación celular.

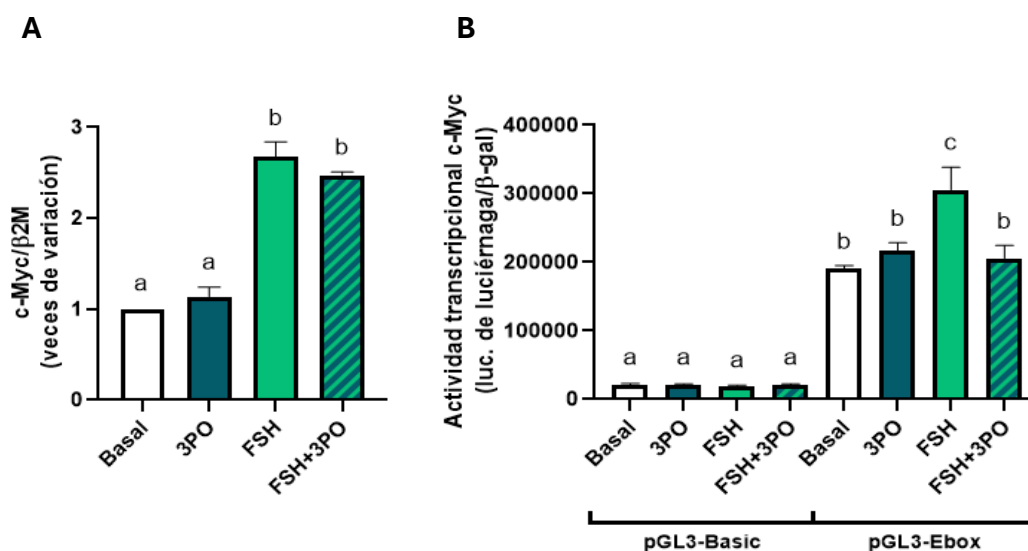


Figura 12. Efecto de 3PO sobre los niveles de ARNm y la actividad transcripcional de c-Myc estimulados por FSH.

Cultivos de células de Sertoli fueron mantenidos en condiciones basales (Basal) o estimulados con FSH 100 ng/ml durante 4 horas en ausencia o presencia de 3PO 30 μ M. Finalizado el período de incubación, se extrajo el ARN total y se determinaron los niveles de ARNm de c-Myc mediante la técnica de RT-qPCR. Los resultados se expresan como veces de variación respecto al valor Basal de la relación ARNm de interés/ARNm de referencia (β 2-Microglobulina - β 2M-) obtenidos de tres experimentos independientes ($X \pm DE$, letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas, $p < 0.05$) (**panel A**). Las células de Sertoli cotransfectadas transitoriamente con el plásmido pGL3-Ebox o pGL3-Basic en combinación con el plásmido comercial pMIR-REPORT™ β -gal Control fueron mantenidas en condiciones basales (Basal) o estimuladas con FSH 100 ng/ml durante 24 horas en ausencia o presencia de 3PO 30 μ M. Las incubaciones se realizaron por triplicado y los resultados se expresan como unidades de luz relativas para la actividad de la luciferasa (luc.) de luciérnaga normalizada a la actividad β -galactosidasa y representan la $X \pm DE$ de un experimento representativo de tres realizados (letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas, $p < 0.05$) (**panel B**).

La figura 12 muestra que FSH incrementó los niveles de ARNm de c-Myc y que la presencia de 3PO no alteró el efecto hormonal (panel A). Sin embargo, 3PO fue capaz de inhibir el estímulo de FSH sobre la actividad transcripcional de c-Myc (panel B), similar a lo observado en las incubaciones con Rap.

En lo que respecta a las ciclinas, en la figura 13 se observa que FSH aumentó los niveles de expresión del ARNm de las mismas y que en presencia del inhibidor la hormona fue incapaz de estimular sus niveles de expresión.

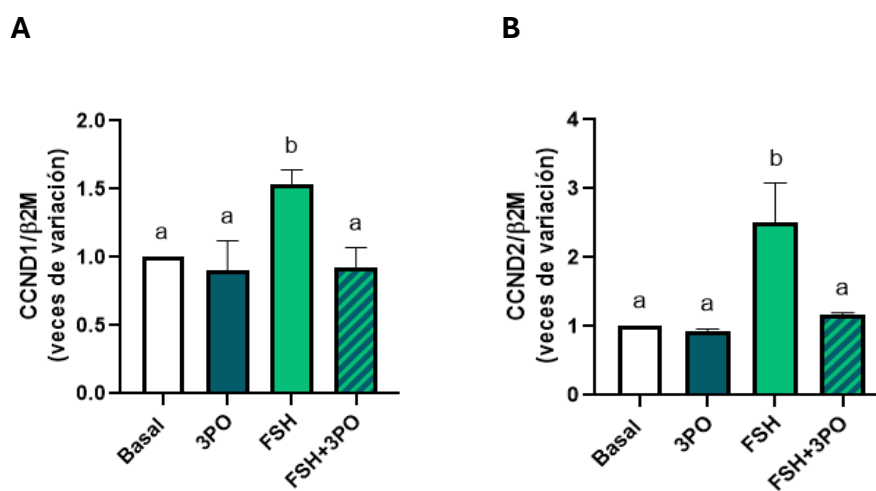


Figura 13. Efecto de 3PO sobre los niveles de ARNm de CCND1 y CCND2 estimulados por FSH. Cultivos de células de Sertoli aisladas de testículos de rata de 8 días de edad se mantuvieron en condiciones basales o se estimularon con FSH 100 ng/ml durante 2 (**panel A**) o 4 (**panel B**) horas en ausencia o presencia de 3PO 30 μ M. Finalizado el período de incubación, se extrajo el ARN total y se determinaron los niveles de ARNm de CCND1 (**panel A**) y CCND2 (**panel B**) mediante la técnica de RT-qPCR. Los resultados se expresan como veces de variación respecto al valor Basal de la relación ARNm de interés/ARNm de referencia (β 2-Microglobulina - β 2M-) obtenidos de tres experimentos independientes ($X \pm DE$, letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas, $p < 0.05$).

A continuación, se analizó el efecto de la inhibición de PFKFB3 sobre la proliferación celular evaluando la incorporación de BrdU y los niveles de antígeno Ki-67 en las células de Sertoli. La figura 14 muestra los resultados obtenidos para la incorporación de BrdU. Se observa que FSH incrementó el porcentaje de células que incorporaron dicho análogo de timidina y que la presencia de 3PO inhibió el estímulo ejercido por la hormona.

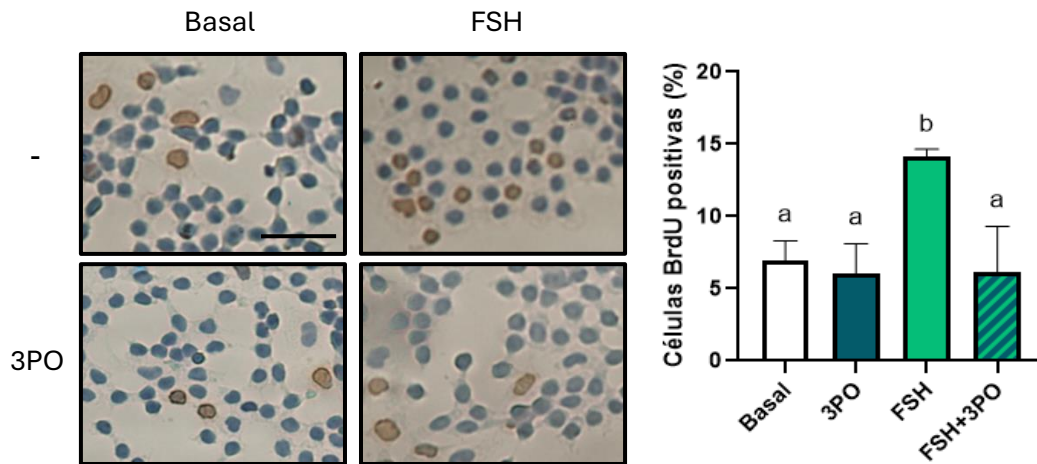


Figura 14. Efecto de 3PO sobre la incorporación de BrdU estimulada por FSH en células de Sertoli inmaduras.

Cultivos de células de Sertoli aisladas de testículos de rata de 8 días de edad fueron incubados en presencia de BrdU y mantenidos en condiciones basales (Basal) o estimulados con FSH 100 ng/ml durante 24 horas en ausencia o presencia de 3PO 30 μ M. Finalizada la incubación, se procedió a la detección de BrdU por inmunocitoquímica. En el panel izquierdo (microfotografías) se muestra un experimento representativo de cuatro realizados. Barra de escala: 30 μ m. En el panel derecho (gráfico de barras), los resultados se expresan como porcentaje de células positivas para BrdU (núcleos marrones) con respecto al total de células (núcleos marrones + núcleos azules), obtenidos de cuatro experimentos independientes ($\bar{X} \pm DE$, letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas, $p < 0.05$).

Los resultados obtenidos para la detección de los niveles de antígeno Ki-67 se muestran en la figura 15. Se observó que FSH promovió un incremento en el número de células de Sertoli que expresan Ki-67 y que la presencia de 3PO inhibió dicho estímulo hormonal.

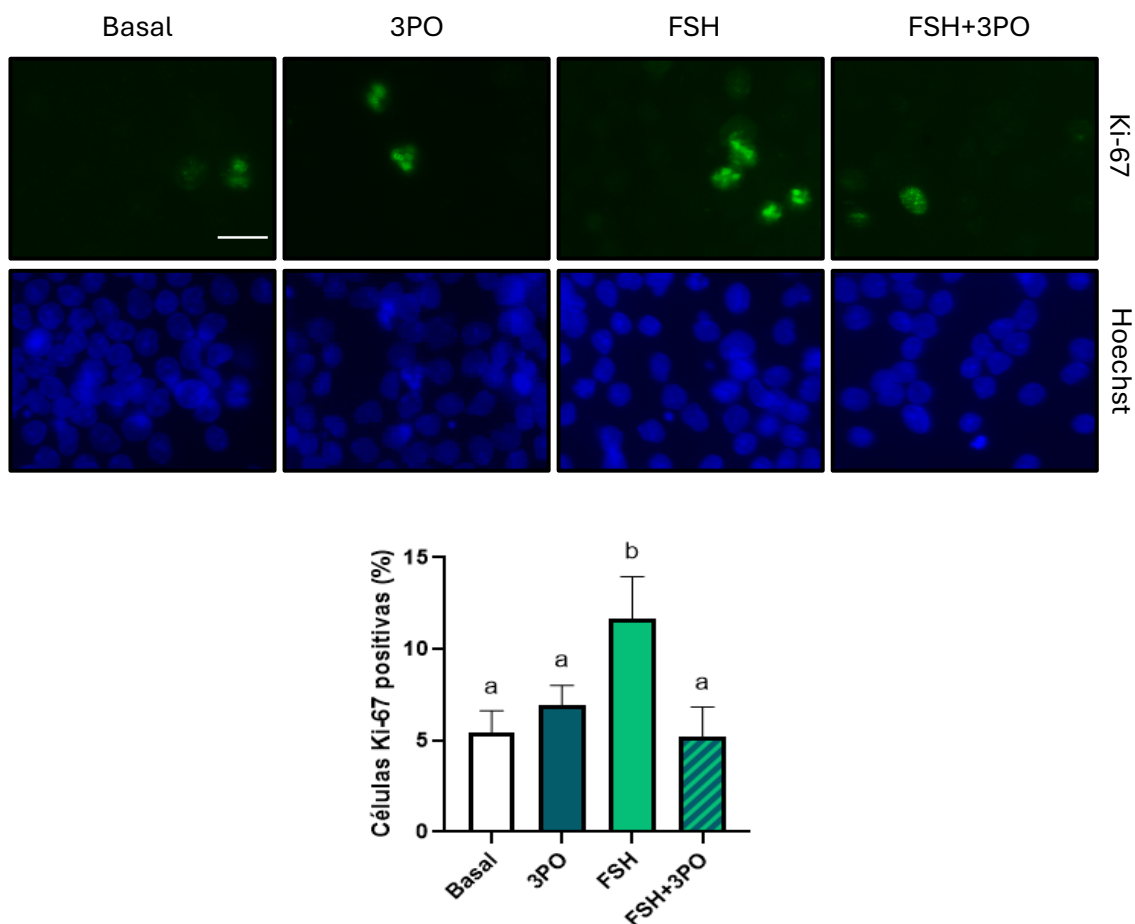


Figura 15. Efecto de 3PO sobre los niveles de antígeno Ki-67 estimulados por FSH en células de Sertoli inmaduras.

Cultivos de células de Sertoli aisladas de testículos de rata de 8 días de edad fueron mantenidos en condiciones basales (Basal) o estimulados con FSH 100 ng/ml durante 24 horas en ausencia o presencia de 3PO 30 μ M. Finalizada la incubación, se procedió a la detección del antígeno Ki-67 por inmunofluorescencia. En el panel superior (microfotografías) se muestra un experimento representativo de cuatro realizados. Barra de escala: 20 μ m. En el panel inferior (gráfico de barras), los resultados se expresan como porcentaje de células positivas para Ki-67 (verde) con respecto al total de células (azul), obtenidos de cuatro experimentos independientes ($X \pm DE$, letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas, $p < 0.05$).

Estos resultados sugieren que la glucólisis podría considerarse parte de los mecanismos moleculares utilizados por la FSH para modular la proliferación en las células de Sertoli.

Efecto de la inhibición de LDH sobre la activación de la vía mTORC1 por FSH en células de Sertoli inmaduras

Con el objeto de reforzar la hipótesis de que la glucólisis es parte de la señalización que evoca FSH para regular la proliferación de las células de Sertoli, se procedió a impedir el flujo glucolítico a partir de la utilización de un análogo del piruvato, el oxamato (OXA), inhibidor de la actividad de la última enzima de la glucólisis aeróbica, la LDH.

En principio, se evaluó la viabilidad celular en presencia de OXA 5 mM y se observó que dicho inhibidor no modifica la viabilidad de las células de Sertoli en incubaciones de 24 horas (Basal: $96.4 \pm 1.3\%$, OXA 5 mM: $95.2 \pm 3.5\%$ de células viables, expresado como $\text{media} \pm \text{DE}$, $n = 3$, ns vs Basal). Por lo tanto, la concentración de 5 mM fue la elegida para llevar a cabo el resto de los experimentos.

De manera similar a los análisis efectuados con 3PO, en primera instancia se evaluó la efectividad de OXA 5 mM en su capacidad para inhibir el flujo glucolítico, utilizando como marcador el lactato. La figura 16 muestra que FSH fue incapaz de incrementar los niveles de lactato en presencia de OXA en el medio condicionado.

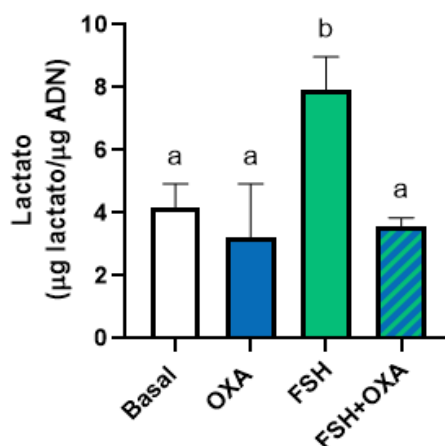


Figura 16. Efecto de OXA sobre los niveles de lactato estimulados por FSH.

Cultivos de células de Sertoli aisladas de testículos de rata de 8 días de edad se mantuvieron en condiciones basales (Basal) o se estimularon con FSH 100 ng/ml durante 24 horas en presencia o ausencia de OXA 5 mM. Finalizado el período de incubación, se determinaron los niveles de lactato en el medio condicionado. Las incubaciones se realizaron por triplicado y los resultados se expresan como $X \pm \text{DE}$ de un experimento representativo de tres realizados (letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas, $p < 0.05$).

Luego, se procedió a evaluar el efecto del inhibidor de la enzima LDH sobre la activación de la vía de señalización mTORC1. En la figura 17 se muestran los resultados obtenidos para la determinación de los niveles de P-mTOR y P-p70S6K, estimulados por FSH en presencia de OXA. Se observa que OXA inhibió tanto el estímulo de FSH sobre los niveles de P-mTOR (panel A) como sobre los niveles de P-p70S6K (panel B).

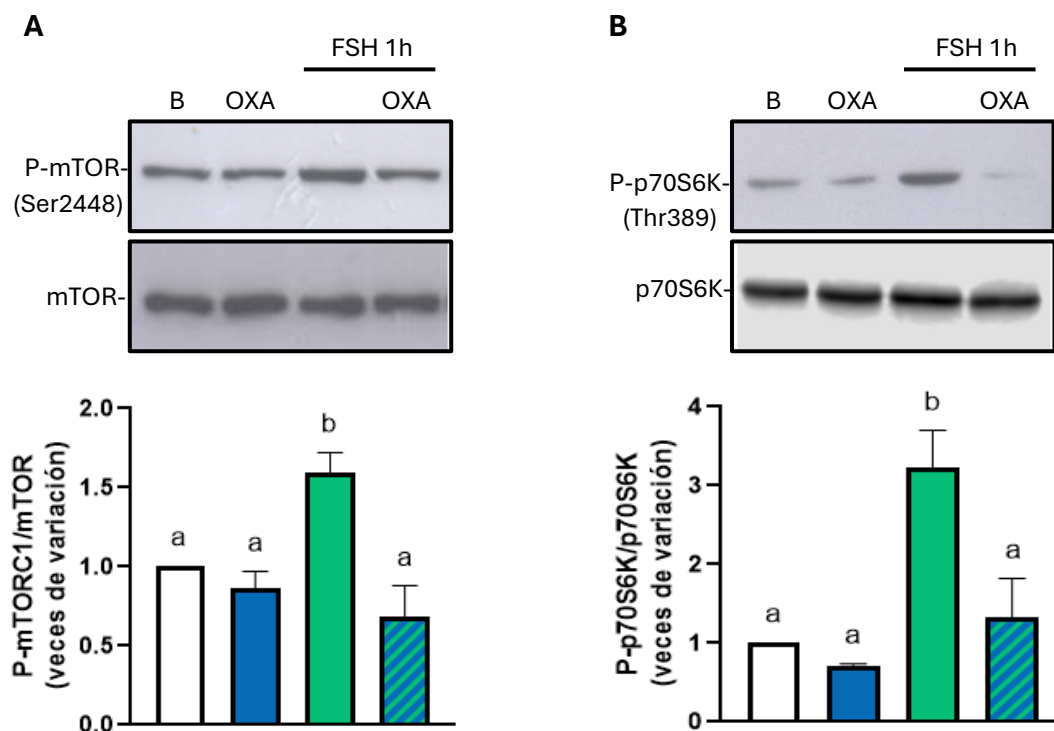


Figura 17. Efecto de OXA sobre los niveles de fosforilación de mTOR y su sustrato, p70S6K, estimulados por FSH en células de Sertoli inmaduras.

Cultivos de células de Sertoli aisladas de testículos de rata de 8 días de edad fueron mantenidos en condiciones basales (B) o estimulados con FSH 100 ng/ml en ausencia o presencia de OXA 5 mM durante 1 hora. Los extractos celulares fueron utilizados para el análisis mediante Western Blot de P-mTOR y mTOR (**panel A**) y P-p70S6K y p70S6K (**panel B**). En el panel superior (autorradiografías) se muestra un experimento representativo de tres realizados. En el panel inferior (gráficos de barras), los resultados se muestran como veces de variación con respecto al basal (B) de la relación P-mTOR/mTOR (**panel A**) y P-p70S6K/p-70S6K (**panel B**) de tres experimentos independientes ($\bar{X} \pm DE$; letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas, $p < 0.05$).

En su conjunto, estos resultados refuerzan el concepto delineado con los hallazgos experimentales en incubaciones con 3PO de que la FSH requiere un metabolismo glucolítico aeróbico para activar la vía mTORC1.

Efecto de la inhibición de LDH sobre la proliferación de la célula de Sertoli estimulada por FSH

Habiendo evidenciado que la inhibición de la actividad de LDH se traduce en una menor actividad de la vía mTORC1, se continuó el estudio analizando el efecto del OXA sobre la regulación de la proliferación de la célula de Sertoli por FSH. Se llevaron adelante cultivos primarios de células de Sertoli, los cuales fueron mantenidos en condiciones basales o estimulados con FSH en ausencia o presencia del inhibidor OXA. Terminadas las incubaciones, se determinaron la actividad transcripcional de c-Myc, los niveles de ARNm de c-Myc, CCND1 y CCND2 y se evaluó la proliferación celular.

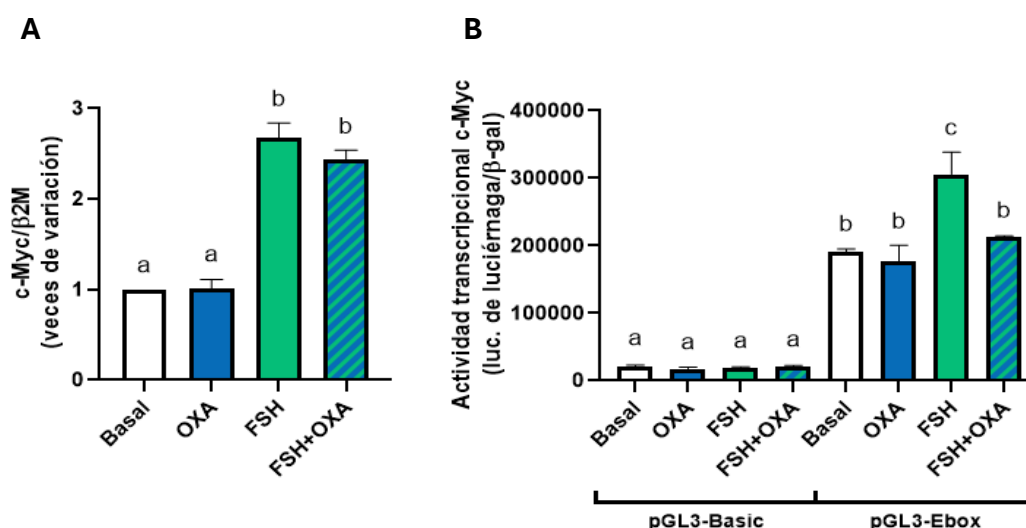


Figura 18. Efecto de OXA sobre los niveles de ARNm y la actividad transcripcional de c-Myc estimulados por FSH.

Cultivos de células de Sertoli fueron mantenidos en condiciones basales (Basal) o estimulados con FSH 100 ng/ml durante 4 horas en ausencia o presencia de OXA 5 mM. Finalizado el período de incubación, se extrajo el ARN total y se determinaron los niveles de ARNm de c-Myc mediante la técnica de RT-qPCR. Los resultados se expresan como veces de variación respecto al valor Basal de la relación ARNm de interés/ARNm de referencia (β 2-Microglobulina - β 2M-) obtenidos de tres experimentos independientes ($X \pm DE$, letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas, $p < 0.05$) (**panel A**). Las células de Sertoli cotransfectadas transitoriamente con el plásmido pGL3-Ebox o pGL3-Basic en combinación con el plásmido comercial pMIR-REPORT™ β -gal Control fueron mantenidas en condiciones basales (Basal) o estimuladas con FSH 100 ng/ml durante 24 horas en ausencia o presencia de OXA 5mM. Las incubaciones se realizaron por triplicado y los resultados se expresan como unidades de luz relativas para la actividad de la luciferasa (luc.) de luciérnaga normalizada a la actividad β -galactosidasa y representan la $X \pm DE$ de un experimento representativo de tres realizados (letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas, $p < 0.05$) (**panel B**).

La figura 18 muestra que la presencia de OXA no alteró el efecto hormonal sobre los niveles de ARNm de c-Myc (panel A). Sin embargo, se observó que la presencia de OXA fue capaz de bloquear el incremento producido por FSH sobre la actividad transcripcional de c-Myc (panel B).

En la figura 19 se muestran los resultados obtenidos para el análisis de los niveles de ARNm de las ciclinas. Se puede observar que FSH aumentó los niveles de expresión del ARNm tanto de la CCND1 (panel A) como de la CCND2 (panel B) y que en presencia de OXA la hormona fue incapaz de estimular los niveles de expresión de las mismas.

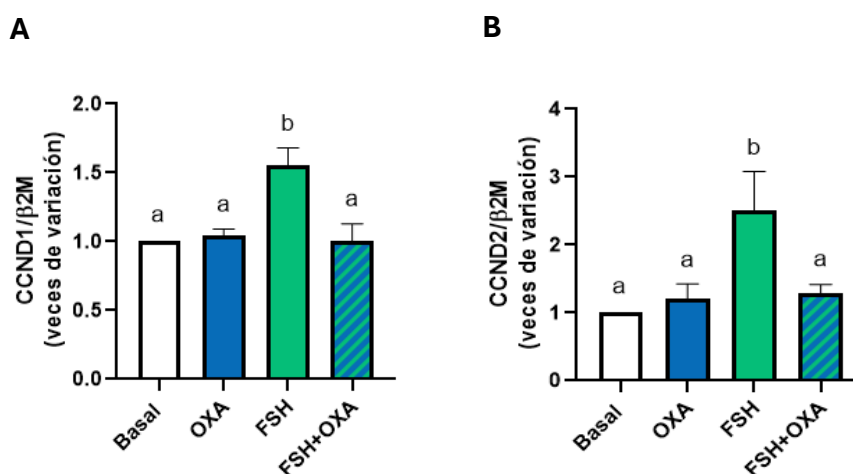


Figura 19. Efecto de OXA sobre los niveles de ARNm de CCND1 y CCND2 estimulados por FSH. Cultivos de células de Sertoli aisladas de testículos de rata de 8 días de edad se mantuvieron en condiciones basales o se estimularon con FSH 100 ng/ml durante 2 (**panel A**) o 4 (**panel B**) horas en ausencia o presencia de OXA 5 mM. Finalizado el período de incubación, se extrajo el ARN total y se determinaron los niveles de ARNm de CCND1 (**panel A**) y CCND2 (**panel B**) mediante la técnica de RT-qPCR. Los resultados se expresan como veces de variación respecto al valor Basal de la relación ARNm de interés/ARNm de referencia (β 2-Microglobulina - β 2M-) obtenidos de tres experimentos independientes ($X \pm DE$, letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas, $p < 0.05$).

De manera similar a los análisis efectuados con 3PO, para estudiar el efecto de la inhibición de la actividad LDH sobre la proliferación celular, se procedió a evaluar la incorporación de BrdU y los niveles de antígeno Ki-67 en las células de Sertoli. La figura 20 muestra que FSH incrementó el porcentaje de células BrdU positivas y que la presencia de OXA inhibió significativamente el estímulo ejercido por la hormona.

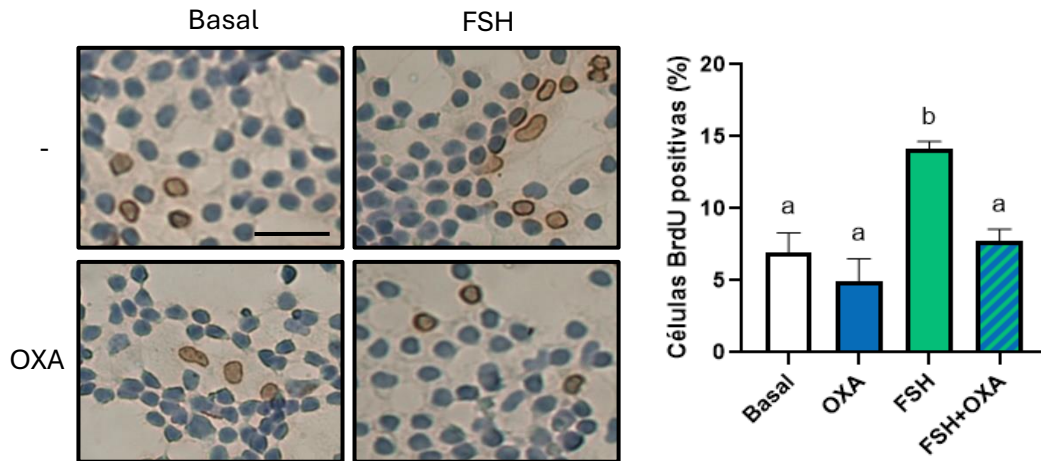


Figura 20. Efecto de OXA sobre la incorporación de BrdU estimulada por FSH en células de Sertoli inmaduras.

Cultivos de células de Sertoli aisladas de testículos de rata de 8 días de edad fueron incubados en presencia de BrdU y mantenidos en condiciones basales (Basal) o estimulados con FSH 100 ng/ml durante 24 horas en ausencia o presencia de OXA 5 mM. Finalizada la incubación, se procedió a la detección de BrdU por inmunocitoquímica. En el panel izquierdo (microfotografías) se muestra un experimento representativo de cuatro realizados. Barra de escala: 30 μ m. En el panel derecho (gráfico de barras), los resultados se expresan como porcentaje de células positivas para BrdU (núcleos marrones) con respecto al total de células (núcleos marrones + núcleos azules), obtenidos de cuatro experimentos independientes ($\bar{X} \pm DE$, letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas, $p < 0.05$).

Los resultados obtenidos para la detección de los niveles de antígeno Ki-67 se muestran en la figura 21. Se observa que FSH promovió un incremento significativo del número de células de Sertoli que expresan Ki-67 y que la presencia de OXA inhibió dicho estímulo hormonal.

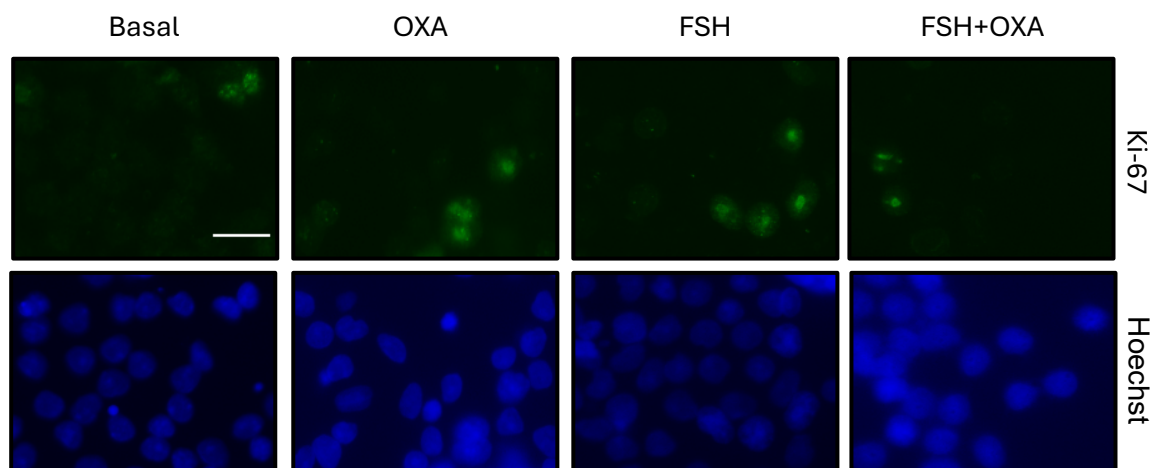


Figura 21. Efecto de OXA sobre la expresión del antígeno Ki-67 estimulada por FSH en células de Sertoli inmaduras.

Cultivos de células de Sertoli aisladas de testículos de rata de 8 días de edad fueron mantenidos en condiciones basales (Basal) o estimulados con FSH 100 ng/ml durante 24 horas en ausencia o presencia de OXA 5 mM. Finalizada la incubación, se procedió a la detección del antígeno Ki-67 por inmunofluorescencia. En el panel superior (microfotografías) se muestra un experimento representativo de cuatro realizados. Barra de escala: 20 μ m. En el panel inferior (gráfico de barras), los resultados se expresan como porcentaje de células positivas para Ki-67 (verde) con respecto al total de células (azul), obtenidos de cuatro experimentos independientes ($X \pm DE$, letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas, $p < 0.05$).

Una vez más, estos resultados refuerzan la idea de que la glucólisis podría considerarse como parte de los mecanismos moleculares utilizados por la FSH para modular la proliferación en las células de Sertoli.

Participación de la glucólisis en la regulación de la expresión de PFKFB3 y LDHA por FSH en células de Sertoli inmaduras

Dado que mTORC1 está involucrado en la regulación de la expresión de PFKFB3 y LDHA por FSH, y la inhibición de la glucólisis se traduce en una menor actividad de la vía mTORC1, se prosiguió a indagar sobre la participación de la glucólisis en la inducción de la expresión de PFKFB3 y LDHA por FSH. Para ello, cultivos de células de Sertoli fueron incubados en condiciones basales o estimulados con FSH en ausencia o presencia de 3PO u OXA. En la figura 22 se muestran los resultados obtenidos para el análisis de los niveles de expresión de PFKFB3 (panel A) y LDHA (panel B).

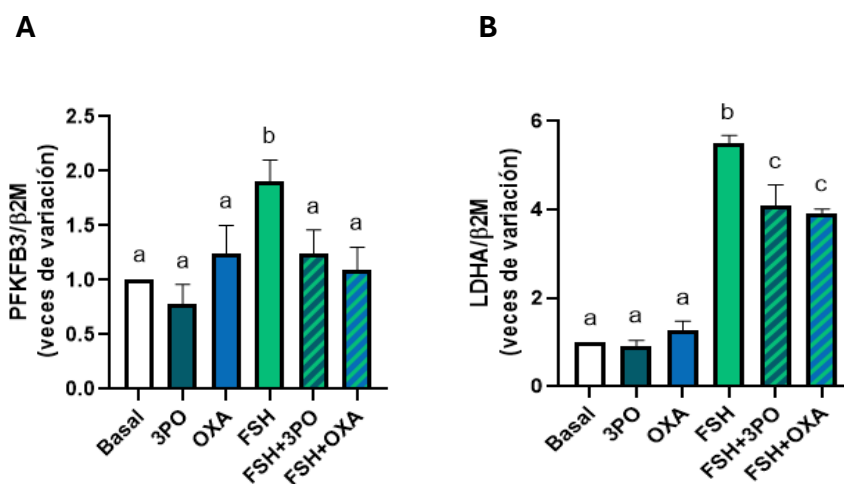


Figura 22. Efecto de 3PO y OXA sobre los niveles de ARNm de PFKFB3 y LDHA estimulados con FSH en células de Sertoli inmaduras.

Cultivos de células de Sertoli aisladas de testículos de rata de 8 días de edad fueron mantenidos en condiciones basales (Basal) o estimulados con FSH 100 ng/ml durante 4 horas en ausencia o presencia de 3PO 30 μM u OXA 5 mM. Finalizado el período de incubación, se extrajo el ARN total y se determinaron los niveles de ARNm de PFKFB3 (**panel A**) y LDHA (**panel B**) mediante la técnica de RT-qPCR. Los resultados se expresan como veces de variación respecto al valor Basal de la relación ARNm de interés/ARNm de referencia (β2-Microglobulina -β2M-) obtenidos de tres experimentos independientes (X±DE, letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas, p<0.05).

Se observó que tanto 3PO como OXA bloquearon el efecto de FSH sobre los niveles de ARNm de la enzima bifuncional PFKFB3. Además, se puede observar que 3PO y OXA inhibieron, al menos en parte, los niveles de ARNm de LDHA estimulados por FSH.

Estos resultados sugieren que la glucólisis aeróbica coopera con FSH para inducir la expresión de PFKFB3 y LDHA.

PARTICIPACIÓN DEL LACTATO EN LA REGULACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN DE LA CÉLULA DE SERTOLI

En este trabajo de tesis se ha demostrado la necesidad de un alto flujo glucolítico en las células de Sertoli inmaduras para mantener la tasa de proliferación. Sin embargo, aún se desconocen los mecanismos moleculares subyacentes a este proceso en las células de Sertoli que proliferan. Dadas las evidencias existentes sobre las acciones del lactato como molécula señal, cabía preguntarse si el hidroxiaácido era la conexión entre la glucólisis y la proliferación.

Regulación de la vía mTORC1 en células de Sertoli inmaduras por lactato

Teniendo presente aquellos estudios que indican que el lactato podría actuar como una molécula señalización multifuncional ejerciendo variadas acciones biológicas en distintos tipos celulares, en primera instancia, se evaluó si el hidroxiaácido sería capaz de regular la vía de señalización de mTORC1. Para ello, se utilizaron cultivos de células de Sertoli, los cuales fueron mantenidos en condiciones basales o en presencia de lactato (20 mM) durante distintos períodos de tiempo. Finalizadas las incubaciones, se analizaron los niveles de fosforilación de mTOR y de su sustrato, p70S6K, por Western Blot. La figura 23 muestra que el lactato incrementó los niveles de fosforilación de ambas proteínas ensayadas luego de 1 y 2 horas de tratamiento (paneles A y B).

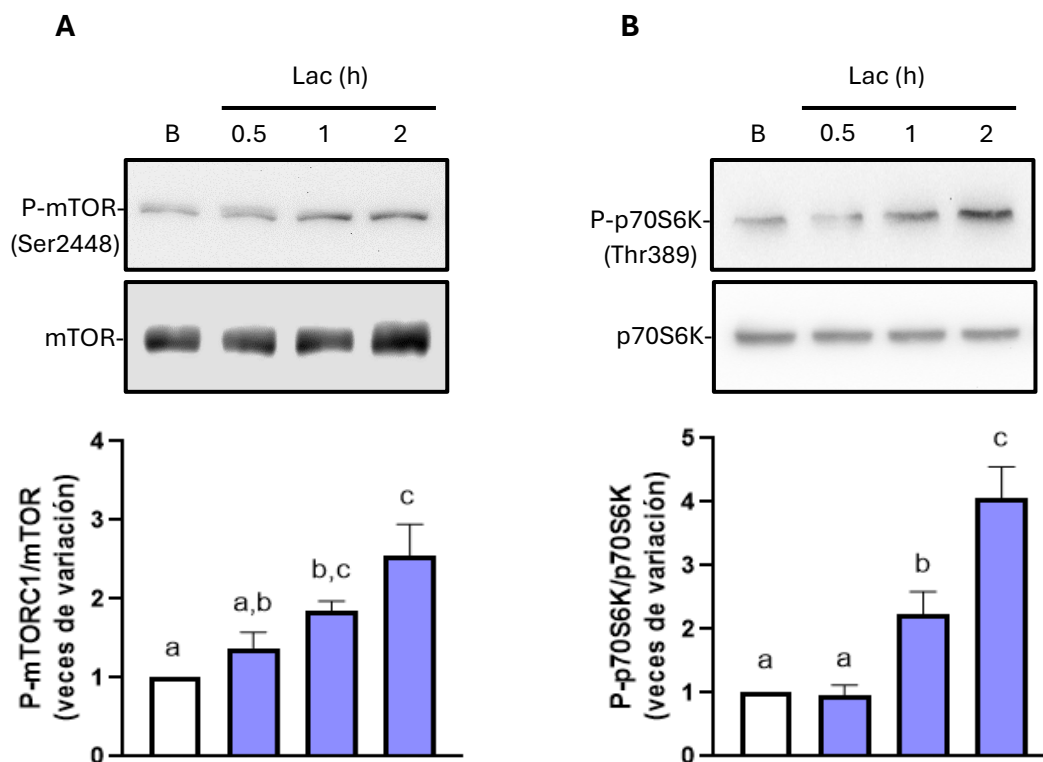


Figura 23. Efecto del lactato sobre los niveles de fosforilación de mTOR y su sustrato, p70S6K, en células de Sertoli inmaduras.

Cultivos de células de Sertoli aisladas de testículos de rata de 8 días de edad fueron mantenidos en condiciones basales (B) o en presencia de lactato (Lac) 20 mM durante 0.5, 1 o 2 horas. Los extractos celulares fueron utilizados para el análisis mediante Western Blot de P-mTOR y mTOR (**panel A**) y P-p70S6K y p70S6K (**panel B**). En el panel superior (autorradiografías) se muestra un experimento representativo de tres realizados. En el panel inferior (gráficos de barras), los resultados se muestran como veces de variación con respecto al basal (B) de la relación P-mTOR/mTOR (**panel A**) y P-p70S6K/p70S6K (**panel B**) de tres experimentos independientes ($X \pm DE$; letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas, $p < 0.05$).

Estos resultados sugieren que el lactato activa la vía de señalización mTORC1 en células de Sertoli que proliferan.

Regulación de la proliferación de la célula de Sertoli por lactato

Continuando los estudios sobre el posible rol regulatorio que podría ejercer el lactato como molécula señalizadora en el modelo experimental en cuestión, y tras observar que el hidroxiaácido incrementó la actividad de la vía mTORC1, se buscó corroborar si dicho metabolito conlleva a un aumento de la proliferación celular. Para tal fin, células

de Sertoli fueron cultivadas en condiciones basales o en presencia de lactato (20 mM) durante distintos períodos de tiempo. Una vez finalizadas las incubaciones, se analizaron los siguientes parámetros proliferativos: los niveles de expresión de CCND1 y CCND2, la incorporación de BrdU y los niveles de antígeno Ki-67 en las células de Sertoli.

Los resultados correspondientes al análisis de los niveles de expresión de las ciclinas se pueden observar en la figura 24. El lactato incrementó los niveles de expresión de CCND2 (panel B) significativamente luego de 4 horas de tratamiento, mientras que no modificó los niveles de expresión correspondientes a CCND1 (panel A).

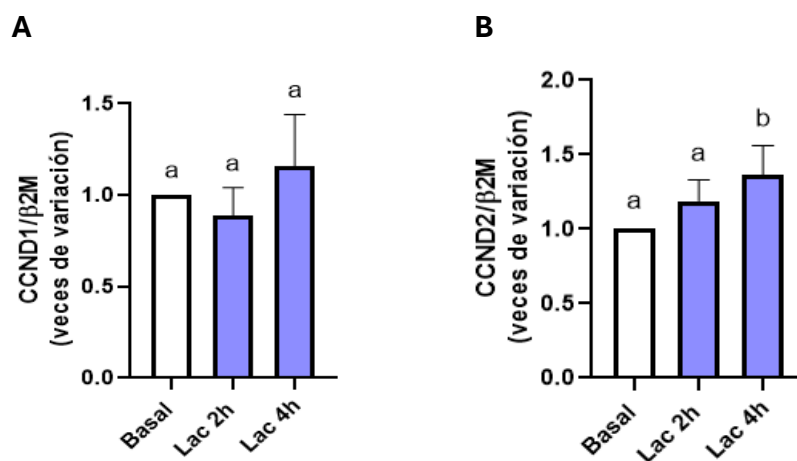


Figura 24. Efecto del lactato sobre los niveles de ARNm de CCND1 y CCND2 en células de Sertoli inmaduras.

Cultivos de células de Sertoli aisladas de testículos de rata de 8 días de edad fueron mantenidos en condiciones basales (B) o en presencia de lactato (Lac) 20 mM durante 2 o 4 horas. Finalizado el período de incubación, se extrajo el ARN total y se determinaron los niveles de ARNm de CCND1 (**panel A**) y CCND2 (**panel B**) mediante la técnica de RT-qPCR. Los resultados se expresan como veces de variación respecto al valor Basal de la relación ARNm de interés/ARNm de referencia (β 2-Microglobulina - β 2M-) obtenidos de tres experimentos independientes ($\bar{X} \pm DE$, letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas, $p < 0.05$).

En lo que respecta al análisis de la incorporación de BrdU, en la figura 25 se observa que el lactato aumentó significativamente el número de células que incorporaron el análogo de la timidina.

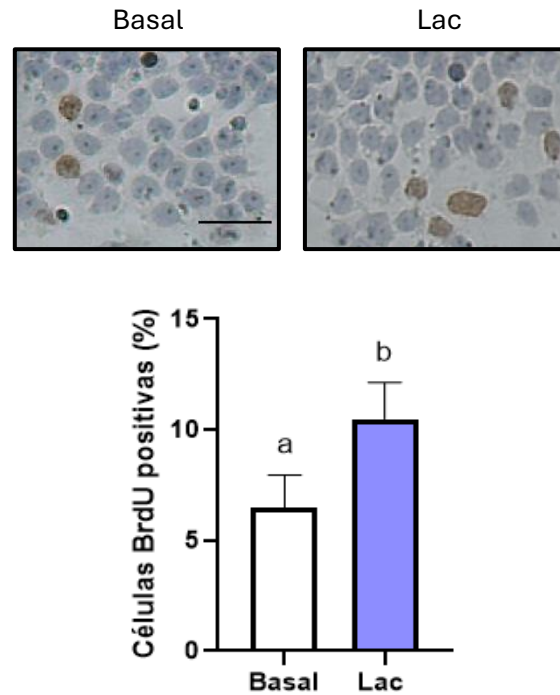


Figura 25. Efecto del lactato sobre la incorporación de BrdU en células de Sertoli inmaduras.

Cultivos de células de Sertoli aisladas de testículos de rata de 8 días de edad fueron incubados en presencia de BrdU y mantenidos en condiciones basales (B) o en presencia de lactato (Lac) 20 mM durante 24 horas. Finalizada la incubación, se procedió a la detección de BrdU por inmunocitoquímica. En el panel superior (microfotografías) se muestra un experimento representativo de cuatro realizados. Barra de escala: 30 μ m. En el panel inferior (gráfico de barras), los resultados se expresan como porcentaje de células positivas para BrdU (núcleos marrones) con respecto al total de células (núcleos marrones + núcleos azules), obtenidos de cuatro experimentos independientes ($X \pm DE$, letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas, $p < 0.05$).

Los resultados obtenidos para la detección de los niveles de antígeno Ki-67 se muestran en la figura 26. Se observa que el lactato promovió un incremento significativo del número de células de Sertoli que expresan Ki-67.

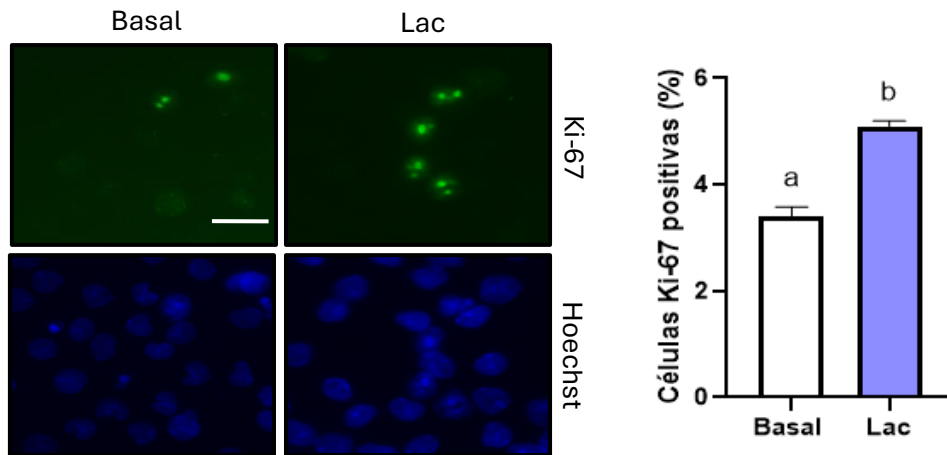


Figura 26. Efecto del lactato sobre la expresión del antígeno Ki-67 en células de Sertoli inmaduras.

Cultivos de células de Sertoli aisladas de testículos de rata de 8 días de edad fueron mantenidos en condiciones basales (B) o en presencia de lactato (Lac) 20 mM durante 24 horas. Finalizada la incubación, se procedió a la detección del antígeno Ki-67 por inmunofluorescencia. En el panel izquierdo (microfotografías) se muestra un experimento representativo de cuatro realizados. Barra de escala: 20 μ m. En el panel derecho (gráfico de barras), los resultados se expresan como porcentaje de células positivas para Ki-67 (verde) con respecto al total de células (azul), obtenidos de cuatro experimentos independientes ($X \pm DE$, letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas, $p < 0.05$).

Estos resultados sugieren que el lactato regula positivamente la proliferación de células de Sertoli. Además, se postula que el hidroxiaácido podría ser el metabolito mediador en la contribución de la glucólisis en la regulación de la proliferación de células de Sertoli por FSH.

En resumen, los resultados obtenidos en esta primera parte del trabajo de tesis muestran que en las células de Sertoli inmaduras la FSH regula simultáneamente la proliferación celular y la glucólisis de una manera dependiente de mTORC1. Además, la glucólisis parece cooperar con la FSH en la estimulación tanto de la proliferación como del metabolismo glucolítico a través del control ejercido sobre la actividad de la vía de señalización de mTORC1, postulando al lactato como un posible metabolito mediador en esta contribución. Por lo tanto, se puede plantear la existencia de una retroalimentación positiva entre la vía de señalización de mTORC1 y la glucólisis bajo estimulación con FSH,

constituyendo así un círculo virtuoso involucrado en la regulación de la proliferación de las células de Sertoli (figura 27).

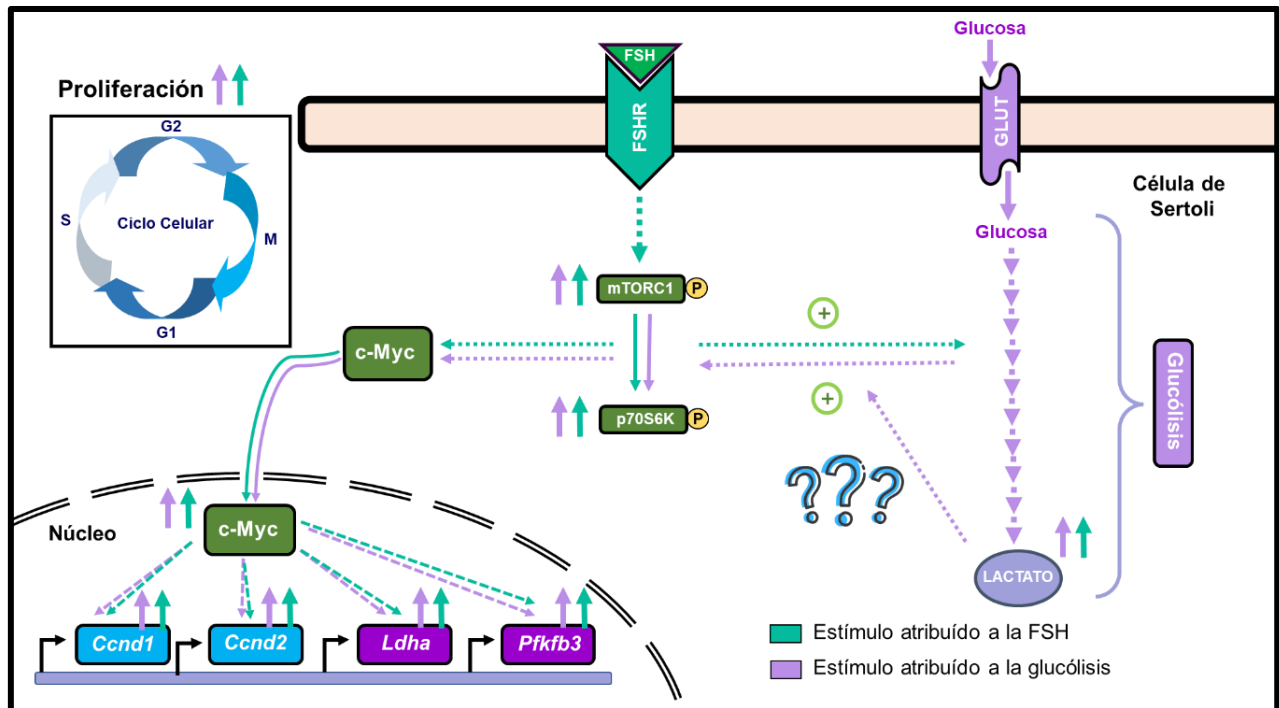


Figura 27. Esquema de los mecanismos implicados en la cooperación entre la glucólisis y la regulación de la proliferación de células de Sertoli por la FSH a través de la vía de señalización mTORC1. La FSH regula positivamente la glucólisis y la proliferación de forma mTORC1 dependiente, induciendo la expresión de *Ccnd1*, *Ccnd2*, *Ldha* y *Pfkfb3* mediante una mayor actividad transcripcional de c-Myc (vía verde). Simultáneamente, el mayor flujo glucolítico promovido por la FSH deriva en altos niveles de lactato. Este metabolito podría contribuir a la activación de la vía de señalización mTORC1 en el mecanismo de acción de FSH, señal de transducción involucrada en la regulación positiva de la expresión de PFKFB3, LDHA, CCND1 y CCND2 a través de c-Myc (vía violeta).

2) PARTICIPACIÓN DE LA GLUTAMINÓLISIS EN LA REGULACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN POR FSH EN LA CÉLULA DE SERTOLI

Como se ha mencionado anteriormente, se puede decir que en términos bioenergéticos la proliferación celular es un proceso biológico extremadamente exigente ya que, para satisfacer las altas demandas de sustratos —como glucosa y aminoácidos— necesarias para sostener las vías biosintéticas que acompañan el crecimiento y la división celular, las células en proliferación alteran su metabolismo. En este contexto de reorganización metabólica, no solo se destaca la glucólisis aeróbica, sino que también es importante señalar la relevancia que adquiere el metabolismo del aminoácido L-glutamina (L-gln). Existe evidencia que establece que el consumo de L-gln en las células que proliferan supera con creces las demandas de cualquier otro aminoácido. Dado que la tasa de metabolización de L-gln supera la capacidad biosintética de la célula, a pesar de ser un aminoácido no esencial, el mismo se considera condicionalmente esencial en estas circunstancias.

Aunque la mayoría de los estudios que relacionan la proliferación celular con el incremento de la demanda de L-gln se han llevado a cabo en células tumorales, se ha demostrado que esta es una característica presente también en algunos tipos de células normales que proliferan. Si bien por todo lo descrito anteriormente, el estudio del rol del metabolismo de L-gln como parte de los cambios metabólicos asociados a la progresión del ciclo celular ha despertado interés en la última década, hasta el momento de este trabajo de tesis su papel en las células de Sertoli inmaduras aún no había sido evaluado. Es por ello que el segundo objetivo propuesto fue evaluar la participación del metabolismo de L-gln en la regulación de la proliferación de la célula de Sertoli por FSH, principal mitógeno de este tipo celular.

Caracterización de la expresión de genes que codifican para proteínas clave del metabolismo de la glutamina en la célula de Sertoli inmadura

Si se hace referencia al metabolismo de la L-gln, es necesario tener presente las principales proteínas que intervienen y que son claves para la disponibilidad de dicho aminoácido en las células. Como fue especificado en la introducción, L-gln puede ser obtenida por biosíntesis *de novo* mediante la acción de la enzima GS o por su entrada desde el medio extracelular a través de transportadores específicos, como son el SLC38A5 y el SLC1A5. Una vez dentro de la célula, el aminoácido puede ser utilizado en distintos procesos, siendo uno de ellos la metabolización a través de la glutaminólisis. Esta vía metabólica convierte a L-gln en un metabolito intermediario del ciclo de Krebs, el α -KG, proceso en el cual participan las isoenzimas GLS1 o GLS2, que catalizan el paso limitante de la velocidad de la glutaminólisis.

En primer lugar, y considerando el objetivo propuesto para este segundo capítulo del trabajo de tesis, se caracterizó, entonces, la expresión de genes que codifican para las proteínas clave implicadas en el metabolismo de dicho aminoácido mencionadas anteriormente. Para tal fin, se utilizó ADNc de células de Sertoli inmaduras y ADNc de tejidos de rata con alta expresión de los genes de interés como controles positivos.

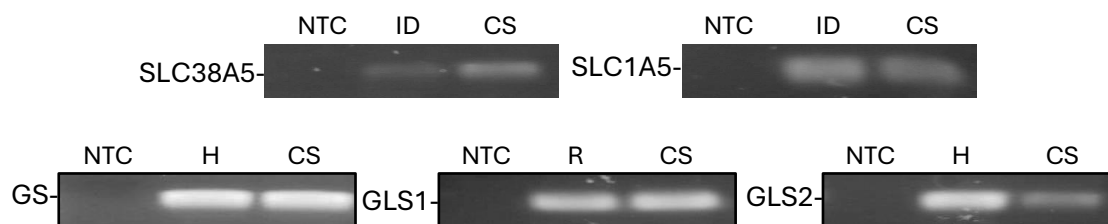


Figura 28. Caracterización de la expresión de SLC38A5, SLC1A5, GS, GLS1 y GLS2 en células de Sertoli inmaduras.

El ARN total de intestino delgado (ID), hígado (H), riñón (R) o células de Sertoli inmaduras (CS) de rata fue extraído y se obtuvo el ADNc por retrotranscripción. La expresión se analizó mediante RT-PCR. Los productos de la amplificación fueron separados por electroforesis en gel de agarosa y se visualizaron por tinción del gel con bromuro de etidio. NTC: blanco.

Utilizando dicho material para el análisis de expresión por RT-PCR, se observó que en células de Sertoli inmaduras se expresan: SLC38A5, SLC1A5, GS, GSL1 y GLS2. Estos resultados se visualizan en la figura 28 que se muestra a continuación.

REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE GENES QUE CODIFICAN PARA PROTEÍNAS CLAVE DEL METABOLISMO DE LA GLUTAMINA POR FSH EN LA CÉLULA DE SERTOLI INMADURA

Una vez comprobada la expresión de genes que codifican para proteínas clave del metabolismo de L-gln, se procedió a evaluar si dicha expresión estaba regulada por FSH. Para tal fin, cultivos primarios de células de Sertoli provenientes de animales de 8 días de edad fueron mantenidos en condiciones basales o estimulados con FSH durante distintos períodos de tiempo. Finalizadas las incubaciones, se determinaron los niveles de expresión de: SLC38A5, SLC1A5, GS y las isoformas GSL1 y GLS2.

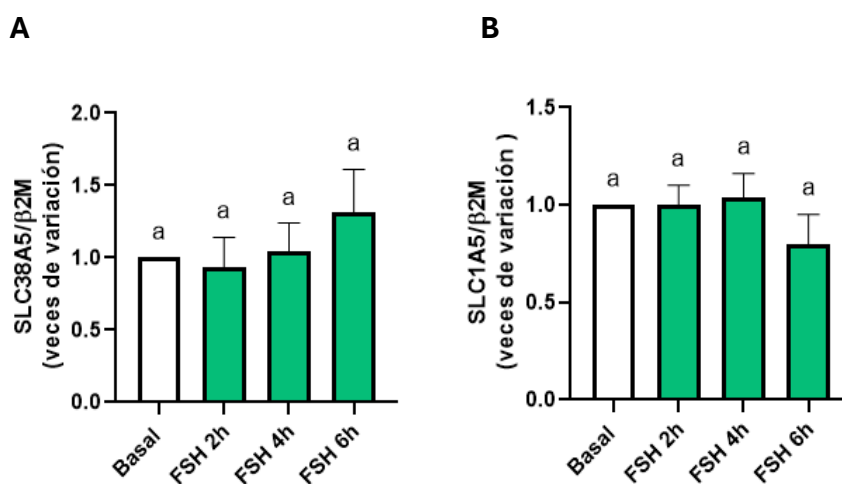


Figura 29. Regulación de los niveles de ARNm de SLC38A5 y SLC1A5 por FSH en células de Sertoli inmaduras.

Cultivos de células de Sertoli aisladas de testículos de rata de 8 días de edad fueron mantenidos en medio de cultivo habitual en condiciones basales (Basal) o estimulados con FSH 100 ng/ml durante 2, 4 o 6 horas. Finalizado el período de incubación, se extrajo el ARN total y se determinaron los niveles de ARNm de SLC38A5 (**panel A**) y SLC1A5 (**panel B**) mediante la técnica de RT-qPCR. Los resultados se expresan como veces de variación respecto al valor Basal de la relación ARNm de interés/ARNM de referencia (β 2-Microglobulina - β 2M-) obtenidos de tres experimentos independientes ($X \pm DE$, letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas, $p < 0.05$).

En la figura 29 se muestran los resultados obtenidos para la determinación de los niveles de expresión de SLC38A5 y SLC1A5. Se observa que FSH no modificó los niveles de expresión de los principales transportadores de L-gln.

En lo que respecta al análisis de los niveles de expresión de la enzima GS, en la figura 30 se puede observar que FSH reguló negativamente los niveles de ARNm de esta enzima luego de 2 y 4 horas de tratamiento.

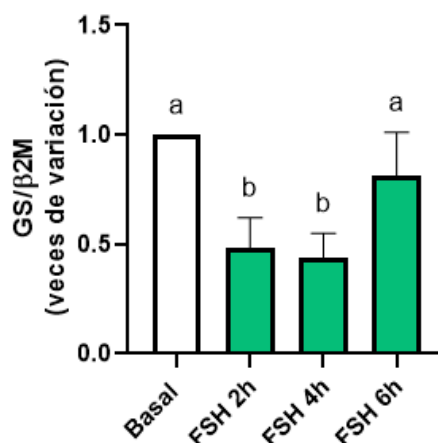


Figura 30. Regulación de los niveles de ARNm de GS por FSH en células de Sertoli inmaduras.

Cultivos de células de Sertoli aisladas de testículos de rata de 8 días de edad fueron mantenidos en medio de cultivo habitual en condiciones basales (Basal) o estimulados con FSH 100 ng/ml durante 2, 4 o 6 horas. Finalizado el período de incubación, se extrajo el ARN total y se determinaron los niveles de ARNm de GS mediante la técnica de RT-qPCR. Los resultados se expresan como veces de variación respecto al valor Basal de la relación ARNm de interés/ARNm de referencia (β 2-Microglobulina - β 2M-) obtenidos de tres experimentos independientes ($\bar{X} \pm DE$, letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas, $p < 0.05$).

En tanto que para las distintas isoformas de la enzima GLS, en la figura 31 se puede observar que FSH no modificó los niveles de ARNm de la isoforma 1, mientras que incrementó los niveles de expresión de la isoforma 2, alcanzándose el máximo estímulo a las 4 horas de tratamiento.

En su conjunto, estos resultados sugieren que, además de la proliferación, la FSH podría regular el metabolismo de L-gln al inhibir la expresión de GS e inducir la de GLS2, escenario compatible con un mayor consumo de L-gln en un contexto proliferativo.

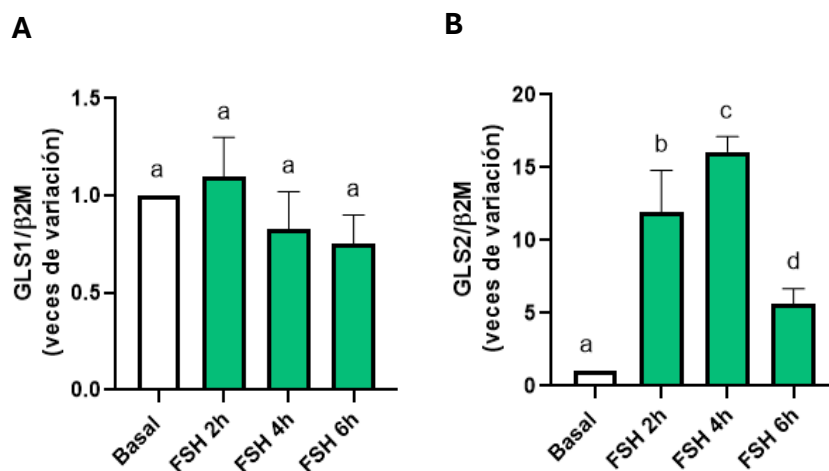


Figura 31. Regulación de los niveles de ARNm de las isoformas de GLS por FSH en células de Sertoli inmaduras.

Cultivos de células de Sertoli aisladas de testículos de rata de 8 días de edad fueron mantenidos en medio de cultivo habitual en condiciones basales (Basal) o estimulados con FSH 100 ng/ml durante 2, 4 o 6 horas. Finalizado el período de incubación, se extrajo el ARN total y se determinaron los niveles de ARNm de GLS1 (**panel A**) y GLS2 (**panel B**) mediante la técnica de RT-qPCR. Los resultados se expresan como veces de variación respecto al valor Basal de la relación ARNm de interés/ARNm de referencia (β 2-Microglobulina - β 2M-) obtenidos de tres experimentos independientes ($X \pm DE$, letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas, $p < 0.05$).

PARTICIPACIÓN DEL AMINOÁCIDO GLUTAMINA EN LA REGULACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN DE LA CÉLULA DE SERTOLI

Para continuar con el estudio, se evaluó si L-gln se comporta como un modulador de la acción mitogénica de la FSH. De esta manera, y considerando los mecanismos mediante los cuales una célula puede disponer de L-gln, se diseñaron dos estrategias experimentales que conducen a la privación de este aminoácido:

1) incubaciones de células de Sertoli inmaduras en medio de cultivo habitual que contienen L-gln (2.5 mM) en ausencia o presencia de γ -glutamyl-p-nitroanilida (GPNA), inhibidor del transporte de L-gln, combinado con estimulación con FSH;

2) incubaciones de células de Sertoli inmaduras en medios de cultivo sin L-gln seguidas de suplementación con L-gln y estimulación con FSH.

En primer lugar, se evaluó el efecto sobre la viabilidad celular y se observó que ni el medio de cultivo sin L-gln ni la presencia de GPNA 1 mM en el medio de cultivo habitual

modificaron la viabilidad de las células de Sertoli tras incubaciones de 24 horas (incubación en medio de cultivo habitual: $94.8 \pm 1.6\%$, GPNA 1 mM: $93.5 \pm 3.0\%$, L-gln 0 mM: $96.2 \pm 2.3\%$ de células viables, expresado como media \pm DE, n = 3, ns vs incubación en medio de cultivo habitual). Por lo tanto, el medio sin L-gln y el GPNA en concentración 1 mM se siguieron utilizando para llevar a cabo el resto de los experimentos.

Las siguientes secciones estarán enfocadas en la descripción del conjunto de los resultados obtenidos en los experimentos realizados para ambas estrategias experimentales planteadas.

Efecto de la privación de glutamina sobre la activación de la vía mTORC1 por FSH en células de Sertoli inmaduras

Sabiendo que la vía mTORC1 es uno de los mecanismos moleculares utilizados por la FSH para modular la progresión del ciclo celular en las células de Sertoli y considerando que se planteó que el metabolismo de L-gln podría actuar como modulador de la proliferación a través de modificaciones que ejercería sobre el mecanismo de activación de mTORC1, se decidió evaluar si L-gln contribuye con la hormona FSH para activar la vía de señalización mTORC1.

Por lo tanto, se evaluó la actividad de la vía de señalización mTORC1 analizando los niveles de P-mTOR y P-p70S6K para cada herramienta experimental planteada. La figura 32 muestra que GPNA inhibió tanto el estímulo de FSH sobre los niveles de P-mTOR (panel A) como sobre los niveles de P-p70S6K (panel B).

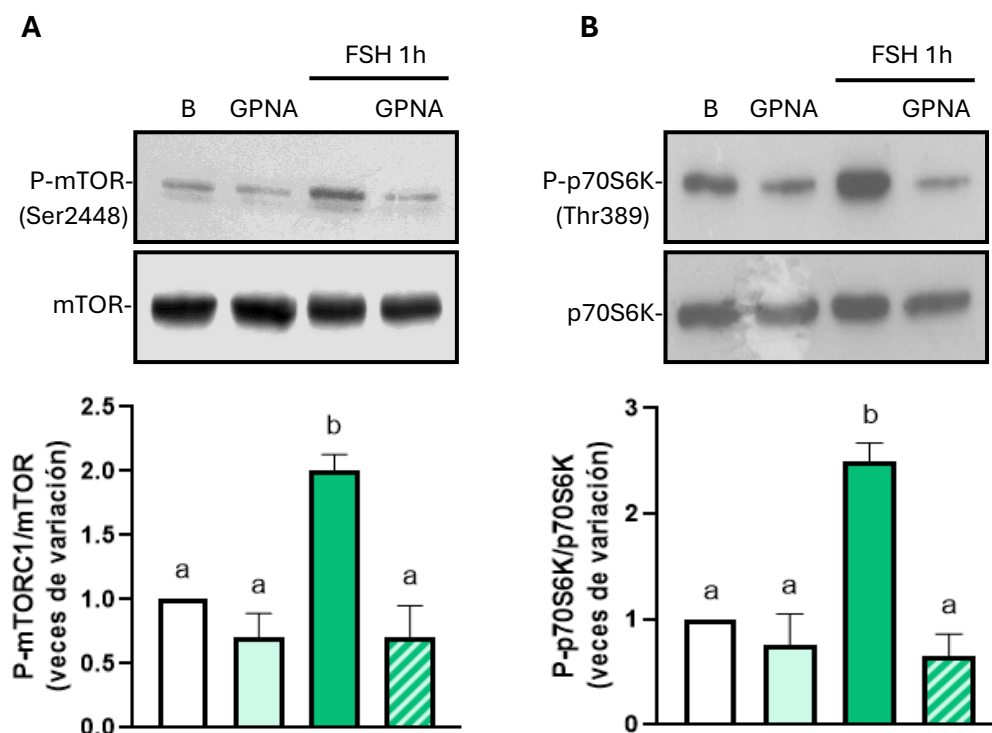


Figura 32. Efecto de GPNA sobre los niveles de fosforilación de mTOR y su sustrato, p70S6K, estimulados por FSH en células de Sertoli inmaduras.

Cultivos de células de Sertoli aisladas de testículos de rata de 8 días de edad fueron mantenidos en medio de cultivo habitual en condiciones basales o estimulados con FSH 100 ng/ml durante 1 hora en ausencia o presencia de GPNA 1 mM. Los extractos celulares fueron utilizados para el análisis mediante Western Blot de P-mTOR y mTOR (**panel A**) y P-p70S6K y p70S6K (**panel B**). En el panel superior (autorradiografías) se muestra un experimento representativo de tres realizados. En el panel inferior (gráficos de barras), los resultados se muestran como veces de variación con respecto al basal (B) de la relación P-mTOR/mTOR (**panel A**) y P-p70S6K/p-70S6K (**panel B**) de tres experimentos independientes ($X \pm DE$; letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas, $p < 0.05$).

En cuanto al efecto de la ausencia de L-gln en la activación de la vía de señalización mTORC1, en la figura 33 se puede observar que FSH solo fue capaz de incrementar los niveles de P-mTOR (panel A) y P-p70S6K (panel B) cuando el estímulo hormonal se realizó en presencia de L-gln.

En su conjunto, estos resultados sugieren que la activación de mTORC1 solo ocurre bajo la presencia coordinada de L-gln y el estímulo de FSH.

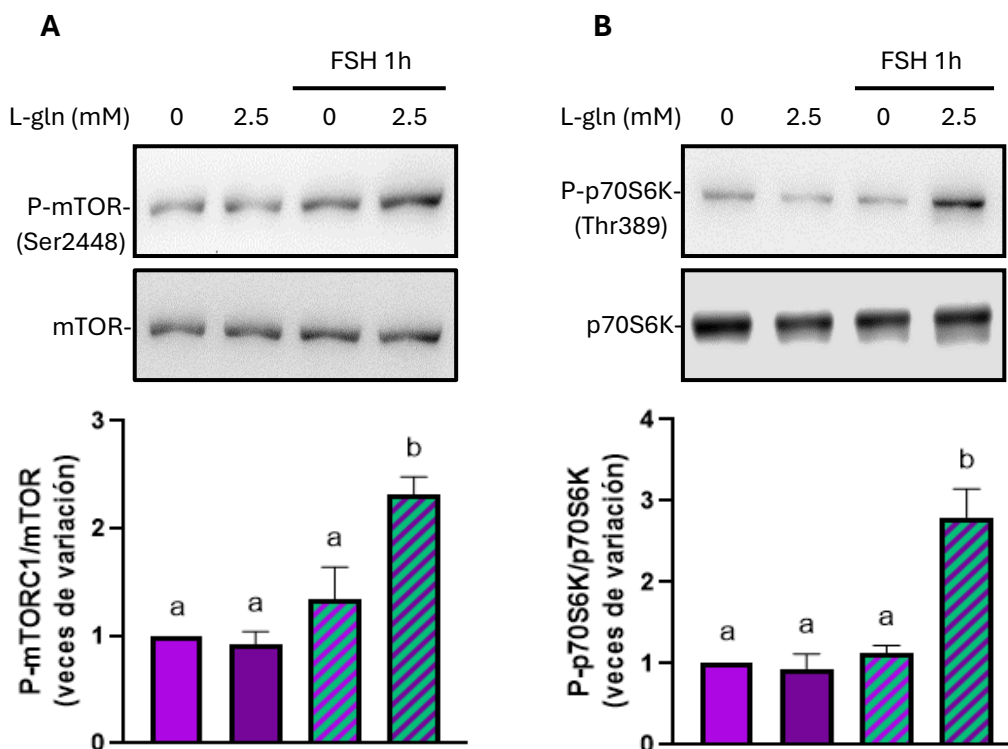


Figura 33. Efecto de la incubación en medio sin L-gln sobre los niveles de fosforilación de mTOR y su sustrato, p70S6K, estimulados por FSH en células de Sertoli inmaduras.

Cultivos de células de Sertoli aisladas de testículos de rata de 8 días de edad se privaron de L-gln mediante incubación en medios de cultivo sin L-gln durante 2 horas y luego se suplementaron con L-gln 2.5 mM o vehículo (0 mM) en ausencia o presencia de estimulación con FSH 100 ng/ml durante 1 hora. Los extractos celulares fueron utilizados para el análisis mediante Western Blot de P-mTOR y mTOR (**panel A**) y P-p70S6K y p70S6K (**panel B**). En el panel superior (autorradiografías) se muestra un experimento representativo de tres realizados. En el panel inferior (gráficos de barras), los resultados se muestran como veces de variación con respecto a L-gln 0 mM de la relación P-mTOR/mTOR (**panel A**) y P-p70S6K/p-70S6K (**panel B**) de tres experimentos independientes ($X \pm DE$; letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas, $p < 0.05$).

Efecto de la privación de glutamina sobre la proliferación de la célula de Sertoli estimulada por FSH

Se continuó el estudio analizando el efecto de la privación de L-gln sobre la regulación de la proliferación de la célula de Sertoli por FSH. Luego de incubar a las células en las condiciones experimentales anteriormente planteadas, se evaluaron diferentes parámetros proliferativos: la actividad transcripcional de c-Myc, los niveles de ARNm de c-Myc, CCND1 y CCND2 y, por último, la incorporación de BrdU y los niveles de antígeno Ki-67 para cada estrategia experimental propuesta.

La figura 34 muestra los resultados obtenidos para el análisis de los niveles de expresión de c-Myc y la actividad transcripcional de este factor bajo la inhibición farmacológica de los transportadores de L-gln con GPNA. Se observa que, mientras que GPNA no afectó el estímulo de FSH sobre los niveles de ARNm de c-Myc (panel A), el inhibidor bloqueó la acción hormonal sobre la actividad transcripcional de dicho factor (panel B).

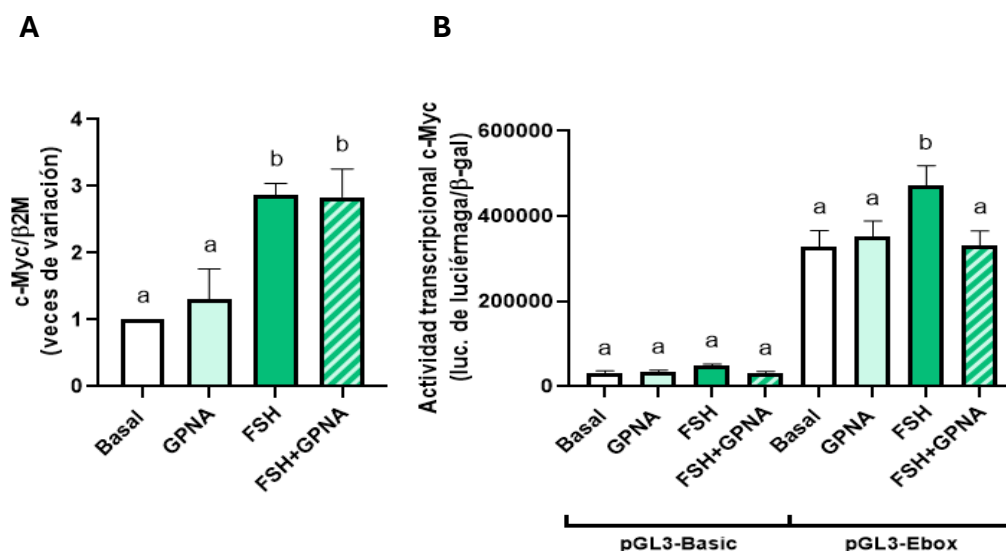


Figura 34. Efecto de GPNA sobre los niveles de ARNm y la actividad transcripcional de c-Myc estimulados por FSH.

Cultivos de células de Sertoli fueron mantenidos en medio de cultivo habitual en condiciones basales o estimulados con FSH 100 ng/ml durante 4 horas en ausencia o presencia de GPNA 1 mM. Finalizado el período de incubación, se extrajo el ARN total y se determinaron los niveles de ARNm de c-Myc mediante la técnica de RT-qPCR. Los resultados se expresan como veces de variación respecto al valor Basal de la relación ARNm de interés/ARNm de referencia (β 2-Microglobulina - β 2M) obtenidos de tres experimentos independientes ($X \pm DE$, letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas, $p < 0.05$) (**panel A**). Las células de Sertoli cotransfectadas transitoriamente con el plásmido pGL3-Ebox o pGL3-Basic en combinación con el plásmido comercial pMIR-REPORT™ β -gal Control fueron mantenidas en medio de cultivo habitual en condiciones basales o estimuladas con FSH 100 ng/ml durante 24 horas en ausencia o presencia de GPNA 1 mM. Las incubaciones se realizaron por triplicado y los resultados se expresan como unidades de luz relativas para la actividad de la luciferasa (luc.) de luciérnaga normalizada a la actividad β -galactosidasa y representan la $X \pm DE$ de un experimento representativo de tres realizados (letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas, $p < 0.05$) (**panel B**).

Los resultados obtenidos para el análisis de los efectos de la incubación en medio sin L-gln sobre los niveles de ARNm del factor de transcripción c-Myc y su actividad se muestran en la figura 35. Se observó que la ausencia de L-gln no afectó el estímulo de FSH

sobre los niveles de ARNm de c-Myc (panel A). Sin embargo, la hormona fue incapaz de incrementar la actividad del factor transcripcional en ausencia del aminoácido (panel B).

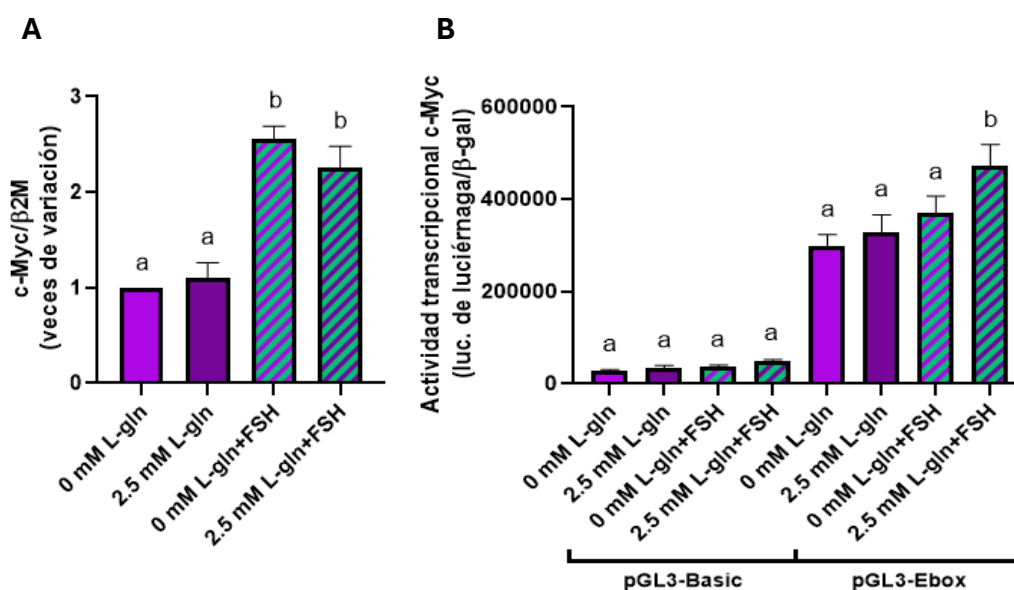


Figura 35. Efecto de la incubación en medio sin L-gln sobre los niveles de ARNm y la actividad transcripcional de c-Myc estimulados por FSH.

Cultivos de células de Sertoli aisladas de testículos de rata de 8 días de edad fueron privados de L-gln mediante incubación en medios de cultivo sin L-gln durante 2 horas y luego se suplementaron con L-gln 2.5 mM o vehículo (0 mM) en ausencia o presencia de estimulación con FSH 100 ng/ml durante 4 horas. Finalizado el período de incubación, se extrajo el ARN total y se determinaron los niveles de ARNm de c-Myc mediante la técnica de RT-qPCR. Los resultados se expresan como veces de variación respecto al valor de 0 mM de L-gln de la relación ARNm de interés/ARNm de referencia (β 2-Microglobulina - β 2M-) obtenidos de tres experimentos independientes ($X \pm DE$, letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas, $p < 0.05$) (**panel A**). Las células de Sertoli aisladas de testículos de rata de 8 días de edad cotransfectadas transitoriamente con el plásmido pGL3-Ebox o pGL3-Basic en combinación con el plásmido comercial pMIR-REPORT™ β -gal Control se privaron de L-gln mediante incubación en medios de cultivo sin L-gln durante 2 horas y luego se suplementaron con L-gln 2.5 mM o vehículo (0 mM) en ausencia o presencia de estimulación con FSH 100 ng/ml durante 24 horas. Las incubaciones se realizaron por triplicado y los resultados se expresan como unidades de luz relativas para la actividad de la luciferasa (luc.) de luciérnaga normalizada a la actividad β -galactosidasa y representan la $X \pm DE$ de un experimento representativo de tres realizados (letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas, $p < 0.05$) (**panel B**).

En la figura 36 se muestran los resultados obtenidos para el análisis de los niveles de ARNm de las ciclinas luego de estimular las células con FSH en ausencia o presencia de GPNA. Se puede observar que la presencia del inhibidor impidió el estímulo de FSH sobre los niveles de ARNm tanto de la CCND1 (panel A) como de la CCND2 (panel B).

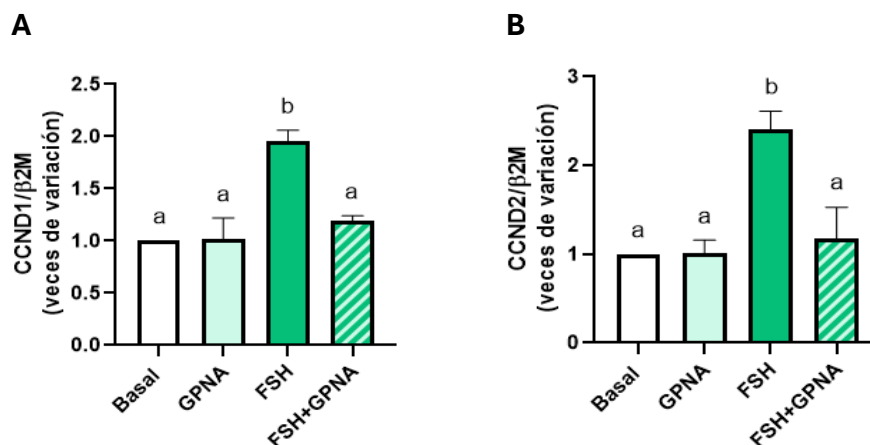


Figura 36. Efecto de GPNA sobre los niveles de ARNm de CCND1 y CCND2 estimulados por FSH en células de Sertoli inmaduras.

Cultivos de células de Sertoli aisladas de testículos de rata de 8 días de edad fueron mantenidos en medio de cultivo habitual en condiciones basales o estimulados con FSH 100 ng/ml durante 2 (**panel A**) o 4 horas (**panel B**) en ausencia o presencia de GPNA 1 mM. Finalizado el período de incubación, se extrajo el ARN total y se determinaron los niveles de ARNm de CCND1 (**panel A**) y CCND2 (**panel B**) mediante la técnica de RT-qPCR. Los resultados se expresan como veces de variación respecto al valor Basal de la relación ARNm de interés/ARNm de referencia ($\beta 2$ -Microglobulina - $\beta 2M$ -) obtenidos de tres experimentos independientes ($X \pm DE$, letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas, $p < 0.05$).

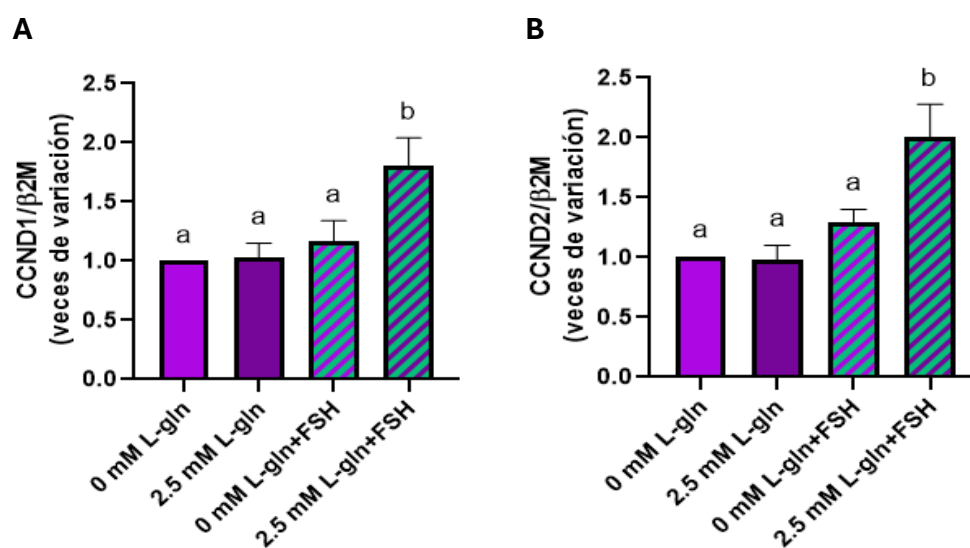


Figura 37. Efecto de la incubación en medio sin L-gln sobre los niveles de ARNm de CCND1 y CCND2 estimulados por FSH en células de Sertoli inmaduras.

Cultivos células de Sertoli aisladas de testículos de rata de 8 días de edad fueron privados de L-gln mediante incubación en medios de cultivo sin L-gln durante 2 horas y luego se suplementaron con L-gln (2.5 mM final) o vehículo (0 mM) en ausencia o presencia de estimulación con FSH (100 ng/ml) durante 2 (**panel A**) o 4 horas (**panel B**). Finalizado el período de incubación, se extrajo el ARN total y se determinaron los niveles de ARNm de CCND1 (**panel A**) y CCND2 (**panel B**) mediante la técnica de RT-qPCR. Los resultados se expresan como veces de variación respecto al valor de 0 mM de L-gln de la relación ARNm de interés/ARNm de referencia ($\beta 2$ -Microglobulina - $\beta 2M$ -) obtenidos de tres experimentos independientes ($X \pm DE$, letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas, $p < 0.05$).

Respecto del análisis de los niveles de expresión de las ciclinas para la segunda estrategia experimental ensayada, la figura 37 muestra que FSH fue capaz de inducir la expresión tanto de los niveles de ARNm de CCND1 (panel A) como de CCND2 (panel B) solo en presencia del aminoácido L-gln.

A continuación, se muestran los resultados correspondientes al análisis de la incorporación de BrdU para ambas estrategias experimentales propuestas. En la figura 38 se observa que el inhibidor GPNA bloqueó la acción de FSH sobre el porcentaje de células que incorporaron BrdU.

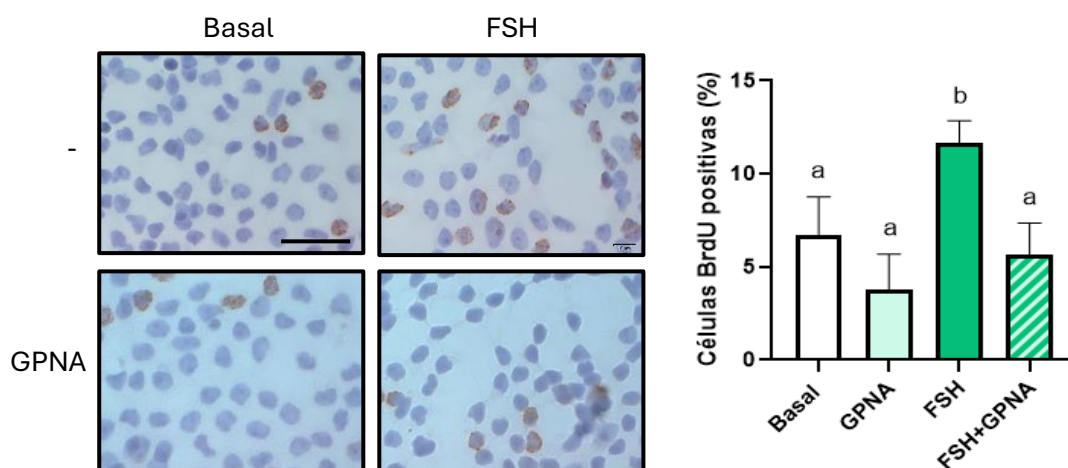


Figura 38. Efecto de GPNA sobre la incorporación de BrdU estimulada por FSH en células de Sertoli inmaduras.

Cultivos de células de Sertoli aisladas de testículos de rata de 8 días de edad fueron mantenidos en medio de cultivo habitual en condiciones basales o estimulados con FSH 100 ng/ml durante 24 horas en ausencia o presencia de GPNA 1 mM. Finalizada la incubación, se procedió a la detección de BrdU por inmunocitoquímica. En el panel izquierdo (microfotografías) se muestra un experimento representativo de cuatro realizados. Barra de escala: 30 µm. En el panel derecho (gráfico de barras), los resultados se expresan como porcentaje de células positivas para BrdU (núcleos marrones) con respecto al total de células (núcleos marrones + núcleos azules), obtenidos de cuatro experimentos independientes ($X \pm DE$, letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas, $p < 0.05$).

Para la privación de L-gln por incubaciones en medios de cultivo sin el aminoácido, se puede observar que la hormona no pudo incrementar el porcentaje de células que incorporaron BrdU en ausencia del aminoácido, como se contempla en la figura 39.

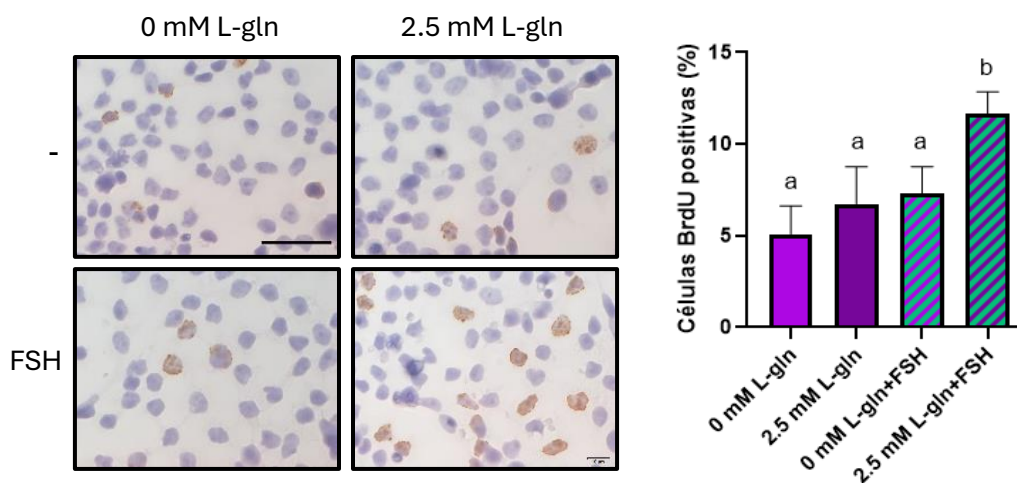


Figura 39. Efecto de la incubación en medio sin L-gln sobre la incorporación de BrdU estimulada por FSH en células de Sertoli inmaduras.

Cultivos de células de Sertoli aisladas de testículos de rata de 8 días de edad fueron privados de L-gln mediante incubación en medios de cultivo sin L-gln durante 2 horas y luego se suplementaron con L-gln 2.5 mM o vehículo (0 mM) en ausencia o presencia de estimulación con FSH 100 ng/ml durante 24 horas. Finalizada la incubación, se procedió a la detección de BrdU por inmunocitoquímica. En el panel izquierdo (microfotografías) se muestra un experimento representativo de cuatro realizados. Barra de escala: 30 μ m. En el panel derecho (gráfico de barras), los resultados se expresan como porcentaje de células positivas para BrdU (núcleos marrones) con respecto al total de células (núcleos marrones + núcleos azules), obtenidos de cuatro experimentos independientes ($X \pm DE$, letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas, $p < 0.05$).

Finalmente, en las figuras 40 y 41 se muestran los resultados obtenidos para la detección de los niveles de antígeno Ki-67. Se evidencia, en concordancia con observaciones anteriores, que FSH fue incapaz de promover un incremento del número de células de Sertoli que expresan Ki-67 en presencia del inhibidor GPNA (figura 40). Así mismo, se puede observar que FSH fue incapaz de promover un incremento del número de células de Sertoli que expresan el antígeno en ausencia de L-gln (figura 41).

Se puede decir, entonces, que tras la implementación de estas dos estrategias experimentales se ha demostrado que la presencia de L-gln sería un requisito esencial para el efecto mitogénico de la hormona FSH en las células de Sertoli inmaduras.

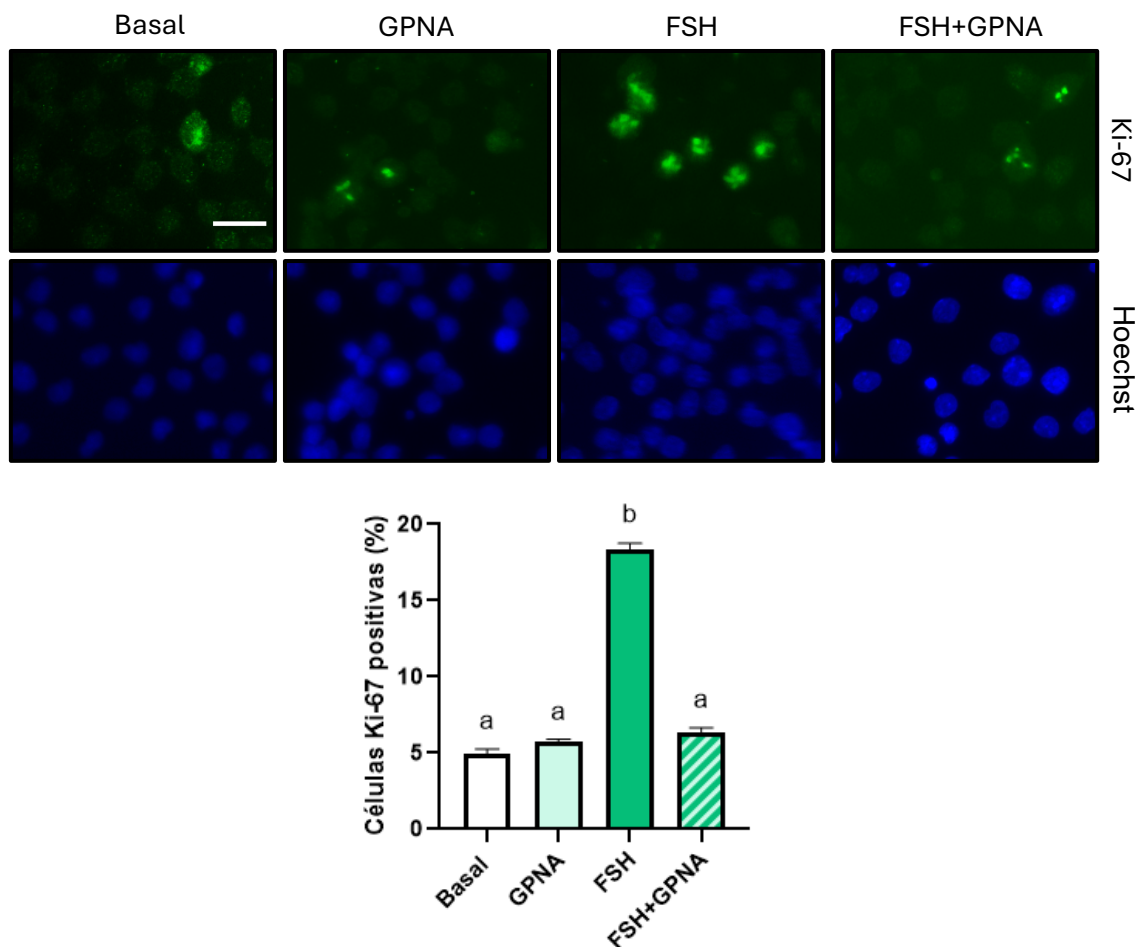


Figura 40. Efecto de GPNA sobre la expresión del antígeno Ki-67 estimulada por FSH en células de Sertoli inmaduras.

Cultivos de células de Sertoli aisladas de testículos de rata de 8 días de edad fueron mantenidos en medio de cultivo habitual en condiciones basales o estimulados con FSH 100 ng/ml durante 24 horas en ausencia o presencia de GPNA 1 mM. Finalizada la incubación, se procedió a la detección del antígeno Ki-67 por inmunofluorescencia. En el panel superior (microfotografías) se muestra un experimento representativo de cuatro realizados. Barra de escala: 20 μ m. En el panel inferior (gráfico de barras), los resultados se expresan como porcentaje de células positivas para Ki-67 (verde) con respecto al total de células (azul), obtenidos de cuatro experimentos independientes ($X \pm DE$, letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas, $p < 0.05$).

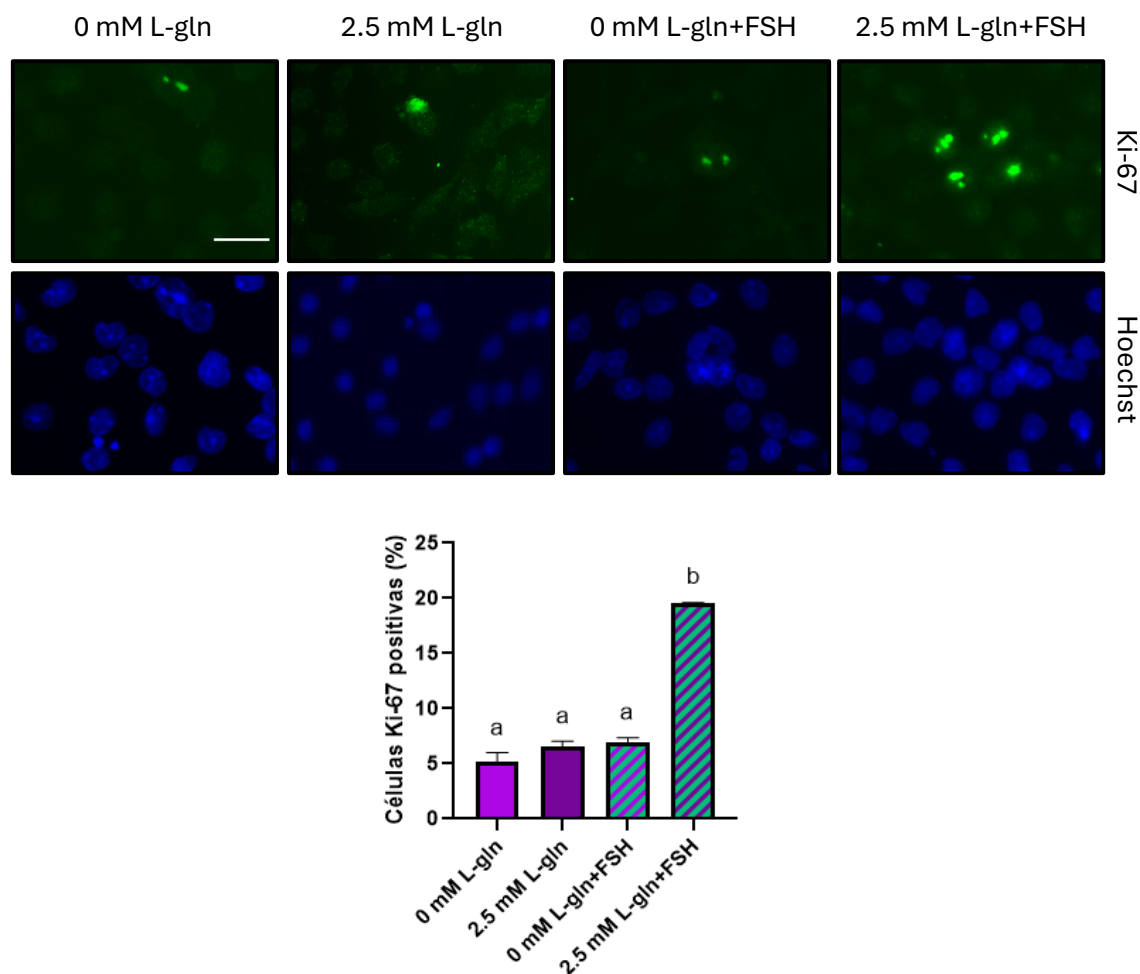


Figura 41. Efecto de la incubación en medio sin L-gln sobre la expresión del antígeno Ki-67 estimulada por FSH en células de Sertoli inmaduras.

Cultivos de células de Sertoli aisladas de testículos de rata de 8 días de edad fueron privados de L-gln mediante incubación en medios de cultivo sin L-gln durante 2 horas y luego se suplementaron con L-gln 2.5 mM o vehículo (0 mM) en ausencia o presencia de estimulación con FSH 100 ng/ml durante 24 horas. Finalizada la incubación, se procedió a la detección del antígeno Ki-67 por inmunofluorescencia. En el panel superior (microfotografías) se muestra un experimento representativo de cuatro realizados. Barra de escala: 20 μ m. En el panel inferior (gráfico de barras), los resultados se expresan como porcentaje de células positivas para Ki-67 (verde) con respecto al total de células (azul), obtenidos de cuatro experimentos independientes ($X \pm DE$, letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas, $p < 0.05$).

PARTICIPACIÓN DE LA GLUTAMINÓLISIS EN LA REGULACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN DE LA CÉLULA DE SERTOLI

Dados los resultados obtenidos en los que se muestran, por un lado, que FSH incrementa la expresión de GLS y, por otro, que la privación de L-gln bloquea el estímulo de

FSH sobre la proliferación, nos propusimos evaluar si algún metabolito derivado de la glutaminólisis podría ser el mediador de dicho efecto.

Efecto de la inhibición de la glutaminólisis sobre la activación de la vía mTORC1 por FSH en células de Sertoli inmaduras

Con el fin de evaluar el rol que juega la glutaminólisis en la regulación de la proliferación de células de Sertoli por FSH, se empleó un inhibidor farmacológico de la actividad GLS, 6-Diazo-5-oxo-L-norleucina (DON). Se realizaron cultivos primarios de células de Sertoli, los cuales fueron mantenidos en condiciones basales o estimulados con FSH en ausencia o presencia de DON 500 μ M. En primera instancia, se analizó el efecto de DON sobre la viabilidad celular y se observó que la presencia del inhibidor a la concentración utilizada no modificó la viabilidad de las células de Sertoli después de incubaciones de 24 horas ($93.6 \pm 1.2\%$, DON 500 μ M: $93.5 \pm 3.0\%$ de células viables, expresado como media \pm DE, n = 3, ns vs basal). Por lo tanto, la concentración de 500 μ M fue la elegida para llevar a cabo el resto de los experimentos.

A continuación, se llevaron a cabo experimentos para explorar si el metabolismo de L-gln está involucrado en la activación de mTORC1 por FSH. En la figura 42 se muestran los resultados obtenidos para el análisis de los niveles de fosforilación de mTOR y su sustrato, p70S6K, en condiciones de inhibición de la actividad de GLS con DON. Se observa que DON fue capaz de inhibir la estimulación de FSH sobre los niveles de P-mTOR (panel A) y los de P-p70S6K (panel B). Estos resultados sugieren que FSH requiere un metabolismo activo de L-gln para activar la vía mTORC1 en células de Sertoli en proliferación.

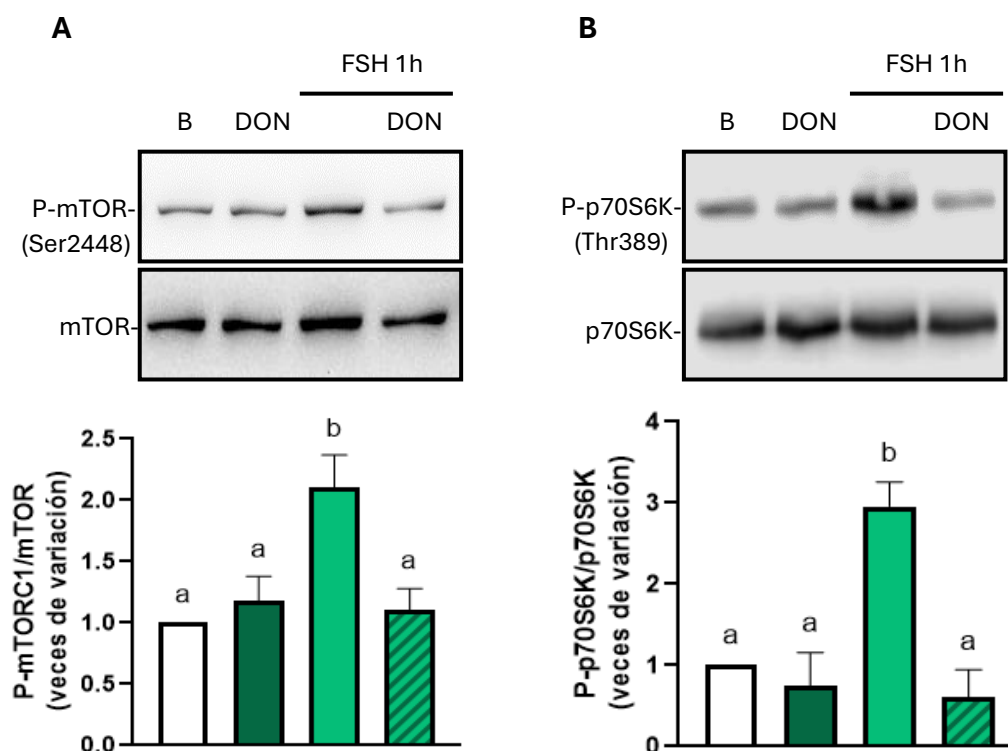


Figura 42. Efecto de DON sobre los niveles de fosforilación de mTOR y su sustrato, p70S6K, estimulados por FSH en células de Sertoli inmaduras.

Cultivos de células de Sertoli aisladas de testículos de rata de 8 días de edad fueron mantenidos en medio de cultivo habitual en condiciones basales o estimulados con FSH 100 ng/ml durante 1 hora en ausencia o presencia de DON 500 μ M. Los extractos celulares fueron utilizados para el análisis mediante Western Blot de P-mTOR y mTOR (**panel A**) y P-p70S6K y p70S6K (**panel B**). En el panel superior (autorradiografías) se muestra un experimento representativo de tres. En el panel inferior (gráficos de barras), los resultados se muestran como veces de variación con respecto al basal (B) de la relación P-mTOR/mTOR (**panel A**) y P-p70S6K/p-70S6K (**panel B**) de tres experimentos independientes ($X \pm DE$; letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas, $p < 0.05$).

Efecto de la inhibición de la glutaminólisis sobre la proliferación de la célula de Sertoli estimulada por FSH

El siguiente grupo de experimentos se llevó a cabo para evaluar el efecto de DON sobre la proliferación de la célula de Sertoli, con el objetivo de dilucidar si la inhibición de la proliferación observada en resultados anteriores en condiciones de privación de L-gln podría ser consecuencia de la ausencia de un metabolito derivado de la metabolización de la L-gln. Para tal fin, las células de Sertoli inmaduras fueron cultivadas en condiciones basales o estimuladas con FSH en ausencia o presencia de DON, y, finalizadas las incubaciones, se procedió a evaluar los siguientes parámetros proliferativos: los niveles de

ARNm del factor de transcripción c-Myc y su actividad transcripcional, los niveles de expresión de CCND1 y CCND2, la incorporación de BrdU y, por último, los niveles de antígeno Ki-67.

La figura 43 muestra que el efecto de la FSH sobre la actividad transcripcional de c-Myc fue inhibido por DON (panel B). Sin embargo, el inhibidor no fue capaz de bloquear la acción de la FSH sobre los niveles de expresión de ARNm de c-Myc (panel A).

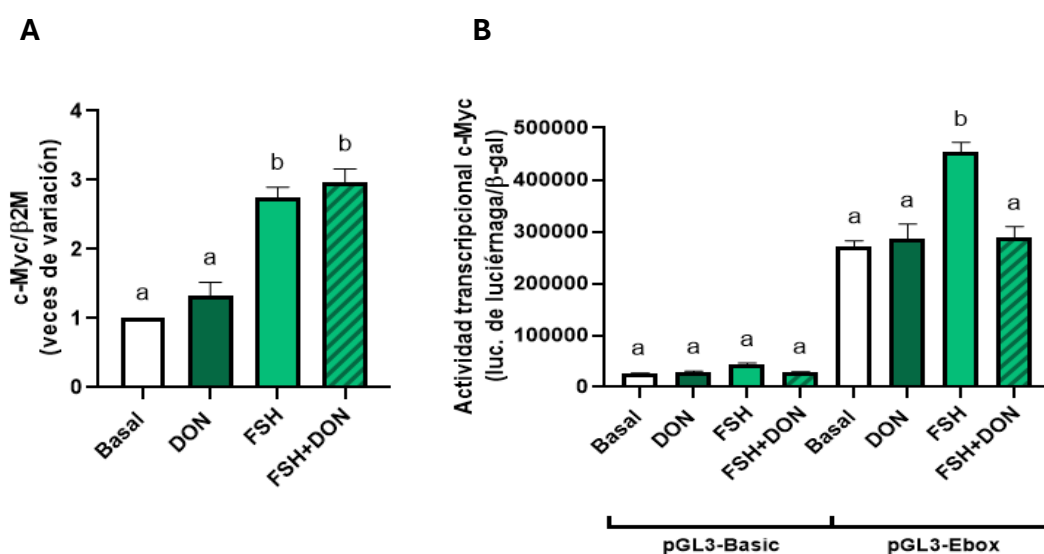


Figura 43. Efecto de DON sobre los niveles de ARNm y la actividad transcripcional de c-Myc estimulados por FSH.

Cultivos de células de Sertoli fueron mantenidos en medio de cultivo habitual en condiciones basales o estimulados con FSH 100 ng/ml durante 4 horas en ausencia o presencia de DON 500 μM. Finalizado el período de incubación, se extrajo el ARN total y se determinaron los niveles de ARNm de c-Myc mediante la técnica de RT-qPCR. Los resultados se expresan como veces de variación respecto al valor Basal de la relación ARNm de interés/ARNm de referencia (β2-Microglobulina -β2M) obtenidos de tres experimentos independientes (X±DE, letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas, p<0.05) (**panel A**). Las células de Sertoli cotransfectadas transitoriamente con el plásmido pGL3-Ebox o pGL3-Basic en combinación con el plásmido comercial pMIR-REPORT™ β-gal Control fueron mantenidas en medio de cultivo habitual en condiciones basales o estimuladas con FSH 100 ng/ml durante 24 horas en ausencia o presencia de DON 500 μM. Las incubaciones se realizaron por triplicado y los resultados se expresan como unidades de luz relativas para la actividad de la luciferasa (luc.) de luciérnaga normalizada a la actividad β-galactosidasa y representan la X±DE de un experimento representativo de tres realizados (letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas, p<0.05) (**panel B**).

En lo que respecta al análisis de la expresión de las ciclinas, en la figura 44 se observa que la presencia de DON inhibió el estímulo hormonal de la FSH tanto sobre los niveles de ARNm de CCND1 (panel A) como de CCND2 (panel B).

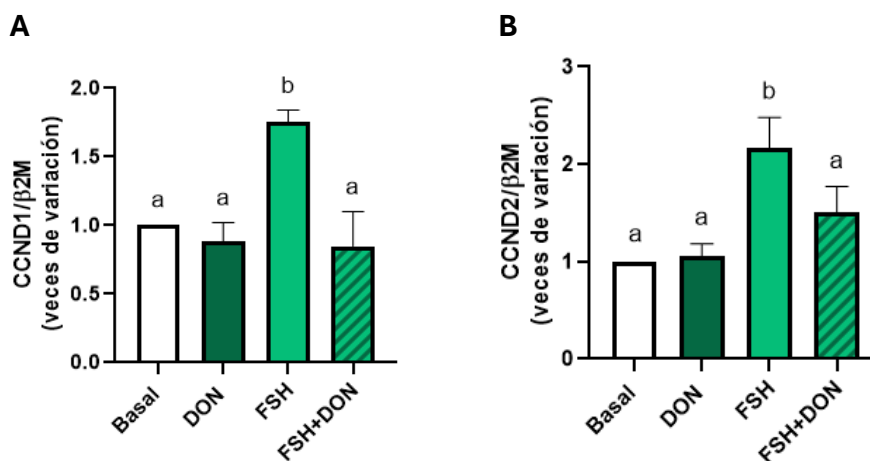


Figura 44. Efecto de DON sobre los niveles de ARNm de CCND1 y CCND2 estimulados por FSH en células de Sertoli inmaduras.

Cultivos de células de Sertoli aisladas de testículos de rata de 8 días de edad fueron mantenidos en medio de cultivo habitual en condiciones basales o estimulados con FSH 100 ng/ml durante 2 (**panel A**) o 4 horas (**panel B**) en ausencia o presencia de DON 500 μ M. Finalizado el período de incubación, se extrajo el ARN total y se determinaron los niveles de ARNm de CCND1 (**panel A**) y CCND2 (**panel B**) mediante la técnica de RT-qPCR. Los resultados se expresan como veces de variación respecto al valor Basal de la relación ARNm de interés/ARNm de referencia (β 2-Microglobulina - β 2M-) obtenidos de tres experimentos independientes ($X \pm DE$, letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas, $p < 0.05$).

Los resultados correspondientes al análisis de la incorporación de BrdU se muestran en la figura 45. Como se puede observar en la misma, FSH no pudo promover la incorporación de BrdU en células de Sertoli inmaduras cuando se inhibió la actividad de GLS.

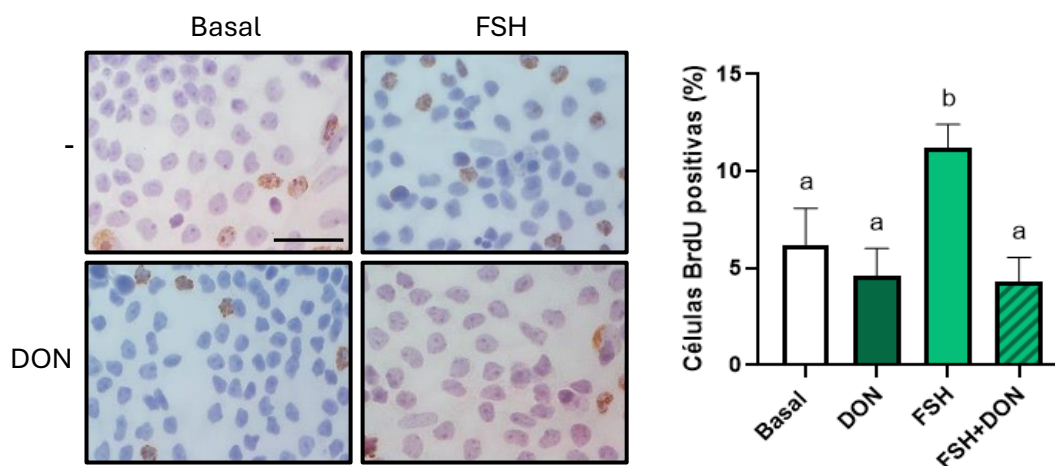


Figura 45. Efecto de DON sobre la incorporación de BrdU estimulada por FSH en células de Sertoli inmaduras.

Cultivos de células de Sertoli aisladas de testículos de rata de 8 días de edad fueron mantenidos en medio de cultivo habitual en condiciones basales o estimulados con FSH 100 ng/ml durante 24 horas en ausencia o presencia de DON 500 μ M. Finalizada la incubación, se procedió a la detección de BrdU por inmunocitoquímica. En el panel izquierdo (microfotografías) se muestra un experimento representativo de cuatro realizados. Barra de escala: 30 μ m. En el panel derecho (gráfico de barras), los resultados se expresan como porcentaje de células positivas para BrdU (núcleos marrones) con respecto al total de células (núcleos marrones + núcleos azules), obtenidos de cuatro experimentos independientes ($X \pm DE$, letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas, $p < 0.05$).

La figura 46 muestra los resultados obtenidos para la detección de los niveles de antígeno Ki-67. Se evidencia que FSH fue incapaz de promover un incremento del número de células de Sertoli que expresan Ki-67 en presencia del inhibidor DON.

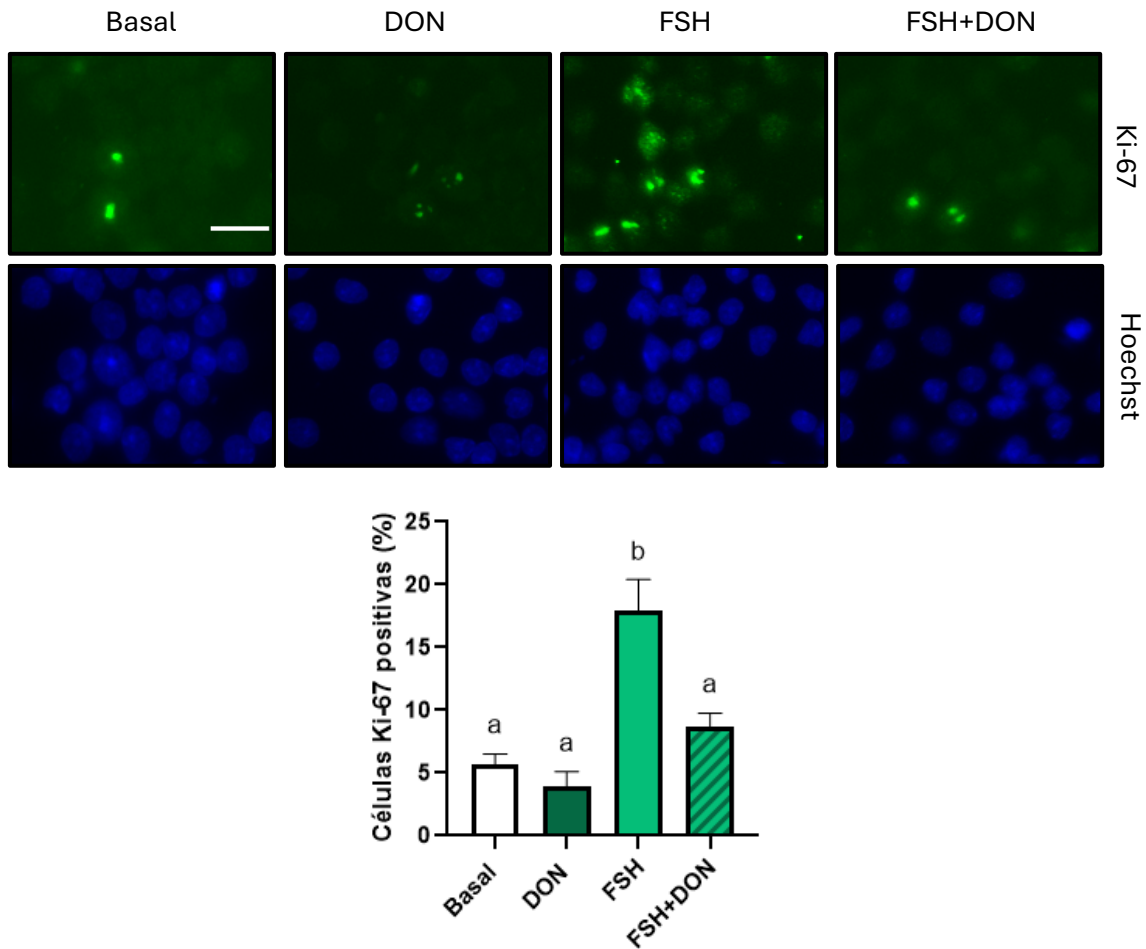


Figura 46. Efecto de DON sobre la expresión del antígeno Ki-67 estimulada por FSH en células de Sertoli inmaduras.

Cultivos de células de Sertoli aisladas de testículos de rata de 8 días de edad fueron mantenidos en medio de cultivo habitual en condiciones basales o estimulados con FSH 100 ng/ml durante 24 horas en ausencia o presencia de DON 500 μ M. Finalizada la incubación, se procedió a la detección del antígeno Ki-67 por inmunofluorescencia. En el panel superior (microfotografías) se muestra un experimento representativo de cuatro realizados. Barra de escala: 20 μ m. En el panel inferior (gráfico de barras), los resultados se expresan como porcentaje de células positivas para Ki-67 (verde) con respecto al total de células (azul), obtenidos de cuatro experimentos independientes ($X \pm DE$, letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas, $p < 0.05$).

En su conjunto, este set de resultados destaca la relevancia de la actividad de GLS en la regulación de la progresión del ciclo celular y la proliferación de células de Sertoli por la FSH. En otras palabras, se podría suponer que la glutaminólisis presenta un rol destacado en la acción mitogénica de la hormona FSH sobre las células de Sertoli.

PARTICIPACIÓN DEL α -CETOGLUTARATO EN LA REGULACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN DE LA CÉLULA DE SERTOLI

Habiendo demostrado que en las células de Sertoli inmaduras la glutaminólisis es necesaria para que la FSH ejerza su efecto mitogénico, se continuó evaluando el posible mecanismo molecular subyacente.

Regulación de la vía mTORC1 en células de Sertoli inmaduras por α -cetogluturato

Teniendo presente que el α -KG —producto final de la glutaminólisis— contribuye a la activación de mTORC1 en otros tipos celulares, se evaluó si el cetoácido sería capaz de regular la vía de señalización de mTORC1 en células de Sertoli inmaduras. Para ello, cultivos de células de Sertoli fueron mantenidos en condiciones basales o en presencia de α -KG 200 μ M durante distintos períodos de tiempo. Finalizadas las incubaciones, se analizaron los niveles de P-mTOR y P-p70S6K. Los resultados preliminares obtenidos se muestran en la figura 47, en la cual se observa que el α -KG tendería a incrementar los niveles de fosforilación de ambas proteínas ensayadas (paneles A y B).

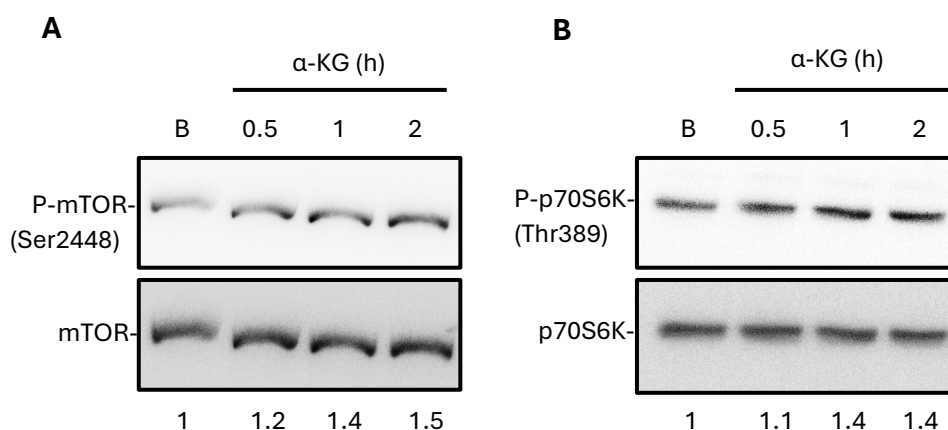


Figura 47. Efecto del α -KG sobre los niveles de fosforilación de mTOR y su sustrato, p70S6K, en células de Sertoli inmaduras.

Cultivos de células de Sertoli aisladas de testículos de rata de 8 días de edad fueron mantenidos en condiciones basales (B) o en presencia de α -cetogluturato (α -KG) 200 μ M durante 0.5, 1 o 2 horas. Los extractos celulares fueron utilizados para el análisis mediante Western Blot de P-mTOR y mTOR (**panel A**) y P-p70S6K y p70S6K (**panel B**). Los números debajo de cada calle indican las veces de variación con respecto al basal (B) de la relación P-mTOR/mTOR (**panel A**) y P-p70S6K/p-70S6K (**panel B**).

Estos resultados darían indicios de que el α -KG podría estar cooperando en la activación de la vía de señalización mTORC1 en células de Sertoli que proliferan.

Regulación de la proliferación de la célula de Sertoli por α -cetoglutarato

Para continuar los estudios sobre el rol que desempeña el producto final de la glutaminólisis sobre la regulación de la proliferación, cultivos de células de Sertoli fueron mantenidos en condiciones basales o en presencia de α -KG 200 μ M durante 24 horas y se analizó la incorporación de BrdU y los niveles de antígeno Ki-67 en las células de Sertoli inmaduras.

Los resultados preliminares correspondientes al análisis de dichos parámetros proliferativos se pueden observar en las figuras 48 y 49. En lo que respecta al análisis de la incorporación de la BrdU, se observó que el α -KG sería capaz de aumentar los niveles de incorporación de dicho análogo (Basal: 6.05%; α -KG: 8.66% de células BrdU positivas) (figura 48). Por otro lado, a partir del análisis de la marcación del antígeno Ki-67, se observó que el α -KG sería capaz de incrementar el número de células de Sertoli positivas para dicho antígeno (Basal: 5.10%; α -KG: 7.14% de células Ki-67 positivas) (figura 49).

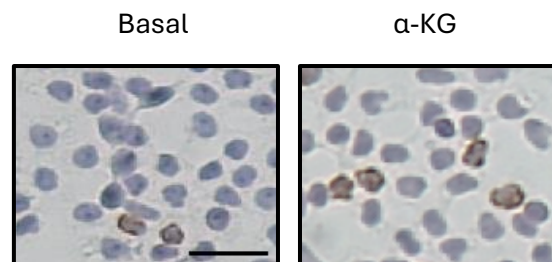


Figura 48. Efecto del α -KG sobre la incorporación de BrdU en células de Sertoli inmaduras.

Cultivos de células de Sertoli aisladas de testículos de rata de 8 días de edad fueron incubados en presencia de BrdU y mantenidos en condiciones basales (Basal) o en presencia de α -cetoglutarato (α -KG) 200 μ M durante 24 horas. Finalizada la incubación, se procedió a la detección de BrdU por inmunocitoquímica. Se muestran las microfotografías obtenidas (el color marrón de los núcleos indica reacción positiva para BrdU). Barra de escala: 30 μ m.

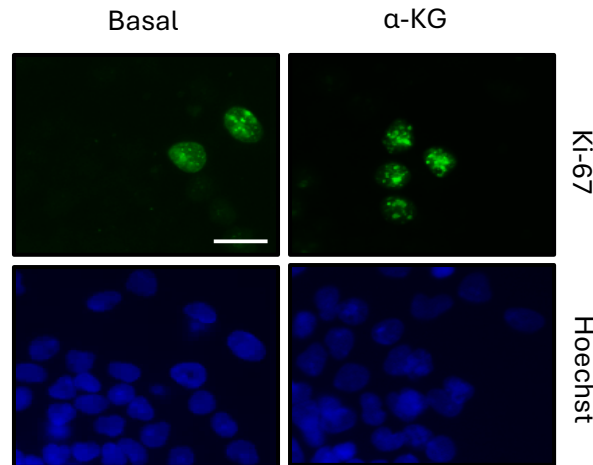


Figura 49. Efecto del α -KG sobre la expresión del antígeno Ki-67 en células de Sertoli inmaduras. Cultivos de células de Sertoli aisladas de testículos de rata de 8 días de edad fueron mantenidos en condiciones basales (Basal) o en presencia de α -cetoglutarato (α -KG) 200 μ M durante 24 horas. Finalizada la incubación, se procedió a la detección del antígeno Ki-67 por inmunofluorescencia. Se muestran las microfotografías obtenidas (el color verde indica inmunorreactividad para Ki-67). Barra de escala: 20 μ m.

Estos resultados dan indicio de que el α -KG podría participar en la regulación de la proliferación de células de Sertoli. En otras palabras, el cetoácido podría ser el metabolito mediador de la contribución de la glutaminólisis a la regulación de la proliferación de células de Sertoli por FSH. Sin embargo, más estudios serán necesarios para corroborar esta hipótesis.

En conjunto, los resultados aquí presentados sugieren que la L-gln y/o sus metabolitos derivados de la glutaminólisis, en particular el α -KG, podrían cooperar con la FSH para regular la proliferación de células de Sertoli mediante la activación de mTORC1. Además, dado que la FSH regula positivamente la glutaminólisis, el control hormonal de esta vía metabólica podría formar parte de la compleja red de señalización que desencadena la FSH para modular la progresión del ciclo celular, asegurando así la proliferación de este tipo celular (figura 50).

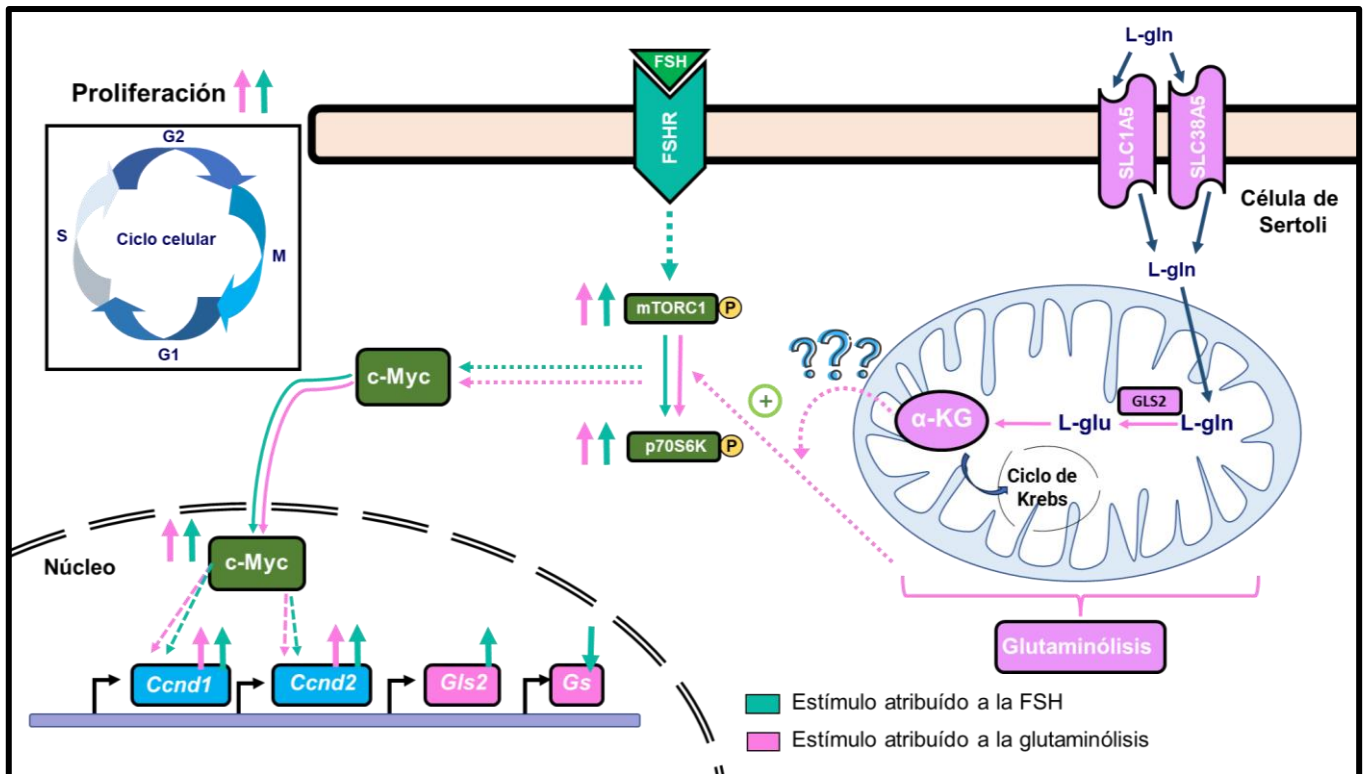


Figura 50. Esquema de la cooperación entre el metabolismo de la L-gln y la regulación de la proliferación de células de Sertoli mediada por la FSH a través de la vía de señalización mTORC1. La FSH regula positivamente la proliferación de forma dependiente de mTORC1, induciendo la expresión de *Ccnd1* y *Ccnd2* mediante una mayor actividad transcripcional de c-Myc (vía verde). Simultáneamente, la FSH promueve la metabolización del aminoácido en cuestión al inducir la expresión del gen *Gls2* y reprimir la del gen *Gs*. Un mayor metabolismo de la L-gln promovido por la FSH podría cooperar con esta hormona en la activación de la vía de señalización mTORC1, al menos en parte, a través del metabolito α -KG, producto de la glutaminólisis (vía rosa).

DISCUSIÓN

Las células de Sertoli representan una de las células más complejas del organismo, no solo por su estructura ramificada, sino también por su capacidad de crear un entorno único que permite el desarrollo de las células germinales. De aquí se desprende la expresión "células nodrizas", ampliamente utilizada para referirse a este tipo celular. Las células de Sertoli crean un revestimiento completo dentro de las paredes tubulares que envuelven las células espermatogénicas. A su vez, este tipo celular, en virtud de la formación de uniones estrechas entre células vecinas, constituye el componente principal de la barrera hemato-testicular (BHT). Por otro lado, existe una fuerte correlación entre el número total de células de Sertoli y la producción diaria de espermatozoides en varias especies (Johnson y col., 1984; Berndtson y col., 1987; Griswold, 1995), la cual se explica porque cada célula de Sertoli es capaz de mantener un número limitado de células germinales (Orth, 1984). Más recientemente, se ha demostrado que el número final de células de Leydig también depende de la población de células de Sertoli presente en el adulto (Rebourcet y col., 2017). Por lo tanto, el desarrollo adecuado de la población de células de Sertoli, en cuanto a su número y funcionalidad, determinará la capacidad espermatogénica del individuo.

Solo las células de Sertoli inmaduras proliferan y, aunque existen diferencias entre especies en cuanto a los períodos predominantes de actividad mitótica, se acepta generalmente que la proliferación se detiene en la pubertad en la mayoría de las especies (Sharpe y col., 2003). Por lo tanto, la regulación de la proliferación de las células de Sertoli —que determina el número final de este tipo celular— y el cese de la proliferación concomitante con la maduración —que establece una función celular adecuada— constituyen la base de la función testicular adulta y ocurren en la vida fetal y en las primeras etapas de la vida posnatal. De aquí se desprende la importancia de descifrar los factores que regulan la proliferación de las células de Sertoli, así como también los mecanismos involucrados en dicho proceso. Es bien sabido que la proliferación de este tipo celular se

encuentra fundamentalmente bajo el control de FSH. Si bien durante años se ha simplificado la explicación del mecanismo molecular por el cual FSH ejerce sus acciones biológicas a través de la vía de señalización AMPc/PKA, dicha hormona induce la activación de diversas vías, las cuales modulan la gran diversidad de efectos biológicos controlados por la gonadotropina. En consecuencia, y debido a la intrincada red de señalización que genera, algunos de los mecanismos moleculares involucrados en la regulación de la proliferación de las células de Sertoli por FSH aún se desconocen. No obstante, se ha demostrado que la FSH regula positivamente la proliferación de células de Sertoli activando las vías dependientes de cAMP/PKA/ERK1/2 (Griswold y col., 1975; Orth, 1984; Crépieux y col., 2001) y PI3K/Akt/mTORC1 (Riera y col., 2012) y aumentando la actividad transcripcional de c-Myc, los factores inducidos por hipoxia (HIF) y la expresión de CCND1 y CCND2 (Gorga y col., 2018).

A lo largo de la introducción se ha hecho hincapié en el concepto de que en términos bioenergéticos la proliferación celular es un proceso biológico extremadamente exigente ya que, para satisfacer las altas demandas de nutrientes —como glucosa y aminoácidos— necesarias para sostener las vías biosintéticas que acompañan el crecimiento (aumento de biomasa) y la división celular (aumento del número de células), las células en proliferación llevan adelante una reorganización de su metabolismo. Entre los cambios metabólicos asociados a la progresión del ciclo celular se destacan la glucólisis aeróbica y el metabolismo de la glutamina.

En este contexto, el presente trabajo de tesis tuvo como objetivo general ahondar en el estudio de los mecanismos moleculares utilizados por FSH para regular la proliferación en la célula de Sertoli, y a su vez evaluar cómo el metabolismo influencia la acción hormonal para regular el ciclo celular. En particular, pretendió analizar, por un lado, la regulación de la glucólisis y la glutaminólisis por la hormona trófica y, por otro, la

participación de dichas vías metabólicas en la regulación por FSH de la proliferación de la célula de Sertoli.

El primer conjunto de experimentos fue diseñado para estudiar la regulación hormonal de la glucólisis en la célula de Sertoli inmadura y a su vez la participación de esta vía metabólica en la regulación de la proliferación por FSH. Cabe mencionar que nuestro laboratorio estuvo abocado durante décadas al estudio de la regulación hormonal de la producción de lactato —producto final de la glucólisis— en células de Sertoli maduras, debido a que el hidroxiaácido es la fuente energética principal de las células germinales que han transpuesto la BHT (Riera y col., 2001; Galardo y col., 2007; Riera y col., 2007; Galardo y col., 2010; Regueira y col., 2014; Regueira y col., 2015; Galardo y col., 2017; Gorga y col., 2017). Sin embargo, hasta el momento de iniciar el desarrollo de este proyecto, eran escasos los estudios metabólicos en células de Sertoli inmaduras. Los primeros estudios metabólicos llevados a cabo en nuestro laboratorio en células de Sertoli inmaduras arrojaron resultados llamativos: la hormona FSH incrementó la capacidad de entrada de glucosa a la célula, indujo la expresión del transportador de glucosa GLUT1 y aumentó los niveles de lactato (Galardo y col., 2008). Este hallazgo, que representaba un aumento del flujo glucolítico bajo estímulo hormonal, despertó la curiosidad en nuestro grupo debido a que en el testículo de ratas de 8 días de edad la BHT aún no está establecida, por lo que no existen células germinales aisladas de la circulación sistémica que requieran lactato. Considerando que las células de Sertoli inmaduras proliferan —a diferencia de aquellas que poseen fenotipo maduro— fue a partir de este momento que surgió el interrogante si el metabolismo glucolítico no estaría relacionado con la progresión del ciclo celular. Precisamente, el premio nobel Otto Warburg describió el comportamiento metabólico de células tumorales que presentan una alta tasa proliferativa: las células tumorales presentan un mayor consumo de glucosa en comparación con células normales que no proliferan, y en lugar de oxidar completamente el azúcar a través del ciclo de Krebs/cadena

respiratoria mitocondrial y producir ATP por fosforilación oxidativa, el piruvato es reducido a lactato independientemente de la presencia de oxígeno (Warburg y col., 1927). Este fenómeno metabólico hoy en día es conocido como glucólisis aeróbica o, en honor de su descubridor, efecto Warburg (término propuesto por Efraim Racker en 1972). En este punto cabe destacar que, si bien se afirma que la glucólisis aeróbica es una propiedad distintiva de las células tumorales, los cambios metabólicos necesarios para mantener la proliferación no son exclusivos de la malignidad, ya que también ocurren en las células normales (Agathocleous y Harris, 2013). En este contexto, no sería ilógico pensar en la existencia de una regulación hormonal simultánea de la proliferación celular y de las vías metabólicas necesarias para sostener dicho proceso que converja en una misma señal de transducción. En este sentido, ya teniendo evidencias que la FSH es capaz de regular la glucólisis en células de Sertoli inmaduras (aumento de los niveles de lactato extracelular y entrada de glucosa a la célula bajo influencia hormonal, parámetros que se destacan para monitorear el flujo glucolítico —TeSlaa y Teitell, 2014—), en este trabajo de tesis, el estudio de la regulación hormonal del flujo glucolítico se profundizó evaluando la regulación de la expresión de enzimas clave de la glucólisis. Más precisamente, se analizó la expresión de las isoenzimas PFKFB, PKM2 y las subunidades de LDH, responsables de controlar la tasa de flujo glucolítico.

Con respecto a la PFKFB, sus isoenzimas poseen ciertas diferencias en cuanto a la relación de sus actividades enzimáticas quinasa/fosfatasa (Rider y col., 2004): mientras que PFKFB1 y PFKFB2 presentan actividades quinasa y fosfatasa similares, PFKFB3 posee una actividad quinasa mucho más elevada que la de fosfatasa, por lo que en su presencia se favorece la formación de Fru-2,6-P₂, efector alostérico positivo de PFK1 (Sakakibara y col., 1997; Ros y Schulze, 2013). En este contexto, se ha demostrado que la regulación positiva de la expresión de PFKFB3 se traduce en un incremento en el flujo glucolítico evidenciado por mayores niveles de lactato en diferentes tipos de células (Marsin y col.,

2002; Atsumi y col., 2005; Ando y col., 2010). Asimismo, la regulación positiva simultánea de la proliferación celular y la expresión de PFKFB3 ha sido ampliamente documentada (Xu y col., 2014; Wang y col., 2020; Li J y col., 2022), hecho que refuerza la relevancia de PFKFB3 en el mantenimiento del alto flujo glucolítico en células proliferativas. En el testículo, se ha demostrado la expresión de PFKFB1-3 en células de Sertoli y PFKFB4 en células germinales (Gomez y col., 2009; Regueira y col., 2015), además de la regulación de la expresión de PFKFB1 y PFKFB3 por FSH en células de Sertoli con fenotipo maduro, las cuales no proliferan (Regueira y col., 2015). Los resultados presentados en esta tesis muestran que la FSH solo regula positivamente la expresión de la isoforma PFKFB3 en células de Sertoli que proliferan. Estos hallazgos en células de Sertoli inmaduras podrían ser compatibles con un flujo glucolítico elevado sumado a una proliferación regulada positivamente bajo el estímulo de la hormona FSH.

Con relación a la actividad de PK, vale la pena mencionar que el aumento de expresión de PKM2 conduce al efecto Warburg en células proliferativas (embriogénesis y en células tumorales) y que ha sido demostrado que su expresión se encuentra bajo el control de la actividad de la vía mTORC1/HIF1 (Sun y col., 2011; Dong y col., 2016). Sin embargo, los resultados presentados en esta tesis muestran que la FSH no modifica los niveles de ARNm de PKM2 en células de Sertoli inmaduras. Teniendo en cuenta que en células de Sertoli inmaduras el aumento en la actividad transcripcional de HIF por FSH es únicamente atribuible a HIF2, pero no a HIF1 (Gorga y col., 2018), es tentador especular que la regulación de la expresión de PKM2 por FSH en células de Sertoli dependería de la capacidad de dicha hormona para incrementar la actividad de HIF1, lo que solo ocurre en el fenotipo maduro de este tipo celular (Galardo y col., 2017). Igualmente, esta isoforma de PK presenta características muy destacables que fueron demostradas en células tumorales, no solo relacionadas con la regulación de la glucólisis, sino en cuanto a la regulación de la proliferación celular. En este sentido, como tetrámero presenta actividad

enzimática catalizando la conversión de fosfoenolpiruvato y ADP en piruvato y ATP, pero como dímero actúa como proteína quinasa o coactivador transcripcional dentro del núcleo promoviendo la progresión del ciclo celular (Gao y col., 2012). La transición de tetramero a dímero depende de modificaciones postraduccionales de PKM2: la fosforilación, acetilación y oxidación en residuos Tyr105, Lys305 y Cys358, respectivamente, estabilizan la estructura dimérica (Prakasam y col., 2018). Por lo tanto, no se le puede restar importancia a PKM2 por el solo hecho de que su expresión no sea inducida por FSH en células de Sertoli inmaduras, ya que su sola presencia en la célula podría representar una ventaja en el ingreso al ciclo celular. Asimismo, dado que PKM2 presenta como efector alostérico positivo al metabolito Fru-1,6-P₂, producto de la PFK1, podríamos especular que como consecuencia de la inducción de *Pfkfb3* la actividad de PKM2 estaría aumentada en células de Sertoli inmaduras bajo estímulo hormonal.

Con respecto a la LDH, la misma es una enzima clave del efecto Warburg (Li y Zhang, 2016). Más específicamente, la isoenzima LDH5, que consta de cuatro subunidades LDHA, tiene propiedades cinéticas únicas que favorecen la conversión de piruvato en lactato (Cahn y col., 1962; Pesce y col., 1964). La existencia de una correlación significativa entre la expresión de LDHA y la proliferación celular ha sido ampliamente reconocida (DeBerardinis y col., 2008). En células de Sertoli inmaduras observamos que la FSH promueve la expresión de LDHA, sin modificar los niveles de ARNm de LDHB. Por otro lado, cabe señalar que en células de Sertoli maduras la FSH también estimula la expresión de LDHA, lo que lleva a un aumento de las isoenzimas LDH4 y LDH5, en detrimento de los niveles de LDH1 y LDH2 (Riera y col., 2001). No obstante, en dichas células con fenotipo maduro, el propósito biológico de la FSH de favorecer la glucólisis aeróbica no está relacionado con la proliferación, sino con la producción de sustratos energéticos para las células germinales aisladas de la circulación sistémica. En conjunto, estos hallazgos sugieren que la FSH, concomitantemente con la regulación positiva de la proliferación de

células de Sertoli, favorece la expresión de genes que codifican enzimas clave -PFKFB3 y LDHA- que comandan el flujo glucolítico en células de Sertoli inmaduras.

Como fue abordado en la introducción, entre las señales de transducción implicadas en la estimulación de la proliferación de las células de Sertoli, mTORC1 se ha destacado como coordinador de señales locales —relacionadas con el metabolismo celular— y de señales sistémicas —desencadenadas por estímulos mitogénicos como factores de crecimiento u hormonas— (Cuyàs y col., 2014). Dado que la FSH promueve la proliferación de las células de Sertoli mediante la activación de la vía mTORC1, nos preguntamos si la FSH, además de la proliferación, podría regular la glucólisis a través de la misma señal de transducción. Se evaluó, entonces, la participación de la vía mTORC1 en la regulación de la glucólisis a través de los niveles de lactato, la expresión de PFKFB3 y LDHA por la FSH. Considerando que la principal vía de producción de lactato depende de la glucólisis (Li X y col., 2022), la determinación de los niveles de este hidroxácido constituye un excelente biomarcador para estimar las tasas de actividad de dicha vía. En este contexto, como resultado del tratamiento con rapamicina —inhibidor de mTORC1— en cultivos de células de Sertoli inmaduras se observó que FSH era incapaz de incrementar los niveles de lactato y los niveles de expresión de PFKFB3; mientras que la inhibición sobre los niveles de expresión de LDHA fue parcial. Con este último resultado se podría inferir la participación de vías de señalización adicionales en la regulación de este gen. Teniendo en cuenta lo discutido hasta este punto, se podría proponer la participación de mTORC1 en la regulación de la glucólisis por la FSH en las células de Sertoli con capacidad proliferativa. Por lo tanto, en la célula de Sertoli inmadura, FSH estaría regulando tanto la proliferación como la glucólisis utilizando la misma vía de señalización, mTORC1. De hecho, esta última idea ha sido reforzada a lo largo de los años, ya que se ha caracterizado detalladamente la participación de la vía PI3K/Akt/mTORC1 en la regulación de la glucólisis en otros tipos celulares (Szwed y col., 2021). Además, existe evidencia que sugiere que, a lo largo de la

vía glucolítica, mTORC1 controla directa o indirectamente la expresión de enzimas glucolíticas mediante la regulación de la abundancia celular de factores de transcripción específicos como c-Myc o HIF1 (Treins y col., 2002; Mahauad-Fernandez y col., 2022). Sin embargo, estudios previos de nuestro laboratorio descartan la participación de HIF1 en la regulación de la funcionalidad de células de Sertoli inmaduras por FSH, ya que la actividad transcripcional de HIF solo puede ser atribuida a HIF2 (Gorga y col., 2018). Vale la pena aclarar que, si bien HIF1 y HIF2 poseen características estructurales similares, lo que posibilita el reconocimiento de la misma secuencia consenso en los promotores de genes, existen genes que únicamente son regulados por una única isoforma, y precisamente los genes que codifican para las enzimas glucolíticas solo responden a HIF1 (Kierans y Taylor, 2021).

Ha sido reportado que la FSH emplea diversos mecanismos moleculares para inducir la progresión del ciclo celular en células de Sertoli inmaduras, entre los cuales se destaca el aumento en los niveles de ARNm de c-Myc (Lim y Hwang, 1995). Es por ello que la determinación de los niveles de expresión de dicho factor de transcripción o de su actividad constituye un buen parámetro de la progresión del ciclo celular. Previamente, nuestro laboratorio ha demostrado que FSH incrementa la expresión de c-Myc de forma PI3K/Akt dependiente (Riera y col., 2012), y considerando que en otros tipos celulares mTORC1 está muy involucrado en la regulación de la actividad transcripcional de c-Myc, nos propusimos analizar con mayor profundidad el mecanismo molecular utilizado por la hormona para regular c-Myc. Los resultados presentados en esta tesis permiten afirmar que, si bien mTORC1 no está involucrado en la regulación de los niveles de ARNm de c-Myc por FSH, la vía de señalización participa en la regulación de la actividad transcripcional del mismo. Este hallazgo se puede explicar por el hecho de que la vía mTORC1 controla los niveles de este factor de transcripción a través de la regulación de la traducción o la prevención de la degradación de la proteína c-Myc, pero no a través de la regulación de la

transcripción del gen *c-Myc*. Tal como se expuso en la introducción, la vía mTORC1 promueve la traducción del ARNm de *c-Myc* ya que este presenta una secuencia 5'-TOP (Stoneley, 1998). Sumado a ello, de forma redundante, mTORC1 utiliza otro mecanismo para favorecer la abundancia celular de este factor de transcripción mediado por la regulación de la localización subcelular de la enzima glucógeno sintasa quinasa 3 β (GSK3 β). Esta quinasa regula los niveles proteicos de *c-Myc* al traslocarse al núcleo para fosforilarlo y promover su degradación proteosomal dependiente de ubiquitina (Gregory y col., 2003). En un trabajo publicado por Bautista y colaboradores (2018), los autores propusieron que es mTORC1 el complejo proteico capaz de regular la localización subcelular de GSK3 β y, por ende, la abundancia celular de *c-Myc*. Los autores demostraron que la inhibición de mTORC1 en cultivos de epitelio pigmentario de retina promueve la localización nuclear de GSK3 β , dando como resultado una reducción de los niveles proteicos de *c-Myc* debido a su degradación. Por el contrario, observaron que en células cultivadas en suero —condición en la que mTORC1 está activo— GSK3 β y *c-Myc* se compartimentan por separado dentro del citoplasma y el núcleo, respectivamente, de manera que los niveles del factor de transcripción se mantienen inalterados. En definitiva, los resultados presentados en este trabajo de tesis incorporan un eslabón más al mecanismo molecular utilizado por FSH para regular la actividad transcripcional *c-Myc*: a mTORC1. Asimismo, se ha demostrado la regulación de la expresión de ciclinas por *c-Myc* (Bretones y col., 2015). En este sentido, observamos que FSH es incapaz de incrementar los niveles de ARNm de CCND1 y CCND2 si la actividad de mTORC1 y, por lo tanto, la actividad de *c-Myc* están inhibidas en células de Sertoli inmaduras. En conjunto, estos resultados refuerzan la idea de que la hormona FSH regula la progresión del ciclo celular a través de la modulación de la vía mTORC1 en células de Sertoli inmaduras.

Por otro lado, además de la participación de mTORC1 en las redes de señalización desencadenadas por hormonas y factores de crecimiento, el complejo macromolecular

también actúa como un sensor de nutrientes cuya propia actividad depende de la presencia de metabolitos específicos (Benjamin y Hall, 2019; Otto, 2020). El mecanismo molecular por el cual mTORC1 es capaz de censar los nutrientes aún es desconocido. Sin embargo, este tema ha despertado el interés de la comunidad científica en los últimos años y se han hecho avances significativos en este campo. Precisamente, se demostró que el flujo glucolítico es capaz de controlar la actividad de mTORC1 a través de la acumulación de intermediarios de la ruta metabólica (Lee y col., 2009; Byun y col., 2019; Orozco y col., 2020). Considerando que en las células de Sertoli inmaduras la FSH regula positivamente la glucólisis de una manera dependiente de mTORC1, se presentó el interrogante de si la glucólisis puede estar modulando, a su vez, la actividad de dicha vía de señalización. Para corroborar esta hipótesis en el presente trabajo de tesis se hizo uso de distintas estrategias. En una primera instancia, se utilizó un inhibidor específico de la PFKFB3, el 3PO. Habiendo evaluado la efectividad del inhibidor como herramienta experimental —a partir de la determinación de lactato—, se observó que la inhibición de la glucólisis impidió que la FSH activara el complejo mTORC1. También se evaluaron las consecuencias de la inhibición de la glucólisis por 3PO sobre la regulación de la proliferación de la célula de Sertoli por FSH. Considerando el mecanismo descrito en párrafos anteriores, podríamos pensar que como consecuencia de la menor actividad de la vía mTORC1 en respuesta a un flujo glucolítico disminuido, FSH pierda su capacidad mitogénica en las células de Sertoli. Efectivamente, los resultados obtenidos muestran que el tratamiento con 3PO no solo impidió el efecto estimulador de la FSH sobre la actividad transcripcional del factor de transcripción c-Myc, sino que además bloqueó el estímulo hormonal sobre los niveles de expresión de las ciclinas, la incorporación de BrdU y la marcación del antígeno Ki-67. Estos hallazgos concuerdan con los presentados por Pang y colaboradores (2015) y Steifensand y colaboradores (2021): el inhibidor glucolítico 2-desoxi-D-glucosa (2DG) suprime la proliferación celular mediante la disminución de c-Myc en células de linfoma no Hodgkin y

líneas celulares de cáncer de mama; sin embargo, en sus trabajos no se evaluaron las vías de señalización implicadas. Asimismo, ha sido demostrado que la sobreexpresión de miR-26b, un ARN corto no codificante que inhibe específicamente la expresión postranscripcional de PFKFB3, induce la inhibición de la vía glucolítica y la detención del ciclo celular en G0/G1 mediante la disminución de la expresión de CCND1 en células de osteosarcoma (Du y col., 2015). En cuanto a CCND2, se ha demostrado que la expresión de la ciclina depende de la glucólisis y la consiguiente entrada de calcio en las células β pancreáticas quiescentes (Salpeter y col., 2011).

De la primera estrategia experimental llevada a cabo se desprende la idea de que la glucólisis podría considerarse como parte de los mecanismos moleculares utilizados por la FSH para regular la proliferación en las células de Sertoli a través de la vía de transducción mTORC1. No obstante, debe tenerse en cuenta que, si bien el 3PO es un inhibidor altamente específico y selectivo, se ha demostrado que su utilización conduce a un desbalance energético al reducir los niveles de ATP intracelulares (Conradi y col., 2017). Como fue desarrollado en la introducción, en contextos de privación energética —aumento de la relación [AMP]/[ATP]— en células de Sertoli con capacidad proliferativa, la vía AMPK interviene activamente en el arresto del ciclo celular (Riera y col., 2012; Rindone y col., 2018). De aquí se desprende que los resultados obtenidos de la utilización del 3PO podrían deberse, al menos en parte, a la activación de la AMPK. Para descartar dicha posibilidad, se utilizó otro inhibidor que no modifica los niveles intracelulares de ATP: el oxamato (OXA), inhibidor de la enzima LDH. Dado que esta enzima cataliza la última reacción de la glucólisis aeróbica, es sabido que la inhibición de su actividad no conduce a un desbalance energético (Li y col., 2013; Miskimins y col., 2014; El-Sisi y col., 2017). Los resultados obtenidos de la utilización de OXA refuerzan el concepto delineado con los hallazgos experimentales en incubaciones con 3PO: la inhibición de la glucólisis impidió la activación del complejo mTORC1, así como también el efecto estimulador de la FSH

sobre los parámetros proliferativos anteriormente mencionados. Nuestros hallazgos concuerdan con aquellos obtenidos por distintos grupos de trabajo que han demostrado que el tratamiento de distintas líneas celulares tumorales con 2DG inhibe la señalización de mTORC1 (Jiang y col., 2008; Zhao y col., 2019). De forma similar, se ha demostrado que la inhibición de LDHA induce la detención del ciclo celular en la fase G0/G1 en células de glioma (Di y col., 2018) y que OXA induce una detención significativa también en la fase G0/G1 del ciclo celular acompañada de una disminución de la proteína CCND1 en células de cáncer de pulmón (Yang y col., 2014). Por otro lado, y en cuanto a la glucólisis, cabe aclarar que mientras exista un flujo activo habrá disponibilidad de sustrato para la enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH). Interesantemente, Lee y colaboradores (2009) observaron que cuando fibroblastos embrionarios de ratón TSC1 -/- eran incubados en ausencia de glucosa o en presencia de 2DG, la enzima GAPDH, por falta de su propio sustrato, se asociaba a Rheb. De esta forma, la interacción Rheb/mTORC1 se veía impedida, lo que conducía, en consecuencia, a la inhibición de la señal de transducción de forma AMPK independiente. Ahora bien, si este fuese el mecanismo que operase en las células de Sertoli inmaduras, no se habría observado en nuestros resultados inhibición de la actividad de mTORC1 en incubaciones con OXA, ya que el bloqueo de la actividad de LDH no interfiere en la disponibilidad del sustrato de GAPDH. Por lo tanto, el mecanismo mediante el cual la glucólisis cooperaría con la FSH para activar mTORC1 al impedir la asociación Rheb/GAPDH no prevalecería en las células de Sertoli para promover la proliferación celular.

Como puede observarse, pese al hecho de que los inhibidores utilizados como herramientas para inhibir la glucólisis presentan efectos distintos en cuanto al balance energético, los resultados obtenidos con cada uno de ellos fueron similares para todas las variables analizadas, por lo que postulamos que los efectos observados son independientes del balance energético. De esta manera, podríamos especular que las

inhibiciones observadas no son la resultante de una disminución en los niveles de ATP intracelulares y, en consecuencia, de la activación de la enzima AMPK.

Además de la cooperación de la glucólisis en la regulación de la proliferación por la FSH, también evaluamos la participación de la vía metabólica en la modulación de la expresión de las enzimas clave de la glucólisis por la hormona. De esta manera, observamos que la inhibición de la vía glucolítica suprime, al menos en parte, el efecto de la hormona sobre los niveles de expresión de PFKFB3 y LDHA. En este contexto, nuestros resultados concuerdan con los obtenidos por Xiaoting Hu y colaboradores (2020), quienes demostraron que la inhibición de la glucólisis bloquea la regulación positiva de la expresión de PFKFB3 y la actividad de LDH por lipopolisacárido en fibroblastos pulmonares. Teniendo en cuenta que la FSH aumenta la expresión de PFKFB3 y LDHA a través de la vía mTORC1, estos últimos resultados pueden explicarse por la menor actividad de dicha vía causada por la inhibición de la glucólisis. Al indagar en el posible mecanismo subyacente a este hallazgo, debemos considerar que, como se mencionó anteriormente, la vía mTORC1 participa en la modulación de la actividad de distintos factores de transcripción, entre ellos c-Myc y HIF1 (Hosoi y col., 1998; Land y Tee, 2007; Bautista y col., 2018). Si bien los promotores de los genes *Pfkfb3* y *Ldha* presentan sitios de elemento de respuesta a ambos factores de transcripción (Semenza y col., 1996; Shim y col., 1997; Navarro-Sabaté y col., 2001; Obach y col., 2004), ha sido discutido previamente que en células de Sertoli inmaduras el aumento en la actividad transcripcional de HIF por FSH es únicamente atribuible a HIF2, pero no a HIF1. Por lo tanto, es posible especular que la glucólisis podría cooperar con la FSH para inducir la expresión de PFKFB3 y LDHA a través de la modulación de la señal mTORC1/c-Myc. Esta hipótesis no solo está respaldada por el hecho de que existe evidencia de que la inhibición de PFKFB3 o LDHA conduce a la inhibición de la actividad de c-Myc en diferentes líneas celulares (Shim y col., 1997; Cargill y col., 2021), sino que, además, se condice con lo observado en nuestros resultados: en las células de

Sertoli inmaduras la actividad transcripcional de c-Myc estimulada por FSH se ve inhibida tras la inhibición de la glucólisis tanto con 3PO como con OXA. Es por todo esto que podemos decir que la disminución observada de la expresión de PFKFB3 y LDHA estimuladas por FSH podría deberse a una modulación negativa de la señal mTORC1/c-Myc. Dado que la inhibición del efecto de FSH por rapamicina, 3PO u OXA sobre los niveles de expresión de LDHA es parcial, se puede postular que en la inducción hormonal del gen *Ldha* participe, además, un factor de transcripción cuya activación sea independiente de mTORC1. Precisamente, el gen *Ldha* presenta secuencias consenso denominadas elementos de respuesta al AMPc (CRE) en su promotor (Short y col., 1994), y la activación de la proteína de unión a sitios CRE (CREB) por FSH en células de Sertoli depende de PKA (Walker y col., 1995). Es posible asumir, entonces, que la expresión de este gen en células de Sertoli inmaduras podría estar regulada no solo por la vía mTORC1/c-Myc, sino, además, por la vía PKA/CREB.

Mediante dos inhibidores farmacológicos que difieren en sus blancos de acción se ha corroborado, entonces, que la glucólisis forma parte de los mecanismos moleculares utilizados por la FSH para modular la proliferación en las células de Sertoli. Los resultados obtenidos en esta parte del trabajo de tesis suman evidencia que respalda la existencia de una estrecha interconexión entre el metabolismo y la progresión del ciclo celular en células normales en proliferación. Por lo tanto, el efecto Warburg no debería ser considerado únicamente como una característica distintiva del cáncer. Entender cómo estos eventos ocurren en sincronía cooperará en la comprensión de la compleja red que opera en la regulación de la proliferación celular.

Por otro lado, de estos hallazgos se podría inferir que, en células de Sertoli inmaduras, la activación de mTORC1 requiere no solo señales externas (estímulo de FSH) sino también señales locales determinadas por la concentración de metabolitos derivados de las rutas metabólicas, en este caso, de la glucólisis. Es sabido que, en el microambiente

celular, las fluctuaciones de nutrientes son inevitables, condición a la cual las células deben adaptar rápidamente su metabolismo según sus necesidades. Curiosamente, ha sido reportado que, ante un flujo glucolítico aumentado, no solo existe una acumulación de lactato, sino que, además, se da la acumulación de otros metabolitos intermediarios de la glucólisis, entre los cuales se destaca la dihidroxiacetona fosfato (DHAP) (Zhang y col., 2024). De estos hallazgos se desprende que mTORC1 tendría la capacidad de censar ambos metabolitos; de hecho, existe evidencia que respalda su participación en la activación del complejo proteico.

En lo que respecta a la DHAP, aunque la evidencia aún es limitada, cada vez son más las investigaciones en torno al rol regulatorio de este metabolito. En este contexto, Orozco y colaboradores (2020) han demostrado en células HEK-293T que la síntesis de DHAP a partir de dihidroxiacetona es suficiente para activar mTORC1, incluso en ausencia de glucosa. Por su parte, Zhang y colaboradores (2024) evidenciaron que en podocitos afectados por nefropatía diabética, la activación de mTORC1 —como respuesta a niveles elevados de DHAP— induce estrés oxidativo y conduce a las células a piroptosis, una forma inflamatoria de muerte celular. No obstante, los resultados presentados en este trabajo de tesis no sugieren la participación de DHAP como metabolito intermediario en el mecanismo de activación de mTORC1. Esto es así ya que el tratamiento con OXA —cuya utilización ha sido demostrada que inhibe la actividad de mTORC1— no impediría la acumulación de DHAP. De esta manera, si DHAP estuviera implicada directamente en la activación de mTORC1, cabría esperar que el tratamiento con el inhibidor específico de LDH no afectara ni la actividad del complejo proteico ni los parámetros proliferativos dependientes de su activación, escenario biológico que no se condice con lo observado para dichos resultados. Por lo tanto, cabría preguntarse qué metabolito deja de acumularse tanto por acción de 3PO como de OXA. Analizando la vía glucolítica, el lactato resulta un excelente candidato.

En lo que respecta al lactato, ha quedado en evidencia que el hidroxiaácido —pese a ser descrito como un producto final indeseado de la glucólisis durante siglos— actúa como molécula señal en distintos tipos celulares, y las células del testículo no son la excepción. En el 2014, nuestro laboratorio demostró que, luego de ingresar a las células germinales, el lactato es oxidado a piruvato con el consiguiente aumento de NADH, sustrato de la isoforma 4 de la NADPH oxidasa (NOX4). Las especies reactivas de oxígeno (ROS), producto de la actividad de NOX4, actúan como segundos mensajeros que regulan las vías de transducción de señales y la expresión génica en dicho tipo celular, resultando en el aumento de la expresión de genes que codifican para proteínas que intervienen en la propia metabolización del lactato, como son el transportador de monocarboxilatos (MCT) 2 y LDHC (Galardo y col., 2014). Asimismo, en líneas celulares tumorales se evidenció que el lactato activa mTORC1 al interrumpir la interacción TSC2-Rheb (Byun y col., 2019). Teniendo estos hallazgos en mente y considerando que, en células de Sertoli con capacidad proliferativa, los niveles del hidroxiaácido se encuentran elevados como consecuencia de un incremento del flujo glucolítico (Galardo y col., 2008), es tentador especular que el lactato podría estar ejerciendo un rol regulatorio como molécula señal en el fenotipo inmaduro de este tipo celular. Más específicamente, hipotetizamos que el aumento del flujo glucolítico, dado por el estímulo hormonal de FSH, conduciría a mayores niveles de lactato, el cual estaría actuando como metabolito mediador que coopera en el intrincado mecanismo de activación de la señal de transducción mTORC1 promoviendo, así, la progresión del ciclo celular. Cuando contrastamos esta hipótesis, pudimos observar que la presencia del lactato activa la vía mTORC1, incrementa los niveles de expresión de la ciclina CCND2 y estimula la proliferación celular. Estos resultados se condicen con los observados por Byun y colaboradores (2019), quienes demostraron que la activación de mTORC1 dada por lactato resulta en un incremento de la proliferación celular de fibroblastos embrionarios de ratón. Asimismo, existe evidencia de que el lactato induce

hipertrofia muscular en ratones a través de mTORC1 (Shirai y col., 2022). En otras palabras, el censado del nutriente glucosa por mTORC1 parecería depender de la entrada del azúcar al flujo glucolítico y su conversión final a lactato.

En su conjunto, las evidencias experimentales obtenidas en este trabajo de tesis permiten proponer una acción intracrina del lactato al colaborar en el mecanismo de acción de FSH para activar mTORC1. No obstante, a partir de nuestros resultados no podemos descartar que el lactato ejerza sus acciones a través de otros mecanismos, como la lactilación, un nuevo tipo de modificación postraducciona (Zhang y col., 2019; Hu J y col., 2020; Certo y col., 2022). En este contexto, cabe mencionar que Jin y colaboradores (2023) demostraron que la ciclina E2 debe permanecer lactilada para que el ciclo celular proceda en células de hepatocarcinoma. Por lo tanto, dado que las células de Sertoli inmaduras poseen un metabolismo glucolítico inducido por FSH y que el sustrato para la lactilación se origina por glucólisis, no es ilógico pensar que la modificación covalente de proteínas por lactato también podría ser un mecanismo molecular interviniente en la regulación hormonal de este tipo celular. Por otro lado, considerando que el lactato producido puede ser liberado al espacio extracelular a través del transportador de monocarboxilato 4 (MCT4), el mismo podría estar ejerciendo acciones regulatorias como ligando de proteínas transmembrana con función receptora, como se ha observado en diversos tipos celulares (Liu y col., 2009; Ohno y col., 2018, 2023). Actualmente, es sabido que el lactato posee un receptor acoplado a proteína G (GPCR), el GPR81. Este receptor fue descubierto en 2001 y, años más tarde, se demostró su afinidad por el lactato como ligando endógeno (Hu J y col., 2020). GPR81 se expresa principalmente en adipocitos de grasa blanca o parda y presenta baja expresión en otros tejidos (Ge y col., 2008); sin embargo, se desconoce si las células de Sertoli expresan este receptor. En este escenario biológico y con los resultados obtenidos de este trabajo de tesis, no es posible descartar acciones autocrinas desencadenadas a partir de la interacción del metabolito con su

respectivo receptor luego de ser secretado al medio extracelular. Por estas razones, el término “lacthormona”, adoptado por primera vez por el investigador George Brooks en el año 2009, y no muy bienvenido por la comunidad científica, presenta en estos tiempos mayores sustentos a nivel molecular.

En resumen, los resultados obtenidos sobre la participación de la glucólisis en la regulación de la proliferación por FSH en la célula de Sertoli indican que la hormona regula simultáneamente la proliferación celular y la glucólisis de forma dependiente de mTORC1 en células de Sertoli inmaduras. Además, la glucólisis parece cooperar con la FSH para estimular tanto la proliferación como el metabolismo glucolítico mediante el control que ejerce sobre la actividad de la vía de señalización de mTORC1, siendo el lactato un posible metabolito mediador en esta contribución. Por lo tanto, se propone la existencia de una retroalimentación positiva entre la señal de transducción mTORC1 y la glucólisis bajo estimulación con FSH, lo que constituye un círculo virtuoso en la regulación de la proliferación de células de Sertoli.

Por lo descrito en este trabajo de tesis, ha quedado de manifiesto la existencia de una estrecha correlación entre el metabolismo y la progresión del ciclo celular. Partiendo de la observación fundamental de Warburg sobre la glucólisis aeróbica, históricamente las investigaciones se han centrado en el estudio del metabolismo de la glucosa con el objetivo de desarrollar terapias contra el cáncer. Sin embargo, a partir de la década de 1950, la comunidad científica reconoció la importancia de la L-gln como nutriente tumoral (DeBerardinis y Cheng, 2010). Como fue descrito en la introducción, en contextos proliferativos la L-gln es considerada condicionalmente esencial ya que su demanda supera con creces la capacidad biosintética celular (Zhang y col., 2017). En este contexto, se ha demostrado que la dependencia de L-gln en células que proliferan es tan alta que, a pesar de ser un aminoácido no esencial, la inhibición de SLC1A5 -transportador de L-gln-

impide la progresión de melanomas, cáncer de próstata y estómago (Wang Q y col., 2014, 2015; Lu y col., 2017). Pese a que la mayoría de los estudios que relacionan la proliferación con el aumento de la demanda de L-gln se han realizado en células tumorales (Wise y Thompson, 2010), se ha demostrado que esta característica también está presente en algunos tipos de células normales que proliferan, como los linfocitos T al ser estimulados por antígenos y las células madre esqueléticas (Yu y col., 2019; Shyer y col., 2020). Por lo tanto, teniendo en cuenta esta evidencia, postulamos que, de manera similar a la glucólisis, el metabolismo de la L-gln estaría desempeñando un papel preponderante en la regulación de la proliferación de la célula de Sertoli. Cabe mencionar que el metabolismo de aminoácidos en cultivos de células de Sertoli aisladas de ratas de 16 a 18 días de edad fue analizado por Kaiser y colaboradores (2005); sin embargo, poco es lo que se sabe sobre la regulación del metabolismo de la L-gln en el fenotipo inmaduro de este tipo celular. De esta manera, el segundo set de experimentos fue diseñado para estudiar la regulación hormonal del metabolismo de la L-gln y, asimismo, su participación en la regulación de la proliferación por FSH de la célula de Sertoli inmadura.

En primer lugar, evaluamos la expresión de los genes que codifican para las proteínas clave implicadas en el metabolismo de la L-gln: *Slc1a5*, *Slc38a5*, *Gls1*, *Gls2* y *Gs*; y corroboramos que los mismos se expresan en células de Sertoli inmaduras de rata. Luego, se analizó el nivel de expresión para cada uno de estos genes bajo estimulación con FSH y observamos que la hormona no modifica los niveles de expresión de los transportadores de L-gln, SLC38A5 y SLC1A5. Sin embargo, no se puede afirmar con certeza que la FSH no regule el transporte de L-gln. Precisamente, en enterocitos humanos, si bien el factor de crecimiento epidérmico (EGF) no modifica los niveles totales de proteína SLC1A5, dicho factor puede aumentar los transportadores de L-gln presentes en la membrana plasmática, favoreciendo la entrada celular de aminoácidos (Avisar y col., 2008). Estos hallazgos sugieren la posible existencia de un mecanismo de translocación

para los transportadores de L-gln, mecanismo que no se descarta que exista en las células de Sertoli inmaduras.

En cuanto al gen *Gs* —que codifica la enzima responsable de la biosíntesis *de novo* de la L-gln—, nuestros resultados muestran que la FSH regula negativamente su expresión en células de Sertoli inmaduras. Este resultado resultó sorprendente debido a que se contraponía al concepto de lo elemental que resulta la L-gln en un contexto proliferativo. Aún más curioso fue el hecho de que la hormona tiroidea T3 —hormona que promueve la maduración de la célula de Sertoli y detiene su proliferación— aumentaba la expresión del gen *Gs* (datos no mostrados). Si bien no encontrábamos una respuesta que diese explicación a la disminución de la expresión del gen que codifica para la enzima clave de la síntesis *de novo* de L-gln en un escenario biológico de alta demanda del aminoácido, sí existían evidencias a nivel molecular que permitían especular sobre la ocurrencia de este fenómeno. Van der Vos y colaboradores (2012) han demostrado que la expresión del gen *Gs* depende de FOXO3 y FOXO4, factores de transcripción que se excluyen del núcleo y, por lo tanto, se inactivan al ser fosforilados por Akt. Dado que la FSH desencadena la activación de la vía de señalización PI3K/Akt en células de Sertoli inmaduras, no sería ilógico pensar que los niveles más bajos de ARNm de *GS* como resultado de la estimulación hormonal se deban a la inactivación de FOXO por Akt.

En lo que respecta a los genes *Gls* —que codifican las isoenzimas responsables de catalizar el paso limitante de la vía metabólica de la glutaminólisis—, hemos observado que, si bien la FSH no modifica la expresión de GLS1, la hormona aumenta los niveles de expresión de GLS2 en células de Sertoli inmaduras. Por otro lado, se observó que T3 no modifica la expresión de ninguno de estos dos genes (datos no mostrados). Este resultado, en cierta forma, acercaba posiciones hacia el aumento de la demanda de L-gln ante un estímulo mitogénico: su degradación (glutaminólisis) parecería estar más activa a expensas de una mayor expresión de GLS2. Precisamente, numerosos estudios indican

que la glutaminólisis aumenta en diversas células tumorales, pero por sobreexpresión de GLS1, que resulta de suma importancia para la progresión del ciclo celular (Huang y col., 2014; Pan y col., 2015; Vidula y col., 2023; Sun y col., 2025). Sin embargo, el papel de GLS2 es controvertido: en ciertas células de cáncer, exhibe una función supresora de tumores, mientras que en otras contribuye a aumentar la proliferación (Katt y col., 2017; Buczkowska y Szeliga, 2023). No obstante, en células normales que proliferan, como los linfocitos T activados, las altas tasas de proliferación se acompañan de un aumento en la expresión de GLS2, pero no de GLS1 (Wang y col., 2011; Eleftheriadis y col., 2016). En este punto surge el interrogante de cómo es posible que se active la degradación de un aminoácido condicionalmente esencial en un escenario de crecimiento celular. Si bien siempre se consideró a la glutaminólisis como una vía catabólica, existen reportes que demuestran que esta vía metabólica puede ser también anabólica. Estudios realizados por cromatografía gaseosa/espectrometría de masa de impacto electrónico permitieron evidenciar que la L-gln se comporta como fuente de carbono para la biosíntesis de ácidos grasos que conforman los fosfolípidos de membrana (Metallo y col., 2011; Mullen y col., 2011; Kim y col., 2017). En células que proliferan activamente se ha demostrado que en la mitocondria el α -KG derivado de la glutaminólisis puede tener dos destinos posibles: continuar su oxidación en el ciclo de Krebs o ser convertido en isocitrato. Si bien clásicamente la reacción del ciclo de Krebs catalizada por la enzima isocitrato deshidrogenasa (IDH) es considerada irreversible en sentido isocitrato a α -KG, se debe tener en cuenta que existen tres isoformas de dicha enzima: IDH1 (citoplasmática), IDH2 (mitocondrial) e IDH3 (mitocondrial, ciclo de Krebs) y que IDH1 e IDH2, contrario a IDH3, catalizan la carboxilación reductiva de α -KG a isocitrato (Bell y Baron, 1968). El isocitrato se puede convertir en citrato, molécula clave en la síntesis de ácidos grasos, ya que además de aportar el acetil-CoA citoplasmático requerido como sustrato, es activador alostérico de la acetil-CoA carboxilasa, enzima que cataliza el paso limitante de la síntesis

de novo de ácidos grasos. Las células de Sertoli inmaduras expresan las tres isoformas de IDH (datos no mostrados). Por lo tanto, se podría especular que en células de Sertoli inmaduras, la glutaminólisis se comportaría como una vía anabólica ante estímulos proliferativos.

Por otro lado, con respecto a los factores de transcripción que podrían participar en la regulación de la expresión de las isoformas de GLS, existe evidencia que sugiere que la expresión de GLS1 depende del factor de transcripción c-Myc (Tambay y col., 2021); sin embargo, las células de Sertoli no muestran inducción de *Gls1* bajo el estímulo de FSH. Además, un estudio ha evidenciado que la inducción de un gen particular que presenta secuencias E-box en su promotor depende no solo del propio c-Myc, sino también del entorno transcripcional local: secuencias flanqueantes, el estado de metilación de los sitios E-box en un tipo celular en particular y la existencia de proteínas que podrían competir por la misma secuencia específica (Grandori y col., 2000). En este contexto, y aunque nuestros resultados también muestran que la FSH incrementa la actividad de c-Myc, es importante considerar que dicho aumento no necesariamente podría traducirse en una inducción de todos aquellos genes que presentan secuencias E-box en sus promotores. Por otro lado, en lo que respecta a la regulación de la expresión del gen *Gls2*, existe evidencia que sugiere que la misma no depende de c-Myc, sino de n-Myc y GATA3 (Xiao y col., 2015; Lukey y col., 2019). Hasta el momento, no existen registros de que la FSH regule la actividad transcripcional de n-Myc o GATA3 en células de Sertoli de rata, por lo que serán necesarios más estudios para dilucidar el mecanismo que la FSH utiliza para inducir *Gls2*.

Considerando que la FSH regula negativamente la expresión de GS y positivamente la de GLS2 en células de Sertoli inmaduras, y dado que la síntesis *de novo* de L-gln y la glutaminólisis se consideran vías metabólicas antagónicas, es posible inferir que la regulación observada por la hormona en células de Sertoli inmaduras son el reflejo de los

mecanismos que operan para evitar un ciclo fútil (Kovacevic y McGivan, 1983). En consecuencia, por la manera en que se estructura la regulación del metabolismo del aminoácido en células de Sertoli inmaduras, se sugiere una dependencia de la L-gln exógena. Por lo tanto, la célula de Sertoli inmadura constituiría un ejemplo más de que la “adicción” a la L-gln podría ser considerada una característica metabólica, no solo de células tumorales sino también de células normales con capacidad proliferativa. Estos resultados sugieren que en este tipo celular la FSH no solo regula la proliferación, sino, además, el metabolismo de la L-gln al disminuir la expresión de GS y aumentar la de GLS2, escenario biológico consistente con un aumento en el consumo del aminoácido en un contexto proliferativo.

Se continuó el estudio ahondando en el papel de la L-gln en la acción mitogénica de la FSH evaluando si el aminoácido se comporta como un modulador de dicha acción. Para ello —y considerando los mecanismos mediante los cuales una célula puede disponer de L-gln—, utilizamos dos estrategias experimentales distintas que conducen a la privación de este aminoácido: incubaciones en medios de cultivo habituales (L-gln 2.5 mM) en presencia de un inhibidor farmacológico de los transportadores de L-gln, GPNA; e incubaciones en medios de cultivo sin L-gln. Lamentablemente, no existen informes precisos sobre los niveles testiculares de L-gln. Solo se han realizado unos pocos estudios en testículos de equinos y carneros, pero los datos de concentración corresponden a la mezcla de L-gln con otros aminoácidos y no a la concentración de L-gln pura (Setchell y col., 1967; Cordeiro Manso Filho y col., 2013).

En primera instancia, evaluamos la capacidad de la FSH de activar la vía mTORC1 en las condiciones experimentales mencionadas anteriormente, considerando que dicha vía es uno de los mecanismos moleculares utilizados por la FSH para modular la progresión del ciclo celular en las células de Sertoli y que, además, existen claras evidencias que el metabolismo de L-gln podría ser parte de los mecanismos moleculares que explican la

acción de mTORC1 como sensor de nutrientes (Durán y col., 2012; Chen y col., 2021). Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis muestran que la FSH es incapaz de incrementar los niveles de P-mTORC1 y P-p70S6K en condiciones de privación de L-gln, hecho que confirma que la actividad de mTORC1 depende tanto de la estimulación hormonal como de la presencia del aminoácido L-gln en células de Sertoli inmaduras. Si bien no es una novedad que mTORC1 es el sensor indiscutible de aminoácidos en la célula, los mecanismos moleculares por los cuales realiza esta función se han comenzado a estudiar en los últimos años. El grupo científico liderado por el Dr. Sabatini ha descrito detalladamente la complejidad biológica involucrada en el mantenimiento de la actividad de mTORC1 por aminoácidos esenciales, más específicamente por L-leu: brevemente, el aminoácido L-leu suprime la actividad de la GAP de la proteína G monomérica RagA/B (Chantranupong y col., 2016; Saxton y col., 2016). Considerando que la entrada de L-leu en las células solo es posible mediante un intercambio con L-gln a través del transportador dimérico SLC7A5/SLC3A2, también se postuló que L-gln es relevante para la regulación de la actividad de mTORC1 (Nicklin y col., 2009).

Teniendo en cuenta estos resultados, y con lo discutido hasta este punto, esperaríamos que, como consecuencia de la incapacidad de la FSH para activar mTORC1 en condiciones de ausencia de L-gln, se vea impedida la proliferación. Es por ello que nos propusimos evaluar los parámetros proliferativos bajo condiciones de privación del aminoácido. Al analizar la actividad transcripcional de c-Myc para ambas estrategias ensayadas, observamos que, si bien la privación de L-gln no afecta los niveles de ARNm del factor de transcripción estimulados por FSH, la ausencia de dicho aminoácido bloquea la acción de la FSH sobre la actividad transcripcional de dicho factor, análogamente a lo que se observa en incubaciones con rapamicina. Resultados similares fueron observados en la línea celular humana, INA-6, en la cual la ausencia de L-gln en el medio de cultivo provoca un aumento de la degradación de la proteína c-Myc, sin modificar la transcripción génica

(Effenberger y col., 2017). Los resultados obtenidos apuntan, nuevamente, a la existencia de una regulación a nivel proteico de c-Myc de forma mTORC1 dependiente. En resumidas palabras, como la L-gln es necesaria para mantener la actividad de mTORC1, en ausencia del aminoácido, FSH pierde la capacidad de aumentar la actividad transcripcional de c-Myc en células de Sertoli inmaduras.

Como fue mencionado con anterioridad, dado que c-Myc es uno de los factores transcripcionales mejor conocidos responsables de la expresión de las ciclinas (Bretones y col., 2015), se analizaron también los niveles de expresión de CCND1 y CCND2 y, en concordancia con los hallazgos para la actividad transcripcional de c-Myc, observamos que la FSH es incapaz de inducir la expresión de CCND1 y CCND2 en aquellas incubaciones donde el estímulo hormonal se combina con medios de cultivo sin L-gln o con GPNA. Resultados similares fueron reportados por Li y colaboradores (2023), donde la expresión de CCND1 estimulada por arsénico fue inhibida por GPNA en células uroepiteliales.

Por último, evaluamos la incorporación de BrdU y la marcación del antígeno Ki-67 en células estimuladas con FSH en ausencia de L-gln, como respuesta biológica final. Los resultados presentados demuestran que la FSH es incapaz de inducir la proliferación en ausencia del aminoácido, evidenciado por una menor incorporación de BrdU y una disminución en la marcación de Ki-67 en aquellas incubaciones donde el estímulo hormonal se combina con medios de cultivo sin L-gln o con GPNA. En este contexto, se ha observado que la ausencia de L-gln impide el aumento del número de células progenitoras cardíacas y que su proliferación ocurre de manera dependiente de la concentración de L-gln (Salabei y col., 2015). Asimismo, ha sido demostrado que L-gln promueve la proliferación de células de cáncer de ovario a través de la vía mTORC1 (Yuan y col., 2015).

En conjunto, y a partir de la implementación de dos estrategias experimentales diferentes, evidenciamos que la presencia de L-gln sería un requisito esencial para el efecto

mitogénico de la FSH en las células de Sertoli inmaduras. En este contexto, proponemos que no solo la glucólisis sino también el metabolismo de la L-gln forma parte de los mecanismos moleculares utilizados por la FSH para modular la progresión del ciclo celular y la proliferación en las células de Sertoli a través de la vía mTORC1.

En este punto es importante destacar que, si bien observamos que la falta de L-gln impidió el estímulo de FSH sobre la incorporación de BrdU y la marcación de Ki-67 en células de Sertoli inmaduras, no podemos descartar el hecho de que el efecto biológico observado resulte de la falta de un metabolito derivado de la glutaminólisis, más que de la ausencia de L-gln *per se*. Considerando los resultados obtenidos con respecto a la regulación de la expresión de genes que codifican proteínas involucradas en el metabolismo de L-gln por FSH en células de Sertoli inmaduras, puede deducirse que la actividad de GLS podría ser relevante para la progresión del ciclo celular. Por lo tanto, hipotetizamos que la glutaminólisis estaría cumpliendo un rol preponderante en la regulación de la proliferación de la célula de Sertoli por FSH. Para corroborar esta hipótesis, se efectuaron incubaciones con DON y se evaluó, en primer lugar, el efecto de la inhibición de GLS sobre la activación de mTORC1 mediada por FSH. De esta manera, evidenciamos que la FSH es incapaz de activar la vía de señalización de mTORC1 cuando se inhibe la glutaminólisis. Si se bloquea la capacidad de FSH de activar mTORC1 al estar inhibida la glutaminólisis, ¿qué ocurre con la proliferación celular si se impide la glutaminólisis? En este contexto, se evaluaron parámetros proliferativos bajo la inhibición de la actividad GLS y se observó que los resultados obtenidos están en consonancia con lo observado para la ausencia de L-gln: la FSH no puede promover la actividad transcripcional de c-Myc ni la inducción de *Ccnd1* y *Ccnd2*, así como tampoco es capaz de incrementar la incorporación de BrdU ni la marcación de Ki-67 en células de Sertoli inmaduras cuando se inhibe la actividad de GLS. A la luz de este escenario, podría asumirse que la glutaminólisis es relevante para que la FSH ejerza su acción mitogénica en este tipo celular. En este contexto,

varios autores han demostrado que la progresión del ciclo celular depende del flujo glutaminolítico: el silenciamiento de *Gls1* por ARN de interferencia pequeño redujo notablemente las células positivas para Ki-67 en células madre neurales (Wang Y y col., 2014), el tratamiento con DON de células de cáncer pancreático resistentes a la quimioterapia convencional redujo significativamente la proliferación celular (Chen y col., 2017), y el compuesto 968 (inhibidor selectivo de GLS2) suprime el crecimiento del cáncer de mama de subtipo luminal (Lukey y col., 2019). Asimismo, se ha demostrado que los inhibidores de GLS perjudican el desarrollo de embriones porcinos debido al bloqueo de la vía mTORC1 (Chen y col., 2021). En el año 2012, Durán y colaboradores, basados en evidencias experimentales, propusieron un posible mecanismo molecular que vincula la glutaminólisis con la progresión del ciclo celular mediada por mTORC1. Estos autores demostraron que el α -KG —producto de la glutaminólisis— es, al menos en parte, responsable de la translocación de mTORC1 a la superficie de los lisosomas, debido a que el metabolito promueve el intercambio de GDP por GTP en la proteína RagA/B. Se debe considerar que la translocación de mTORC1 a la superficie lisosomal es indispensable para que la interacción mTORC1/Rheb sea físicamente posible.

A partir de los resultados presentados, podemos suponer que la L-gln y/o sus metabolitos derivados de la glutaminólisis podrían cooperar con la FSH para regular la proliferación de células de Sertoli mediante la activación de mTORC1. Por otro lado, considerando que la inhibición de la actividad GLS conllevaría a la disminución de los niveles de α -KG como producto final de la glutaminólisis, nos propusimos evaluar el posible papel regulador de este metabolito como mediador de los efectos mitogénicos de la FSH en células de Sertoli inmaduras. En primer lugar, se analizaron parámetros proliferativos de células de Sertoli incubadas en presencia de α -KG y se observó que dicho tratamiento condujo a un incremento en la incorporación de BrdU y en la marcación de Ki-67. Para ahondar en el estudio de los mecanismos subyacentes a la respuesta biológica

observada, se evaluaron los niveles de fosforilación de mTORC1 y p70S6K luego de incubar células de Sertoli inmaduras con α -KG. Si bien son resultados preliminares, los mismos son prometedores: se observó un incremento en los niveles de P-mTOR y P-p70S6K, indicativos de la activación de la vía de transducción. De confirmarse estos resultados, α -KG sería propuesto como mediador de la cooperación que ejerce la glutaminólisis sobre el efecto mitogénico de la FSH en células de Sertoli. Curiosamente, Yuan y colaboradores (2020), describieron que, tanto *in vivo* como *in vitro*, α -KG induce hipertrofia muscular a través de su interacción con el receptor de membrana 1 de 2-oxoglutarato (OXGR1), perteneciente a la superfamilia de receptores acoplados a proteína G. Hasta este momento, no se han reportado datos en la literatura sobre la expresión del receptor OXGR1 en células de Sertoli. Si bien el α -KG podría estar participando en la regulación de la proliferación de las células de Sertoli inmaduras, el mecanismo molecular por el cual ejerce sus efectos no ha sido definido aún. Los resultados preliminares presentados en esta tesis no permiten asegurar, por el momento, efectos intracrinicos (participación directa sobre el mecanismo de activación de mTORC1) o descartar efectos autocrinos (a través de su salida al medio extracelular por el transportador SLC13A3 y su posterior interacción con el receptor de membrana OXGR1). Por lo tanto, más estudios serán necesarios para corroborar los posibles mecanismos mediante los cuales este metabolito podría estar participando del mecanismo gatillado por la FSH para regular la proliferación en células de Sertoli inmaduras.

*En conjunto, los resultados aquí presentados como parte del segundo objetivo específico de este trabajo de tesis sugieren que la L-gln y/o sus metabolitos derivados de la glutaminólisis, en particular el α -KG, podrían cooperar con la FSH para regular la proliferación de células de Sertoli mediante la activación de mTORC1. Además, dado que la FSH regula positivamente la glutaminólisis mediante la inducción del gen *Gls2*, el control hormonal de esta vía metabólica podría formar parte de la compleja red de señalización*

que desencadena la FSH para modular la progresión del ciclo celular, asegurando así la proliferación de este tipo celular. Por lo tanto, se puede concluir que la glutaminólisis es necesaria para la proliferación de la célula de Sertoli inducida por la FSH.

CONCLUSIONES

Este trabajo de tesis demuestra que, en la célula de Sertoli inmadura, existe una estrecha relación entre la proliferación y el metabolismo celular —más específicamente, la glucólisis y el metabolismo del aminoácido L-gln— necesaria para lograr el adecuado desarrollo de este tipo celular, que condiciona la capacidad espermatogénica del individuo adulto. En este contexto, hemos demostrado que la FSH promueve, además de la proliferación, la glucólisis y la glutaminólisis; y que estas vías metabólicas son necesarias para la activación de la señal de transducción del mTORC1. Precisamente, mTORC1 es la señal a través de la cual la FSH ejerce su efecto mitogénico sobre la célula de Sertoli. Los resultados presentados en esta tesis refuerzan aún más la existencia de una estrecha relación entre la regulación metabólica y la proliferación, al demostrar que los metabolitos derivados de la glucólisis y la glutaminólisis —específicamente el lactato y el α -KG— participan en el mecanismo de acción hormonal para regular la proliferación celular a través de la activación de mTORC1.

Para finalizar, podemos decir que este trabajo de tesis contribuye de manera significativa al conocimiento sobre la fisiología de la célula de Sertoli inmadura, fenotipo poco explorado aún pese a su relevancia en el desarrollo testicular. Restringido a un único capítulo de dos libros de referencia sobre este tipo celular, el estudio de la célula de Sertoli inmadura se vuelve menester para comprender en profundidad los mecanismos que suceden en el túbulo seminífero que conllevan a un adecuado número de células de Sertoli. Lo que es innegable es el hecho de que tanto la regulación de la proliferación como el metabolismo de la célula de Sertoli son procesos clave cuyo control es crítico para garantizar una espermatogénesis normal. Retomando el legado de Enrico Sertoli, quien describió por primera vez esta célula en el siglo XIX, esta tesis busca extender su aporte inicial hacia la comprensión de los factores y mecanismos moleculares que, en etapas tempranas de la vida, son esenciales para una función reproductiva masculina normal y, por lo tanto, para la fertilidad futura.

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

1. Centola CL, Dasso ME, Soria JD, Riera MF, Meroni SB, Galardo MN (2023). Glycolysis as key regulatory step in FSH-induced rat Sertoli cell proliferation: Role of the mTORC1 pathway. *Biochimie* 214: 145-156. doi: 10.1016/j.biochi.2023.07.007.
2. Centola CL, Dasso ME, Riera MF, Meroni SB, Galardo MN (2024). Role of L-glutamine in the regulation of rat Sertoli cell proliferation by FSH. *Reproduction* 168: e240177. doi: 10.1530/REP-24-0177.

BIBLIOGRAFÍA

- Agathocleous M, Harris WA (2013). Metabolism in physiological cell proliferation and differentiation. *Trends Cell Biol* 23: 484-492.
- Ahmed EA, Barten-van Rijbroek AD, Kal HB, Sadri-Ardekani H, Mizrak SC, van Pelt AM, de Rooij DG (2009). Proliferative activity in vitro and DNA repair indicate that adult mouse and human Sertoli cells are not terminally differentiated, quiescent cells. *Biol Reprod* 80: 1084-1091.
- Almiron I, Chemes H (1988). Spermatogenic onset. II. FSH modulates mitotic activity of germ and Sertoli cells in immature rats. *Int J Androl* 11: 235-246.
- Anawalt BD, Bebb RA, Matsumoto AM, Groome NP, Illingworth PJ, McNeilly AS (1996). Serum inhibin B levels reflect Sertoli cell function in normal men and men with testicular dysfunction. *J Clin Endocrinol Metab* 81: 3341-3345.
- Anderson RA, Cambray N, Hartley PS, McNeilly AS (2002). Expression and localization of inhibin alpha, inhibin/activin betaA and betaB and the activin type II and inhibin beta-glycan receptors in the developing human testis. *Reproduction* 123: 779-788.
- Ando M, Uehara I, Kogure K, Asano Y, Nakajima W, Abe Y, Kawauchi K, Tanaka N (2010). Interleukin 6 enhances glycolysis through expression of the glycolytic enzymes hexokinase 2 and 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase-3. *J Nippon Med Sch* 77: 97-105.
- Angelopoulou R, Balla M, Lavranos G, Chalikias M, Kitsos C, Baka S, Kittas C (2008). Sertoli cell proliferation in the fetal and neonatal rat testis: a continuous phenomenon? *Acta Histochem* 110: 341-347.
- Arambepola NK, Bunick D, Cooke PS (1998). Thyroid hormone effects on androgen receptor messenger RNA expression in rat Sertoli and peritubular cells. *J Endocrinol* 156: 43-50.
- Archambeault DR, Tomaszewski J, Childs AJ, Anderson RA, Yao HH (2011). Testicular somatic cells, not gonocytes, are the major source of functional activin A during testis morphogenesis. *Endocrinology* 152: 4358-4367.
- Archambeault DR, Yao HH (2010). Activin A, a product of fetal Leydig cells, is a unique paracrine regulator of Sertoli cell proliferation and fetal testis cord expansion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 10526-10531.
- Atanassova N, McKinnell C, Walker M, Turner KJ, Fisher JS, Morley M (1999). Permanent effects of neonatal estrogen exposure in rats on reproductive hormone levels, Sertoli cell number, and the efficiency of spermatogenesis in adulthood. *Endocrinology* 140: 5364-5373.
- Atsumi T, Nishio T, Niwa H, Takeuchi J, Bando H, Shimizu C, Yoshioka N, Bucala R, 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.
- Averous J, Fonseca BD, Proud CG (2008). Regulation of cyclin D1 expression by mTORC1 signaling requires eukaryotic initiation factor 4E-binding protein 1. *Oncogene* 27: 1106-1113.

- Avissar NE, Sax HC, Toia L (2008). In human enterocytes, GLN transport and ASCT2 surface expression induced by short-term EGF are MAPK, PI3K, and Rho-dependent. *Dig Dis Sci* 53: 2113-2125.
- Barakat B, O'Connor AE, Gold E, de Kretser DM, Loveland KL (2008). Inhibin, activin, follistatin and FSH serum levels and testicular production are highly modulated during the first spermatogenic wave in mice. *Reproduction* 136: 345-359.
- Barton DE, Yang-Feng TL, Mason AJ, Seeburg PH, Francke U (1989). Mapping of genes for inhibin subunits alpha, beta A, and beta B on human and mouse chromosomes and studies of jsd mice. *Genomics* 5: 91-99.
- Bautista SJ, Boras I, Vissa A, Mecica N, Yip CM, Kim PK, Antonescu CN (2018). mTOR complex 1 controls the nuclear localization and function of glycogen synthase kinase 3 β . *J Biol Chem* 293: 14723-14739.
- Bell JL, Baron DN (1968). Subcellular distribution of the isoenzymes of NADP isocitrate dehydrogenase in rat liver and heart. *Enzymol Biol Clin (Basel)* 9: 393-399.
- Benjamin D, Hall MN (2019). Lactate jump-starts mTORC1 in cancer cells. *EMBO Rep* 20: e48302.
- Berndtson WE, Igboeli G, Pickett BW (1987). Relationship of absolute numbers of Sertoli cells to testicular size and spermatogenesis in young beef bulls. *J Anim Sci* 64: 241-246.
- Bhutia YD, Ganapathy V (2016). Glutamine transporters in mammalian cells and their functions in physiology and cancer. *Biochim Biophys Acta* 1863: 2531-2539.
- Boitani C, Stefanini M, Fragale A, Morena AR (1995). Activin stimulates Sertoli cell proliferation in a defined period of rat testis development. *Endocrinology* 136: 5438-5444.
- Bremner WJ, Millar MR, Sharpe RM, Saunders PT (1994). Immunohistochemical localization of androgen receptors in the rat testis: evidence for stage-dependent expression and regulation by androgens. *Endocrinology* 135: 1227-1234.
- Bretones G, Delgado MD, Leon J (2015). Myc and cell cycle control. *Biochim Biophys Acta* 1849: 506-516.
- Broecker-Preuss M, Becher-Boveleth N, Bockisch A, Dührsen U, Müller S (2017). Regulation of glucose uptake in lymphoma cell lines by c-MYC- and PI3K-dependent signaling pathways and impact of glycolytic pathways on cell viability. *J Transl Med* 15: 158.
- Buczkowska J, Szeliga M (2023). Two Faces of Glutaminase GLS2 in Carcinogenesis. *Cancers (Basel)* 15: 5566.
- Buzek SW, Sanborn BM (1988). Increase in testicular androgen receptor during sexual maturation in the rat. *Biol Reprod* 39: 39-49.
- Buzzard JJ, Farnworth PG, De Kretser DM, O'Connor AE, Wreford NG, Morrison JR (2003a). Proliferative phase Sertoli cells display a developmentally regulated response to activin in vitro. *Endocrinology* 144: 474-483.

- Buzzard JJ, Wreford NG, Morrison JR (2003b). Thyroid hormone, retinoic acid, and testosterone suppress proliferation and induce markers of differentiation in cultured rat sertoli cells. *Endocrinology* 144: 3722-3731.
- Byun JK, Park M, Yun JW, Lee J, Kim JS, Cho SJ, Lee YM, Lee IK, Choi YK, Park KG (2019). Oncogenic KRAS signaling activates mTORC1 through COUP-TFII-mediated lactate production. *EMBO Rep* 20: e47451.
- Cahn RD, Zwilling E, Kaplan NO, Levine L (1962). Nature and Development of Lactic Dehydrogenases: The two major types of this enzyme form molecular hybrids which change in makeup during development. *Science* 136: 962-969.
- Cargill KR, Stewart CA, Park EM, Ramkumar K, Gay CM, Cardnell RJ, Wang Q, Diao L, Shen L, Fan YH, Chan WK, Lorenzi PL, Oliver TG, Wang J, Byers LA (2021). Targeting MYC-enhanced glycolysis for the treatment of small cell lung cancer. *Cancer Metab* 9: 33.
- Carreau S, Hess RA (2010). Oestrogens and spermatogenesis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 365: 1517-1535.
- Carroll B, Maetzel D, Maddocks ODK, Otten G, Ratcliff M, Smith GR, Dunlop EA, Passos JF, Davies OR, Jaenisch R, Tee AR, Sarkar S, Korolchuk VI (2016) Control of TSC2-Rheb signaling axis by arginine regulates mTORC1 activity. *eLife* 5: e11058.
- Cavazzini D, Galdieri M, Ottonello S (1996). Retinoic acid synthesis in the somatic cells of rat seminiferous tubules. *Biochim Biophys Acta* 1313: 139-145.
- Certo M, Llibre A, Lee W, Mauro C (2022). Understanding lactate sensing and signalling. *Trends Endocrinol Metab* 33: 722-735.
- Chantranupong L, Scaria SM, Saxton RA, Gygi MP, Shen K, Wyant GA, Wang T, Harper JW, Gygi SP, Sabatini DM (2016). The CASTOR Proteins Are Arginine Sensors for the mTORC1 Pathway. *Cell* 165: 153-164.
- Chen PR, Lucas CG, Spate LD, Prather RS (2021). Glutaminolysis is involved in the activation of mTORC1 in vitro-produced porcine embryos. *Mol Reprod Dev* 88: 490-499.
- Chen R, Lai LA, Sullivan Y, Wong M, Wang L, Riddell J, Jung L, Pillarisetty VG, Brentnall TA, Pan S (2017). Disrupting glutamine metabolic pathways to sensitize gemcitabine-resistant pancreatic cancer. *Sci Rep* 7: 7950.
- Chiang GG, Abraham RT (2005). Phosphorylation of mammalian target of rapamycin (mTOR) at Ser-2448 is mediated by p70S6 kinase. *J Biol Chem* 280: 25485-25490.
- Christofk HR, Vander Heiden MG, Harris MH, Ramanathan A, Gerszten RE, Wei R, Fleming MD, Schreiber SL, Cantley LC (2008). The M2 splice isoform of pyruvate kinase is important for cancer metabolism and tumour growth. *Nature* 452: 230-233.
- Clermont Y, Perey B (1957). Quantitative study of the cell population of the seminiferous tubules in immature rats. *Am J Anat* 100: 241-267.
- Cole MD (1986). The myc oncogene: its role in transformation and differentiation. *Annu Rev Genet* 20: 361-384.

- Conradi LC, Brajic A, Cantelmo AR, Bouché A, Kalucka J, Pircher A, Brüning U, Teuwen LA, Vinckier S, Ghesquière B, Dewerchin M, Carmeliet P (2017). Tumor vessel disintegration by maximum tolerable PFKFB3 blockade. *Angiogenesis* 20: 599-613.
- Cooke PS, Hess RA, Porcelli J, Meisami E (1991). Increased sperm production in adult rats after transient neonatal hypothyroidism. *Endocrinology* 129: 244-248.
- Cooke PS, Meisami E (1991). Early hypothyroidism in rats causes increased adult testis and reproductive organ size but does not change testosterone levels. *Endocrinology* 129: 237-243.
- Cooke PS, Zhao YD, Bunick D (1994). Triiodothyronine inhibits proliferation and stimulates differentiation of cultured neonatal Sertoli cells: possible mechanism for increased adult testis weight and sperm production induced by neonatal goitrogen treatment. *Biol Reprod* 51: 1000-1005.
- Copp J, Manning G, Hunter T (2009). TORC-specific phosphorylation of mammalian target of rapamycin (mTOR): phospho-Ser2481 is a marker for intact mTOR signaling complex 2. *Cancer Res* 69: 1821-1827.
- Cordeiro Manso Filho H, da Silva Rodrigues AK, Manso E, de Lima E, Manso HE, Wanderley EK, Girao Abreu JM (2013). Low glutamine concentration is observed in equine testis. *FASEB J* 27: 631.19.
- Crépieux P, Marion S, Martinat N, Fafeur V, Vern YL, Kerboeuf D, Guillou F, Reiter E (2001). The ERK-dependent signalling is stage-specifically modulated by FSH, during primary Sertoli cell maturation. *Oncogene* 20: 4696-4709.
- Curthoys NP, Watford M (1995). Regulation of glutaminase activity and glutamine metabolism. *Annual Review of Nutrition* 15: 133-159.
- Cuyàs E, Corominas-Faja B, Joven J, Menendez JA (2014). Cell cycle regulation by the nutrient-sensing mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway. *Methods Mol Biol* 1170: 113-144.
- Dang CV (1999). c-Myc target genes involved in cell growth, apoptosis, and metabolism. *Mol Cell Biol* 19: 1-11.
- Dang CV (2012). MYC on the path to cancer. *Cell* 149: 22-35.
- Dang CV, Le A, Gao P (2009). MYC-induced cancer cell energy metabolism and therapeutic opportunities. *Clin Cancer Res* 15: 6479-6483.
- Dattatreyamurty B, Figgs LW, Reichert LE Jr (1987). Physical and functional association of follitropin receptors with cholera toxin-sensitive guanine nucleotide-binding protein. *J Biol Chem* 262: 11737-11745.
- De Franca LR, Hess RA, Cooke PS, Russell LD (1995). Neonatal hypothyroidism causes delayed Sertoli cell maturation in rats treated with propylthiouracil: evidence that the Sertoli cell controls testis growth. *Anat Rec* 242: 57-69.
- de Winter JP, Vanderstichele HM, Verhoeven G, Timmerman MA, Wesseling JG, de Jong FH (1994). Peritubular myoid cells from immature rat testes secrete activin-A and express activin receptor type II in vitro. *Endocrinology* 135: 759-767.

- DeBerardinis RJ, Cheng T (2010). Q's next: the diverse functions of glutamine in metabolism, cell biology and cancer. *Oncogene* 29: 313-324.
- DeBerardinis RJ, Lum JJ, Hatzivassiliou G, Thompson CB (2008). The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell Metab* 7: 11-20.
- Deshpande A, Sicinski P, Hinds PW (2005). Cyclins and cdks in development and cancer: a perspective. *Oncogene* 24: 2909-2915.
- Di H, Zhang X, Guo Y, Shi Y, Fang C, Yuan Y, Wang J, Shang C, Guo W, Li C (2018). Silencing LDHA inhibits proliferation, induces apoptosis and increases chemosensitivity to temozolomide in glioma cells. *Oncol Lett* 15: 5131-5136.
- Dong G, Mao Q, Xia W, Xu Y, Wang J, Xu L, Jiang F (2016). PKM2 and cancer: The function of PKM2 beyond glycolysis. *Oncol Lett* 11: 1980-1986.
- Du JY, Wang LF, Wang Q, Yu LD (2015). miR-26b inhibits proliferation, migration, invasion and apoptosis induction via the downregulation of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase-3 driven glycolysis in osteosarcoma cells. *Oncol Rep* 33: 1890-1898.
- Durán RV, Oppliger W, Robitaille AM, Heiserich L, Skendaj R, Gottlieb E, Hall MN (2012). Glutaminolysis activates Rag-mTORC1 signaling. *Mol Cell* 47: 349-358.
- Dyson N (1998). The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes Dev* 12: 2245-2262.
- Effenberger M, Bommert KS, Kunz V, Kruk J, Leich E, Rudelius M, Bargou R, Bommert K (2017). Glutaminase inhibition in multiple myeloma induces apoptosis via MYC degradation. *Oncotarget* 8: 85858-85867.
- Eisenberg D, Gill HS, Pfluegl GM, Rotstein SH (2000). Structure-function relationships of glutamine synthetases. *Biochim Biophys Acta* 1477: 122-145.
- Eisenman RN (2001). Deconstructing myc. *Genes Dev* 15: 2023-2030.
- Eleftheriadis T, Pissas G, Antoniadis G, Tsogka K, Sounidaki M, Liakopoulos V, Stefanidis I (2016). Indoleamine 2,3-dioxygenase downregulates T-cell receptor complex ζ -chain and c-Myc, and reduces proliferation, lactate dehydrogenase levels and mitochondrial glutaminase in human T-cells. *Mol Med Rep* 13: 925-932.
- El-Sisi AE, Sokar SS, Abu-Risha SE, El-Mahrouk SR (2017). Oxamate potentiates taxol chemotherapeutic efficacy in experimentally-induced solid ehrlich carcinoma (SEC) in mice. *Biomed Pharmacother* 95: 1565-1573.
- Estévez-García IO, Cordoba-Gonzalez V, Lara-Padilla E, Fuentes-Toledo A, Falfán-Valencia R, Campos-Rodríguez R, Abarca-Rojano E (2014). Glucose and glutamine metabolism control by APC and SCF during the G1-to-S phase transition of the cell cycle. *J Physiol Biochem* 70: 569-581.
- Fawcett DW, Neaves WB, Flores MN (1973). Comparative observations on intertubular lymphatics and the organization of the interstitial tissue of the mammalian testis. *Biol Reprod* 9: 500-532.

- Figueiredo AF, Franca LR, Hess RA, Costa GM (2016). Sertoli cells are capable of proliferation into adulthood in the transition region between the seminiferous tubules and the rete testis in Wistar rats. *Cell Cycle* 15: 2486-2496.
- Fisher JS, Millar MR, Majdic G, Saunders PT, Fraser HM, Sharpe RM (1997). Immunolocalisation of oestrogen receptor-alpha within the testis and excurrent ducts of the rat and marmoset monkey from perinatal life to adulthood. *J Endocrinol* 153: 485-495.
- Franchimont P, Demoulin A, Verstraelen-Proyard J, Hazee-Hagelstein MT, Tunbridge WM (1979). Identification in human seminal fluid of an inhibin-like factor which selectively regulates FSH secretion. *J Reprod Fertil Suppl* 26: 123-133.
- Frieg B, Görg B, Gohlke H, Häussinger D (2021). Glutamine synthetase as a central element in hepatic glutamine and ammonia metabolism: novel aspects. *Biol Chem* 402: 1063-1072.
- Frigerio F, Casimir M, Carobbio S, Maechler P (2008). Tissue specificity of mitochondrial glutamate pathways and the control of metabolic homeostasis. *Biochim Biophys Acta* 1777: 965-972.
- Galardo MN, Gorga A, Merlo JP, Regueira M, Pellizzari EH, Cigorruga SB, Riera MF, Meroni SB (2017). Participation of HIFs in the regulation of Sertoli cell lactate production. *Biochimie* 132: 9-18.
- Galardo MN, Regueira M, Riera MF, Pellizzari EH, Cigorruga SB, Meroni SB (2014). Lactate regulates rat male germ cell function through reactive oxygen species. *PLoS One* 9: e88024.
- Galardo MN, Riera MF, Pellizzari EH, Chemes HE, Venara MC, Cigorruga SB, Meroni SB (2008). Regulation of expression of Sertoli cell glucose transporters 1 and 3 by FSH, IL1 beta, and bFGF at two different time-points in pubertal development. *Cell Tissue Res* 334: 295-304.
- Galardo MN, Riera MF, Pellizzari EH, Cigorruga SB, Meroni SB (2007). The AMP-activated protein kinase activator, 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-ribofuranoside, regulates lactate production in rat Sertoli cells. *J Mol Endocrinol* 39: 279-288.
- Galardo MN, Riera MF, Pellizzari EH, Sobarzo C, Scarcelli R, Denduchis B, Lustig L, Cigorruga SB, Meroni SB (2010). Adenosine regulates Sertoli cell function by activating AMPK. *Mol Cell Endocrinol* 330: 49-58.
- Gao X, Wang H, Yang JJ, Liu X, Liu ZR (2012). Pyruvate kinase M2 regulates gene transcription by acting as a protein kinase. *Mol Cell* 45: 598-609.
- Ge H, Weiszmann J, Reagan JD, Gupte J, Baribault H, Gyuris T, Chen JL, Tian H, Li Y (2008). Elucidation of signaling and functional activities of an orphan GPCR, GPR81. *J Lipid Res* 49: 797-803.
- Gomez M, Navarro-Sabate A, Manzano A, Duran J, Obach M, Bartrons R (2009). Switches in 6-phosphofructo-2-kinase isoenzyme expression during rat sperm maturation. *Biochem Biophys Res Commun* 387: 330-335.
- Gondos B, Berndtson WE (1993). Postnatal and Pubertal Development. In: The Sertoli cell. Russell LD, Griswold MD, editors. Clearwater, FL: Cache River Press 116-154.

- Gorga A, Rindone G, Regueira M, Riera MF, Pellizzari EH, Cigorraga SB, Meroni SB, Galardo MN (2018). HIF involvement in the regulation of rat Sertoli cell proliferation by FSH. *Biochem Biophys Res Commun* 502: 508-514.
- Gorga A, Rindone GM, Regueira M, Pellizzari EH, Camberos MC, Cigorraga SB, Riera MF, Galardo MN, Meroni SB (2017). PPAR γ activation regulates lipid droplet formation and lactate production in rat Sertoli cells. *Cell Tissue Res* 369: 611-624.
- Grandori C, Cowley SM, James LP, Eisenman RN (2000). The Myc/Max/Mad network and the transcriptional control of cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* 16: 653-699.
- Gregory MA, Qi Y, Hann SR (2003). Phosphorylation by Glycogen Synthase Kinase-3 controls c-Myc proteolysis and subnuclear localization. *J Biol Chem* 278: 51606-51612.
- Grist JT, Jarvis LB, Georgieva Z, Thompson S, Kaur Sandhu H, Burling K, Clarke A, Jackson S, Wills M, Gallagher FA, Jones JL (2018). Extracellular lactate: a novel measure of T Cell proliferation. *J Immunol* 200: 1220-1226.
- Griswold M, Mably E, Fritz IB (1975). Stimulation by follicle stimulating hormone and dibutyryl cyclic AMP of incorporation of 3H-thymidine into nuclear DNA of cultured Sertoli cell-enriched preparations from immature rats. *Curr Top Mol Endocrinol* 2: 413-420.
- Griswold MD (1995). Interactions between germ cells and Sertoli cells in the testis. *Biol Reprod* 52: 211-216.
- Griswold MD, Mably ER, Fritz IB (1976). FSH stimulation of DNA synthesis in Sertoli cells in culture. *Mol Cell Endocrinol* 4: 139-149.
- Grootegoed JA, Peters MJ, Mulder E, Rommerts FF, Van der Molen HJ (1977). Absence of a nuclear androgen receptor in isolated germinal cells of rat testis. *Mol Cell Endocrinol* 9: 159-167.
- Grootegoed, AJ; Oonk RB, Jansen R, Van Der Molen HJ (1986). Metabolism of radiolabelled energy-yielding substrates by rat Sertoli cells. *J Reprod Fertil* 77: 109-118.
- Guertin DA, Sabatini DM (2007). Defining the role of mTOR in cancer. *Cancer Cell* 12: 9-22.
- Hansen GE, Gibson GE (2022). The α -Ketoglutarate Dehydrogenase Complex as a Hub of Plasticity in Neurodegeneration and Regeneration. *Int J Mol Sci* 23: 12403.
- Hardie DG, Schaffer BE, Brunet A (2016). AMPK: An Energy-Sensing Pathway with Multiple Inputs and Outputs. *Trends Cell Biol* 26: 190-201.
- Haywood M, Spaliviero J, Jimenez M, King NJ, Handelsman DJ, Allan CM (2003). Sertoli and germ cell development in hypogonadal (hpg) mice expressing transgenic follicle stimulating hormone alone or in combination with testosterone. *Endocrinology* 144: 509-517.
- Hazra R, Corcoran L, Robson M, McTavish KJ, Upton D, Handelsman DJ, Allan CM (2013). Temporal role of Sertoli cell androgen receptor expression in spermatogenic development. *Mol Endocrinol* 27: 12-24.

- Heckert LL, Griswold MD (2002). The expression of the follicle-stimulating hormone receptor in spermatogenesis. *Recent Prog Horm Res* 57: 129-148.
- Hess RA, Carnes K (2004). The role of estrogen in testis and the male reproductive tract: a review and species comparison. *Anim Reprod* 1: 5-30.
- Hosoi H, Dilling MB, Liu LN, Danks MK, Shikata T, Sekulic A, Abraham RT, Lawrence JC Jr, Houghton PJ (1998). Studies on the mechanism of resistance to rapamycin in human cancer cells. *Mol Pharmacol* 54: 815-824.
- Hu J, Cai M, Liu Y, Liu B, Xue X, Ji R, Bian X, Lou S (2020). The roles of GRP81 as a metabolic sensor and inflammatory mediator. *J Cell Physiol* 235: 8938-8950.
- Hu X, Xu Q, Wan H, Hu Y, Xing S, Yang H, Gao Y, He Z (2020). PI3K-Akt-mTOR/PFKFB3 pathway mediated lung fibroblast aerobic glycolysis and collagen synthesis in lipopolysaccharide-induced pulmonary fibrosis. *Lab Invest* 100: 801-811.
- Hu J, Ling Z, Li W, Su Z, Lu J, Zeng Q, Cheng B & Tao X (2023). Glutamine promotes the proliferation of epithelial cells via mTOR/S6 pathway in oral lichen planus. *J Oral Pathol Med* 52: 150-160.
- Huang F, Zhang Q, Ma H, Lv Q, Zhang T (2014). Expression of glutaminase is upregulated in colorectal cancer and of clinical significance. *Int J Clin Exp Pathol* 7: 1093-1100.
- Hue L, Rider MH (1987). Role of fructose 2,6-bisphosphate in the control of glycolysis in mammalian tissues. *Biochem J* 245: 313-324.
- Imamura K, Tanaka T (1972). Multimolecular forms of pyruvate kinase from rat and other mammalian tissues. I. Electrophoretic studies. *J Biochem* 71: 1043-1051.
- Irrcher I, Walkinshaw DR, Sheehan TE, Hood DA (2008). Thyroid hormone (T3) rapidly activates p38 and AMPK in skeletal muscle in vivo. *J Appl Physiol* 104: 178-185.
- Jiang W, Zhu Z, Thompson H J (2008). Modulation of the activities of amp-activated protein kinase, protein kinase b, and mammalian target of rapamycin by limiting energy availability with 2-deoxyglucose. *Mol Carcinog* 47: 616-628.
- Jin J, Bai L, Wang D, Ding W, Cao Z, Yan P, Li Y, Xi L, Wang Y, Zheng X, Wei H, Ding C, Wang Y (2023). SIRT3-dependent delactylation of cyclin E2 prevents hepatocellular carcinoma growth. *EMBO Rep* 24: e56052.
- Johnson DG, Walker CL (1999). Cyclins and cell cycle checkpoints. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 39: 295-312.
- Johnson L, Zane RS, Petty CS, Neaves WB (1984). Quantification of the human Sertoli cell population: its distribution, relation to germ cell numbers, and age-related decline. *Biol Reprod* 31: 785-795.
- Jurica MS, Mesecar A, Heath PJ, Shi W, Nowak T, Stoddard BL (1998). The allosteric regulation of pyruvate kinase by fructose-1,6-bisphosphate. *Structure* 6: 195-210.
- Jutte NHPM, Grootegoed JA, Rommerts FFG, Van der Molen HJ (1981). Exogenous lactate is essential for metabolic activities in isolated rat spermatocytes and spermatids. *J Reprod Fertil* 62: 399-405.

- Kaiser GR, Monteiro SC, Gelain DP, Souza LF, Perry MLS, Bernard EA (2005). Metabolism of amino acids by cultured rat Sertoli cells. *Metabolism* 54: 515–521.
- Kalkat M, De Melo J, Hickman KA, Lourenco C, Redel C, Resetca D, Tamachi A, Tu WB, Penn LZ (2017). MYC deregulation in primary human cancers. *Genes (Basel)* 8: 151.
- Katt WP, Lukey MJ, Cerione RA (2017). A tale of two glutaminases: homologous enzymes with distinct roles in tumorigenesis. *Future Med Chem* 9: 223-243.
- Kes MMG, Van den Bossche J, Griffioen AW, Huijbers EJM (2020). Oncometabolites lactate and succinate drive pro-angiogenic macrophage response in tumors. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer* 1874: 188427.
- Kierans SJ, Taylor CT (2021). Regulation of glycolysis by the hypoxia-inducible factor (HIF): Implications for cellular physiology. *J Physiol* 599: 23-37.
- Kiessling A, Sperl B, Hollis A, Eick D, Berg T (2006). Selective inhibition of c-Myc/Max dimerization and DNA binding by small molecules. *Chem Biol* 13: 745-751.
- Kim B, Li J, Jang C, Arany Z (2017). Glutamine fuels proliferation but not migration of endothelial cells. *EMBO J* 36: 2321-2333.
- Kleszcz R, Paluszczak J, Krajka-Kuźniak V, Baer-Dubowska W (2018). The inhibition of c-MYC transcription factor modulates the expression of glycolytic and glutaminolytic enzymes in FaDu hypopharyngeal carcinoma cells. *Adv Clin Exp Med* 27: 735-742.
- Kovacevic Z, McGivan JD (1983). Mitochondrial metabolism of glutamine and glutamate and its physiological significance. *Physiol Rev* 63: 547-605.
- Krebs HA (1980). In: *Glutamine Metabolism, Enzymology and Regulation*. (Mora J, Palacios R, eds.), pp. 319-329, Academic Press, London, Reino Unido.
- Labarca C, Paigen K (1980). A simple, rapid, and sensitive DNA assay procedure. *Anal Biochem* 102: 344-352.
- Lama-Sherpa TD, Jeong MH, Jewell JL (2023). Regulation of mTORC1 by the Rag GTPases. *Biochem Soc Trans* 51: 655-664.
- Lampe KJ, Namba RM, Silverman TR, Bjugstad KB, Mahoney MJ (2009). Impact of lactic acid on cell proliferation and free radical-induced cell death in monolayer cultures of neural precursor cells. *Biotechnol Bioeng* 103: 1214-1223.
- Land SC, Tee AR (2007). Hypoxia-inducible factor 1alpha is regulated by the mammalian target of rapamycin (mTOR) via an mTOR signaling motif. *J Biol Chem* 282: 20534-20543.
- Lee MN, Ha SH, Kim J, Koh A, Lee CS, Kim JH, Jeon H, Kim DH, Suh PG, Ryu SH (2009). Glycolytic flux signals to mTOR through glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-mediated regulation of Rheb. *Mol Cell Biol* 29: 3991-4001.
- Lee YZ, Yang CW, Chang HY, Hsu HY, Chen IS, Chang HS, Lee CH, Lee JC, Kumar CR, Qiu YQ, Chao YS, Lee SJ (2014). Discovery of selective inhibitors of Glutaminase-2, which inhibit mTORC1, activate autophagy and inhibit proliferation in cancer cells. *Oncotarget* 5: 6087-6101.

- Li J, Zhang S, Liao D, Zhang Q, Chen C, Yang X, Jiang D, Pang J (2022). Overexpression of PFKFB3 promotes cell glycolysis and proliferation in renal cell carcinoma. *BMC Cancer* 22: 83.
- Li M, Li C, Allen A, Stanley CA, Smith TJ (2012). The structure and allosteric regulation of mammalian glutamate dehydrogenase. *Arch Biochem Biophys* 519: 69-80.
- Li S, Pei L, Zhou Q, Fu Z, Zhang L, Liu P, Yan N, Xi S (2023). SLC1A5 regulates cell proliferation and self-renewal through β -catenin pathway mediated by redox signaling in arsenic-treated uroepithelial cells. *Ecotoxicol Environ Saf* 262: 115204.
- Li SS, O'Brien DA, Hou EW, Versola J, Rockett DL, Eddy EM (1989). Differential activity and synthesis of lactate dehydrogenase isozymes A (muscle), B (heart), and C (testis) in mouse spermatogenic cells. *Biol Reprod* 40: 173-180.
- Li X, Lu W, Hu Y, Wen S, Qian C, Wu W, Huang P (2013). Effective inhibition of nasopharyngeal carcinoma in vitro and in vivo by targeting glycolysis with oxamate. *Int J Oncol* 43: 1710-1718.
- Li X, Yang Y, Zhang B, Lin X, Fu X, An Y, Zou Y, Wang JX, Wang Z, Yu T (2022). Lactate metabolism in human health and disease. *Signal Transduct Target Ther* 7: 305.
- Li Z, Zhang H (2016). Reprogramming of glucose, fatty acid and amino acid metabolism for cancer progression. *Cell Mol Life Sci* 73: 377-392.
- Li XZ, Yan XH (2019). Sensors for the mTORC1 pathway regulated by amino acids. *J Zhejiang Univ Sci B* 20: 699-712.
- Lim K, Hwang BD (1995). Follicle-stimulating hormone transiently induces expression of protooncogene c-myc in primary Sertoli cell cultures of early pubertal and prepubertal rat. *Mol Cell Endocrinol* 111: 51-56.
- Ling N, Ying SY, Ueno N, Shimasaki S, Esch F, Hotta M (1986). A homodimer of the beta-subunits of inhibin A stimulates the secretion of pituitary follicle stimulating hormone. *Biochem Biophys Res Commun* 138: 1129-1137.
- Liu C, Wu J, Zhu J, Kuei C, Yu J, Shelton J, Sutton SW, Li X, Yun SJ, Mirzadegan T, Mazur C, Kamme F, Lovenberg TW (2009). Lactate inhibits lipolysis in fat cells through activation of an orphan G-protein-coupled receptor, GPR81. *J Biol Chem* 284: 2811-2822.
- Liu J, Levens D (2006). Making myc. *Curr Top Microbiol Immunol* 302: 1-32.
- Liu S, He L, Yao K (2018). The antioxidative function of alpha-ketoglutarate and its applications. *Biomed Res Int* 2018: 3408467.
- Liu YC, Li F, Handler J, Huang CR, Xiang Y, Neretti N, Sedivy JM, Zeller KI, Dang CV (2008). Global regulation of nucleotide biosynthetic genes by c-Myc. *PLoS One* 3: e2722.
- Lu J, Chen M, Tao Z, Gao S, Li Y, Cao Y, Lu C, Zou X (2017). Effects of targeting SLC1A5 on inhibiting gastric cancer growth and tumor development *in vitro* and *in vivo*. *Oncotarget* 8: 76458-76467.
- Lucas TF, Siu ER, Esteves CA, Monteiro HP, Oliveira CA, Porto CS, Lazari MF (2008). 17beta-estradiol induces the translocation of the estrogen receptors ESR1 and ESR2 to the cell

- membrane, MAPK3/1 phosphorylation and proliferation of cultured immature rat Sertoli cells. *Biol Reprod* 78: 101-114.
- Lucas TFG, Lazari MFM, Porto CS (2014). Differential role of the estrogen receptors ESR1 and ESR2 on the regulation of proteins involved with proliferation and differentiation of Sertoli cells from 15-day-old rats. *Mol Cell Endocrinol* 382: 84–96.
 - Lukey MJ, Cluntun AA, Katt WP, Lin MJ, Druso JE, Ramachandran S, Erickson JW, Le HH, Wang ZE, Blank B, Greene KS, Cerione RA (2019). Liver-type glutaminase GLS2 is a druggable metabolic node in luminal-subtype breast cancer. *Cell Rep* 29: 76-88.
 - Lunt SY, Vander Heiden MG (2011). Aerobic glycolysis: meeting the metabolic requirements of cell proliferation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 27: 441-464.
 - Mahauad-Fernandez WD, Yang YC, Lai I, Park J, Yao L, Evans JW, Burnett GL, Gill A, Smith JAM, Singh M, Felsher DW (2022). Bi-steric mTORC1-selective Inhibitors activate 4EBP1 reversing MYC-induced tumorigenesis and synergize with immunotherapy. *bioRxiv* 478208.
 - Markert CL, Shaklee JB, Whitt GS (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.
 - Marsin AS, Bouzin C, Bertrand L, Hue L (2002). The stimulation of glycolysis by hypoxia in activated monocytes is mediated by AMP-activated protein kinase and inducible 6-phosphofructo-2-kinase. *J Biol Chem* 277: 30778-30783.
 - Martin M, Ferrier B, Baverel G (1989). Transport and utilization of alpha-ketoglutarate by the rat kidney in vivo. *Pflugers Arch* 413: 217-224.
 - Mason AJ, Hayflick JS, Ling N, Esch F, Ueno N, Ying SY (1985). Complementary DNA sequences of ovarian follicular fluid inhibin show precursor structure and homology with transforming growth factor-beta. *Nature* 318: 659-663.
 - Mateus I, Feijó M, Espínola LM, Vaz CV, Correia S, Socorro S (2018). Glucose and glutamine handling in the Sertoli cells of transgenic rats overexpressing regucalcin: plasticity towards lactate production. *Sci Rep* 8: 10321.
 - Matzuk MM, Finegold MJ, Su JG, Hsueh AJ, Bradley A (1992). Alphainhibin is a tumour-suppressor gene with gonadal specificity in mice. *Nature* 360: 313-319.
 - Matzuk MM, Kumar TR, Bradley A (1995). Different phenotypes for mice deficient in either activins or activin receptor type II. *Nature* 374: 356-360.
 - Mazurek S (2010). Pyruvate kinase type M2: a key regulator of the metabolic budget system in tumor cells. *Int J Biochem Cell Biol* 43: 969-980.
 - McKeehan WL (1982). Glycolysis, glutaminolysis and cell proliferation. *Cell Biol Intern Reports* 6: 635-646.
 - Means AR, Huckins C (1974). Coupled events in the early biochemical actions of FSH on the Sertoli cells of the testis. *Curr Top Mol Endocrinol* 1: 145-165.
 - Metallo CM, Gameiro PA, Bell EL, Mattaini KR, Yang J, Hiller K, Jewell CM, Johnson ZR, Irvine DJ, Guarente L, Kelleher JK, Vander Heiden MG, Iliopoulos O, Stephanopoulos G (2011).

- Reductive glutamine metabolism by IDH1 mediates lipogenesis under hypoxia. *Nature* 481: 380-384.
- Miskimins WK, Ahn HJ, Kim JY, Ryu S, Jung YS, Choi JY (2014). Synergistic anti-cancer effect of phenformin and oxamate. *PLoS One* 9: e85576.
 - Mullen AR, Wheaton WW, Jin ES, Chen PH, Sullivan LB, Cheng T, Yang Y, Linehan WM, Chandel NS, DeBerardinis RJ (2011). Reductive carboxylation supports growth in tumour cells with defective mitochondria. *Nature* 481: 385-388.
 - Nakanishi T, Kekuda R, Fei YJ, Hatanaka T, Sugawara M, Martindale RG, Leibach FH, Prasad PD, Ganapathy V (2001). Cloning and functional characterization of a new subtype of the amino acid transport system N. *Am J Physiol Cell Physiol* 281: 1757-1768.
 - Navarro-Sabaté A, Manzano A, Riera L, Rosa JL, Ventura F, Bartrons R (2001). The human ubiquitous 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase gene (PFKFB3): promoter characterization and genomic structure. *Gene* 264: 131-138.
 - Nemenoff RA, Price DJ, Mendelsohn MJ, Carter EA, Avruch J (1988). An S6 kinase activated during liver regeneration is related to the insulin-stimulated S6 kinase in H4 hepatoma cells. *J Biol Chem* 263: 19455-19460.
 - Nevins JR (2001). The Rb/E2F pathway and cancer. *Hum Mol Genet* 10: 699-703.
 - Nicholls PK, Harrison CA, Rainczuk KE, Wayne Vogl A, Stanton PG (2013). Retinoic acid promotes Sertoli cell differentiation and antagonises activin-induced proliferation. *Mol Cell Endocrinol* 377: 33-43.
 - Nicklin P, Bergman P, Zhang B, Triantafellow E, Wang H, Nyfeler B, Yang H, Hild M, Kung C, Wilson C (2009). Bidirectional transport of amino acids regulates mTOR and autophagy. *Cell* 136: 521-534.
 - Nitta H, Bunick D, Hess RA, Janulis L, Newton SC, Millette CF (1993). Germ cells of the mouse testis express P450 aromatase. *Endocrinology* 132: 1396-1401.
 - Obach M, Navarro-Sabaté A, Caro J, Kong X, Duran J, Gómez M, Perales JC, Ventura F, Rosa JL, Bartrons R (2004). 6-Phosphofructo-2-kinase (pfkfb3) gene promoter contains hypoxia-inducible factor-1 binding sites necessary for transactivation in response to hypoxia. *J Biol Chem* 279: 53562-53570.
 - Ohno Y, Nakatani M, Ito T, Matsui Y, Ando K, Suda Y, Ohashi K, Yokoyama S, Goto K (2023). Activation of lactate receptor positively regulates skeletal muscle mass in mice. *Physiol Res* 72: 465-473.
 - Ohno Y, Oyama A, Kaneko H, Egawa T, Yokoyama S, Sugiura T, Ohira Y, Yoshioka T, Goto K (2018). Lactate increases myotube diameter via activation of MEK/ERK pathway in C2C12 cells. *Acta Physiol (Oxf)* 223: e13042.
 - Orozco JM, Krawczyk PA, Scaria SM, Cangelosi AL, Chan SH, Kunchok T, Lewis CA, Sabatini DM (2020). Dihydroxyacetone phosphate signals glucose availability to mTORC1. *Nat Metab* 2: 893-901.
 - Orth JM (1982). Proliferation of Sertoli cells in fetal and postnatal rats: a quantitative autoradiographic study. *Anat Rec* 203: 485-492.

- Orth JM (1984). The role of follicle-stimulating hormone in controlling Sertoli cell proliferation in testes of fetal rats. *Endocrinology* 115: 1248-1255.
- Orth JM, Gunsalus GL, Lamperti AA (1988). Evidence from Sertoli cell-depleted rats indicates that spermatid number in adults depends on numbers of Sertoli cells produced during perinatal development. *Endocrinology* 122: 787-794.
- O'Shaughnessy PJ, Monteiro A, Abel M (2012). Testicular development in mice lacking receptors for follicle stimulating hormone and androgen. *PLoS One* 7: e35136.
- Otto AM (2020). Small is beautiful - a glycolytic metabolite signals mTORC1 activation in cancer cell metabolism. *Signal Transduct Target Ther* 5: 259.
- Palmero S, Prati M, Bolla F, Fugassa E (1995). Tri-iodothyronine directly affects rat Sertoli cell proliferation and differentiation. *J Endocrinol* 145: 355-362.
- Pan T, Gao L, Wu G, Shen G, Xie S, Wen H, Yang J, Zhou Y, Tu Z, Qian W (2015). Elevated expression of glutaminase confers glucose utilization via glutaminolysis in prostate cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 456: 452-458.
- Pang S, Shen Y, Wang Y, Chu X, Ma L, Zhou Y (2024). ROCK1 regulates glycolysis in pancreatic cancer via the c-MYC/PFKFB3 pathway. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* 1868: 130669.
- Pang YY, Wang T, Chen FY, Wu YL, Shao X, Xiao F, Huang HH, Zhong H, Zhong JH (2015). Glycolytic inhibitor 2-deoxy-d-glucose suppresses cell proliferation and enhances methylprednisolone sensitivity in non-Hodgkin lymphoma cells through down-regulation of HIF-1 α and c-MYC. *Leuk Lymphoma* 56: 1821-1830.
- Patriarca C, Colecchia M, Clerici CA (2019). Enrico Sertoli and the supporting cells of the testis. "Morphology is function". *Pathologica* 111: 375-381.
- Pelletier G, Labrie C, Labrie F (2000). Localization of oestrogen receptor alpha, oestrogen receptor beta and androgen receptors in the rat reproductive organs. *J Endocrinol* 165: 359-70.
- Perna D, Faga G, Verrecchia A, Gorski MM, Barozzi I, Narang V, Khng J, Lim KC, Sung WK, Sanges R, Stupka E, Oskarsson T, Trumpp A, Wei CL, Muller H, Amati B (2012). Genome-wide mapping of Myc binding and gene regulation in serum-stimulated fibroblasts. *Oncogene* 31: 1695-1709.
- Pesce A, McKay RH, Stolzenbach F, Cahn RD, Kaplan NO (1964). The comparative enzymology of lactic dehydrogenases. I. Properties of the crystalline beef and chicken enzymes. *J Biol Chem* 239: 1753-1761.
- Pitetti JL, Calvel P, Zimmermann C, Conne B, Papaioannou MD, Aubry F (2013). An essential role for insulin and IGF1 receptors in regulating Sertoli cell proliferation, testis size, and FSH action in mice. *Mol Endocrinol* 27: 814-827.
- Poon RY (2016). Cell cycle control: a system of interlinking oscillators. *Methods Mol Biol* 1342: 3-19.
- Porporato PE, Dhup S, Dadhich RK, Copetti T, Sonveaux P (2011). Anticancer targets in the glycolytic metabolism of tumors: a comprehensive review. *Front Pharmacol* 2: 49.

- Pöttsch A, Zocher S, Bernas SN, Leiter O, Rünker AE, Kempermann G (2021). L-lactate exerts a pro-proliferative effect on adult hippocampal precursor cells *in vitro*. *iScience* 24: 102126.
- Prakasam G, Iqbal MA, Bamezai RNK, Mazurek S (2018). Posttranslational modifications of Pyruvate Kinase M2: tweaks that benefit cancer. *Front Oncol* 8: 22.
- Prendergast GC (1999). Mechanisms of apoptosis by c-Myc. *Oncogene* 18: 2967-2987.
- Proud, CG (1996). p70S6 kinase: an enigma with variations. *Trends Biochem Sci* 21: 181-185.
- Pullen N, Thomas G (1997). The modular phosphorylation and activation of p70s6k. *FEBS Lett* 410: 78-82.
- Racker E (1972). Bioenergetics and the problem of tumor growth. *Am Sci* 60: 56-63.
- Ravnik SE, Rhee K, Wolgemuth DJ (1995). Distinct patterns of expression of the D-type cyclins during testicular development in the mouse. *Dev Genet* 16: 171-178.
- Rebourcet D, Darbey A, Monteiro A, Soffientini U, Tsai YT, Handel I, Pitetti JL, Nef S, Smith LB, O'Shaughnessy PJ (2017). Sertoli Cell Number Defines and Predicts Germ and Leydig Cell Population Sizes in the Adult Mouse Testis. *Endocrinology* 158: 2955-2969.
- Regueira M, Artagaveytia SL, Galardo MN, Pellizzari EH, Cigorruga SB, Meroni SB, Riera MF (2015). Novel molecular mechanisms involved in hormonal regulation of lactate production in Sertoli cells. *Reproduction* 150: 311-321.
- Regueira M, Riera MF, Galardo MN, Pellizzari EH, Cigorruga SB, Meroni SB (2014). Activation of PPAR α and PPAR β/δ regulates Sertoli cell metabolism. *Mol Cell Endocrinol* 382: 271-281.
- Rey RA, Campo SM, Ropelato MG, Bergadá I (2016). Hormonal Changes in Childhood and Puberty. In: Puberty. (Kumanov P, Agarwal A, eds.), pp. 23-37, Springer, Cham, Suiza.
- Rider MH, Bertrand L, Vertommen D, Michels P, Rousseau GG, 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 MF, Galardo MN, Pellizzari EH, Meroni SB, Cigorruga SB (2007). Participation of phosphatidyl inositol 3-kinase/protein kinase B and ERK1/2 pathways in interleukin-1beta stimulation of lactate production in Sertoli cells. *Reproduction* 133: 763-773.
- Riera MF, Meroni SB, Gómez GE, Schteingart HF, Pellizzari EH, Cigorruga SB (2001). Regulation of lactate production by FSH, iL1beta, and TNFalpha in rat Sertoli cells. *Gen Comp Endocrinol* 122: 88-97.
- Riera MF, Regueira M, Galardo MN, Pellizzari EH, Meroni SB, Cigorruga SB (2012). Signal transduction pathways in FSH regulation of rat Sertoli cell proliferation. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 302: 914-923.
- Rindone GM, Gorga A, Regueira M, Pellizzari EH, Cigorruga SB, Galardo MN, Meroni SB, Riera MF (2018). Metformin counteracts the effects of FSH on rat Sertoli cell proliferation. *Reproduction* 156: 93-101.
- Roberts V, Meunier H, Sawchenko PE, Vale W (1989). Differential production and regulation of inhibin subunits in rat testicular cell types. *Endocrinology* 125: 2350-2359.

- Robinson R, Fritz IB (1981). Metabolism of glucose by Sertoli cells in culture. *Biol Reprod* 24: 1032-1041.
- Rocchiccioli F, Leroux JP, Cartier PH (1984). Microdetermination of 2-ketoglutaric acid in plasma and cerebrospinal fluid by capillary gas chromatography mass spectrometry; application to pediatrics. *Biomed Mass Spectrom* 11: 24-28.
- Rogatzki MJ, Ferguson BS, Goodwin ML, Gladden LB (2015). Lactate is always the end product of glycolysis. *Front Neurosci* 9: 22.
- Ros S, Schulze A (2013). Balancing glycolytic flux: the role of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatases in cancer metabolism. *Cancer Metab* 1: 8.
- Russell LD (1993). Form, dimensions and cytology of mammalian Sertoli cells. In: *The Sertoli Cell*. (Russell LD, Griswold MD, eds.), pp. 1-38, Cache River Press, Clearwater FL, EE. UU.
- Russell LD, Malone JP (1980). A study of Sertoli-spermatid tubulobulbar complexes in selected mammals. *Tissue Cell* 12: 263-285.
- Saez JM, Chatelain PG, Perrard-Sapori MH, Jaillard C, Naville D (1988). Differentiating effects of somatomedin-C/insulin-like growth factor I and insulin on Leydig and Sertoli cell functions. *Reprod Nutr Dev* 28: 989-1008.
- Sakakibara R, Kato M, Okamura N, Nakagawa T, Komada Y, Tominaga N, Shimojo M, Fukasawa M (1997). Characterization of a human placental fructose-6-phosphate, 2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. *J Biochem* 122: 122-128.
- Salabei JK, Lorkiewicz PK, Holden CR, Li Q, Hong KU, Bolli R, Bhatnagar A, Hill BG (2015). Glutamine regulates cardiac progenitor cell metabolism and proliferation. *Stem Cells* 33: 2613-2627.
- Salpeter SJ, Klochendler A, Weinberg-Corem N, Porat S, Granot Z, Shapiro AM, Magnuson MA, Eden A, Grimsby J, Glaser B, Dor Y (2011). Glucose regulates cyclin D2 expression in quiescent and replicating pancreatic β -cells through glycolysis and calcium channels. *Endocrinology* 152: 2589-2598.
- Sancak Y, Thoreen CC, Peterson TR, Lindquist RA, Kang SA, Spooner E, Carr SA, Sabatini DM (2007) PRAS40 is an insulin regulated inhibitor of the mTORC1 protein kinase. *Mol Cell* 25: 903-915.
- Sánchez I, Dynlacht BD (2005). New insights into cyclins, CDKs, and cell cycle control. *Semin Cell Dev Biol* 16: 311-321.
- Santen RJ, Brodie H, Simpson ER, Siiteri PK, Brodie A (2009). History of aromatase: saga of an important biological mediator and therapeutic target. *Endocr Rev* 30: 343-375.
- Santiemma V, Salfi V, Casasanta N, Fabbrini A (1987). Lactate dehydrogenase and malate dehydrogenase of Sertoli cells in rats. *Arch Androl* 19: 59-64.
- Sar M, Lubahn DB, French FS, Wilson EM (1990). Immunohistochemical localization of the androgen receptor in rat and human tissues. *Endocrinology* 127: 3180-3186.

- Saxton RA, Knockenhauer KE, Wolfson RL, Chantranupong L, Pacold ME, Wang T, Schwartz TU, Sabatini DM (2016). Structural basis for leucine sensing by the Sestrin2-mTORC1 pathway. *Science* 351: 53-58.
- Schmidt EV (1999). The role of c-myc in cellular growth control. *Oncogene* 18: 2988-2996
- Schrewe H, Gendron-Maguire M, Harbison ML, Gridley T (1994). Mice homozygous for a null mutation of activin beta B are viable and fertile. *Mechan Dev* 47: 43-51.
- Seltzer MJ, Bennett BD, Joshi AD, Gao P, Thomas AG, Ferraris DV, Tsukamoto T, Rojas CJ, Slusher BS, Rabinowitz JD, Dang CV, Riggins GJ (2010). Inhibition of glutaminase preferentially slows growth of glioma cells with mutant IDH1. *Cancer Res* 70: 8981-8987.
- Semenza GL, Jiang BH, Leung SW, Passantino R, Concordet JP, Maire P, Giallongo A (1996). Hypoxia response elements in the aldolase A, enolase 1, and lactate dehydrogenase A gene promoters contain essential binding sites for hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* 271: 32529-32537.
- Sener A, Malaisse WJ (1980). L-leucine and a nonmetabolized analogue activate pancreatic islet glutamate dehydrogenase. *Nature* 288: 187-189.
- Sertoli E (1865). Dell'esistenza di particolari cellule ramificate nei canalicoli seminiferi del testicolo umano. *Il Morgagni* 7: 31-39.
- Setchell BP, Hinks NT, Voglmayr JK, Scott TW (1967). Amino acids in ram testicular fluid and semen and their metabolism by spermatozoa. *Biochem J* 105: 1061-1065.
- Shan LX, Bardin CW, Hardy MP (1997). Immunohistochemical analysis of androgen effects on androgen receptor expression in developing Leydig and Sertoli cells. *Endocrinology* 138: 1259-1266.
- Shan LX, Zhu LJ, Bardin CW, Hardy MP (1995). Quantitative analysis of androgen receptor messenger ribonucleic acid in developing Leydig cells and Sertoli cells by in situ hybridization. *Endocrinology* 136: 3856-3862.
- Sharpe RM, McKinnell C, Kivlin C, Fisher JS (2003). Proliferation and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood. *Reproduction* 125: 769-784.
- Shen Y, Zhang Y, Li W, Chen K, Xiang M & Ma H (2021). Glutamine metabolism: from proliferating cells to cardiomyocytes. *Metabolism* 121: 154778.
- Shi D, Zhao D, Niu P, Zhu Y, Zhou J, Chen H (2018). Glycolysis inhibition via mTOR suppression is a key step in cardamonin-induced autophagy in SKOV3 cells. *BMC Complement Altern Med* 18: 317.
- Shi Y, Tian M, Zhao X, Tang L, Wang F, Wu H, Liao Q, Ren H, Fu W, Zheng S, Jose PA, Li L, Zeng C (2024). α -Ketoglutarate promotes cardiomyocyte proliferation and heart regeneration after myocardial infarction. *Nat Cardiovasc Res* 3: 1083-1097.
- Shim H, Dolde C, Lewis BC, Wu CS, Dang G, Jungmann RA, Dalla-Favera R, Dang CV (1997). c-Myc transactivation of LDH-A: implications for tumor metabolism and growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 6658-6663.

- Shirai T, Kitaoka Y, Uemichi K, Tokinoya K, Takeda K, Takemasa T (2022). Effects of lactate administration on hypertrophy and mTOR signaling activation in mouse skeletal muscle. *Physiol Rep* 10: e15436.
- Short ML, Huang D, Milkowski DM, Short S, Kunstman K, Soong CJ, Chung KC, Jungmann RA (1994). Analysis of the rat lactate dehydrogenase A subunit gene promoter/regulatory region. *Biochem J* 304: 391-398.
- Shyer JA, Flavell RA, Bailis W (2020). Metabolic signaling in T cells. *Cell Res* 30: 649-659.
- Simoni M, Gromoll J, Nieschlag E (1997). The follicle-stimulating hormone receptor: biochemistry, molecular biology, physiology, and pathophysiology. *Endocr Rev.* 18: 739-773.
- Singh J, Handelsman DJ (1996). Neonatal administration of FSH increases Sertoli cell numbers and spermatogenesis in gonadotropin-deficient (hpg) mice. *J Endocrinol* 151: 37-48.
- Sinha Hikim AP, Chakraborty J, Jhunjhunwala JS (1985). Germ cell quantitation in human testicular biopsy. *Urol Res* 13: 111-115.
- Smith EP, Dickson BA, Chernausek SD (1990). Insulin-like growth factor binding protein-3 secretion from cultured rat sertoli cells: dual regulation by follicle stimulating hormone and insulin-like growth factor-I. *Endocrinology* 127: 2744-2751.
- Smith EM, Watford M (1990). Molecular cloning of a cDNA for rat hepatic glutaminase. Sequence similarity to kidney-type glutaminase. *J Biol Chem* 265: 10631-10636.
- Song J, Ma D, Xing Y, Tang S, Alahdal M, Guo J, Pan Y, Zhang Y, Shen Y, Wu Q, Lu Z, Jin L (2018). α -Ketoglutarate Promotes Pancreatic Progenitor-Like Cell Proliferation. *Int J Mol Sci* 19: 943.
- Spencer CA, Groudine M (1990). Molecular analysis of the c-myc transcription elongation block. Implications for the generation of Burkitt's lymphoma. *Ann N Y Acad Sci* 599: 12-28.
- Steifensand F, Gallwas J, Bauerschmitz G, Gründker C (2021). Inhibition of metabolism as a therapeutic option for Tamoxifen-resistant breast cancer cells. *Cells* 10: 2398.
- Steinberger A, Steinberger E (1971). Replication pattern of Sertoli cells in maturing rat testis in vivo and in organ culture. *Biol Reprod* 4: 84-87.
- Stoneley M (1998). Functional analysis of the 5' untranslated region of the c-myc proto-oncogene. University of Leicester. Thesis. <https://hdl.handle.net/2381/29630>.
- Sun Q, Chen X, Ma J, Peng H, Wang F, Zha X, Wang Y, Jing Y, Yang H, Chen R, Chang L, Zhang Y, Goto J, Onda H, Chen T, Wang MR, Lu Y, You H, Kwiatkowski D, Zhang H (2011). Mammalian target of rapamycin up-regulation of pyruvate kinase isoenzyme type M2 is critical for aerobic glycolysis and tumor growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 4129-4134.
- Sun Y, Shen Y, Yan Y, Luo W, Liu C, Tang J (2025). *GLS1* promotes lipid metabolism in hepatocellular carcinoma by regulating the *PI3K/AKT/mTORC1* signaling pathway through *SREBP-1*. *Am J Transl Res* 17: 2527-2540.

- Szwed A, Kim E, Jacinto E (2021). Regulation and metabolic functions of mTORC1 and mTORC2. *Physiol Rev* 101: 1371-1426.
- Tambay V, Raymond VA, Bilodeau M (2021). MYC rules: leading glutamine metabolism toward a distinct cancer cell phenotype. *Cancers (Basel)* 13: 4484.
- Tan KA, De Gendt K, Atanassova N, Walker M, Sharpe RM, Saunders PT (2005). The role of androgens in Sertoli cell proliferation and functional maturation: studies in mice with total or Sertoli cell-selective ablation of the androgen receptor. *Endocrinology* 146: 2674-2683.
- TeSlaa T, Teitell MA (2014). Techniques to monitor glycolysis. *Methods Enzymol* 542: 91-114.
- Thedieck K, Polak P, Kim ML, Molle KD, Cohen A, Jenö P, Arrieumerlou C, Hall MN (2007). PRAS40 and PRR5-like protein are new mTOR interactors that regulate apoptosis. *PLoS One* 2: e1217.
- Treins C, Giorgetti-Peraldi S, Murdaca J, Semenza GL, Van Obberghen E (2002). Insulin stimulates hypoxia-inducible factor 1 through a phosphatidylinositol 3-kinase/target of rapamycin-dependent signaling pathway. *J Biol Chem* 277: 27975-27981.
- Tsai-Morris CH, Aquilano DR, Dufau ML (1985). Cellular localization of rat testicular aromatase activity during development. *Endocrinology* 116: 38-46.
- Ulisse S, Jannini EA, Carosa E, Piersanti D, Graziano FM, D'Armiento M (1994). Inhibition of aromatase activity in rat Sertoli cells by thyroid hormone. *J Endocrinol* 140: 431-436.
- Van der Vos KE, Eliasson P, Proikas-Cezanne T, Vervoort SJ, van Boxtel R, Putker M, van Zutphen IJ, Mauthe M, Zellmer S, Pals C, Verhagen LP, Groot Koerkamp MJ, Braat AK, Dansen TB, Holstege FC, Gebhardt R, Burgering BM, Coffey PJ (2012). Modulation of glutamine metabolism by the PI(3)K-PKB-FOXO network regulates autophagy. *Nat Cell Biol* 14: 829-837.
- Van Pelt AM, de Rooij DG, van der Burg B, van der Saag PT, Gustafsson JA, Kuiper GG (1999). Ontogeny of estrogen receptor-beta expression in rat testis. *Endocrinology* 140: 478-483.
- Van Riggelen J, Yetil A, Felsher DW (2010). MYC as a regulator of ribosome biogenesis and protein synthesis. *Nat Rev Cancer* 10: 301-309.
- Vander Haar E, Lee SI, Bandhakavi S, Griffin TJ, Kim DH (2007) Insulin signalling to mTOR mediated by the Akt/PKB substrate PRAS40. *Nat Cell Biol* 9: 316-323.
- Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB (2009). Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Science* 324: 1029-1033.
- Vidal A, Koff A (2000). Cell-cycle inhibitors: three families united by a common cause. *Gene* 247: 1-15.
- Videla LA, Fernandez V, Cornejo P, Vargas R, Morales P, Ceballo J (2014). T (3) induced liver AMP-activated protein kinase signaling: redox dependency and upregulation of downstream targets. *World J Gastroenterol* 20: 17416-17425.
- Vidula N, Yau C, Rugo HS (2023). Glutaminase (GLS1) gene expression in primary breast cancer. *Breast Cancer* 30: 1079-1084.

- Villalpando I, Lira E, Medina G, Garcia-Garcia E, Echeverria O (2008). Insulin like growth factor 1 is expressed in mouse developing testis and regulates somatic cell proliferation. *Exp Biol Med* 233: 419-426.
- Vornberger W, Prins G, Musto NA, Suarez-Quian CA (1994). Androgen receptor distribution in rat testis: new implications for androgen regulation of spermatogenesis. *Endocrinology* 134: 2307-2316.
- Wagner BM, Donnarumma F, Wintersteiger R, Windischhofer W, Leis HJ (2010). Simultaneous quantitative determination of alpha-ketoglutaric acid and 5-hydroxymethylfurfural in human plasma by gas chromatography-mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 396: 2629-2637.
- Walker WH, Fucci L, Habener JF (1995). Expression of the gene encoding Transcription Factor cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate (cAMP) response element-binding protein (CREB): Regulation by follicle stimulating hormone-induced cAMP signaling in primary rat Sertoli cells. *Endocrinology* 136: 3534-3545.
- Wall M, Poortinga G, Hannan KM, Pearson RB, Hannan RD, McArthur GA (2008). Translational control of c-MYC by rapamycin promotes terminal myeloid differentiation. *Blood* 112: 2305-2317.
- Wang JB, Erickson JW, Fuji R, Ramachandran S, Gao P, Dinavahi R, Wilson KF, Ambrosio AL, Dias SM, Dang CV, Cerione RA (2010). Targeting mitochondrial glutaminase activity oncogenic transformation. *Cancer Cell* 18: 207-219.
- Wang Q, Beaumont KA, Otte NJ, Font J, Bailey CG, van Geldermalsen M, Sharp DM, Tiffen JC, Ryan RM, Jormakka M, Haass NK, Rasko JE, Holst J (2014). Targeting glutamine transport to suppress melanoma cell growth. *Int J Cancer* 135: 1060-1071.
- Wang Q, Hardie RA, Hoy AJ, van Geldermalsen M, Gao D, Fazli L, Sadowski MC, Balaban S, Schreuder M, Nagarajah R, Wong JJ, Metierre C, Pinello N, Otte NJ, Lehman ML, Gleave M, Nelson CC, Bailey CG, Ritchie W, Rasko JE, Holst J (2015). Targeting ASCT2-mediated glutamine uptake blocks prostate cancer growth and tumour development. *J Pathol* 236: 278-289.
- Wang R, Dillon CP, Shi LZ, Milasta S, Carter R, Finkelstein D, McCormick LL, Fitzgerald P, Chi H, Munger J, Green DR (2011). The transcription factor Myc controls metabolic reprogramming upon T lymphocyte activation. *Immunity* 35: 871-882.
- Wang Y, Huang Y, Zhao L, Li Y, Zheng J (2014). Glutaminase 1 is essential for the differentiation, proliferation, and survival of human neural progenitor cells. *Stem Cells Dev* 23: 2782-2790.
- Wang Y, Tang S, Wu Y, Wan X, Zhou M, Li H, Zha X (2020). Upregulation of 6-phosphofructo-2-kinase (PFKFB3) by hyperactivated mammalian target of rapamycin complex 1 is critical for tumor growth in tuberous sclerosis complex. *IUBMB Life* 72: 965-977.
- Warburg O (1956). On the origin of cancer cells. *Science*. 123: 309-314.
- Warburg O, Wind F, Negelein E (1927). The metabolism of tumors in the body. *J Gen Physiol* 8: 519-530.
- West MJ, Stoneley M, Willis AE (1998). Translational induction of the c-myc oncogene via activation of the FRAP/TOR signalling pathway. *Oncogene* 17: 769-780.

- Willems L, Jacque N, Jacquel A, Neveux N, Maciel TT, Lambert M, Schmitt A, Poulain L, Green AS, Uzunov M, Kosmider O, Radford-Weiss I, Moura IC, Auberger P, Ifrah N, Bardet V, Chapuis N, Lacombe C, Mayeux P, Tamburini J, Bouscary D (2013). Inhibiting glutamine uptake represents an attractive new strategy for treating acute myeloid leukemia. *Blood* 122: 3521-3532.
- Wilson DF, Matschinsky FM (2021). Metabolic homeostasis in life as we know it: its origin and thermodynamic basis. *Front Physiol* 12: 658997.
- Wing TY, Christensen AK (1982). Morphometric studies on rat seminiferous tubules. *Am J Anat* 165: 13-25.
- Wise DR, DeBerardinis RJ, Mancuso A, Sayed N, Zhang XY, Pfeiffer HK, Nissim I, Daikhin E, Yudkoff M, McMahon SB, Thompson CB (2008). Myc regulates a transcriptional program that stimulates mitochondrial glutaminolysis and leads to glutamine addiction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 18782-18787.
- Wise DR, Thompson CB (2010). Glutamine addiction: a new therapeutic target in cancer. *Trends Biochem Sci* 35: 427-433.
- 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.
- Xiao D, Ren P, Su H, Yue M, Xiu R, Hu Y, Liu H, Qing G (2015). Myc promotes glutaminolysis in human neuroblastoma through direct activation of glutaminase 2. *Oncotarget* 6: 40655-40666.
- Xiong W, Wang H, Wu H, Chen Y, Han D (2009). Apoptotic spermatogenic cells can be energy sources for Sertoli cells. *Reproduction* 137: 469-479.
- Xu Y, An X, Guo X, Habtetsion TG, Wang Y, Xu X, Kandala S, Li Q, Li H, Zhang C, Caldwell RB, Fulton DJ, Su Y, Hoda MN, Zhou G, Wu C, Huo Y (2014). Endothelial PFKFB3 plays a critical role in angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 34: 1231-1239.
- Yamamoto T, Nakayama Y, Abe SI (2001). Mammalian follicle-stimulating hormone and insulin-like growth factor I (IGF-I) up-regulate IGF-I gene expression in organ culture of newt testis. *Mol Reprod Dev* 60: 56-64.
- Yamauchi M, Kambe F, Cao X, Lu X, Kozaki Y, Oiso Y (2008). Thyroid hormone activates adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase via intracellular calcium mobilization and activation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta. *Mol Endocrinol* 22: 893-903.
- Yang Y, Su D, Zhao L, Zhang D, Xu J, Wan J, Fan S, Chen M (2014). Different effects of LDH-A inhibition by oxamate in non-small cell lung cancer cells. *Oncotarget* 5: 11886-11896.
- Yao Y, Jones E, Inoki K (2017). Lysosomal Regulation of mTORC1 by Amino Acids in Mammalian Cells. *Biomolecules* 7: 51-68.
- Ye J, Huang Q, Xu J, Huang J, Wang J, Zhong W, Chen W, Lin X, Lin X (2018). Targeting of glutamine transporter ASCT2 and glutamine synthetase suppresses gastric cancer cell growth. *J Cancer Res Clin Oncol* 144: 821-833.

- Yecies JL, Manning BD (2011). Transcriptional control of cellular metabolism by mTOR signaling. *Cancer Res* 71: 2815-2820.
- Yoo HC, Yu YC, Sung Y, Han JM (2020). Glutamine reliance in cell metabolism. *Exp Mol Med* 52: 1496-1516.
- You L, Sar M (1998). Androgen receptor expression in the testes and epididymides of prenatal and postnatal Sprague-Dawley rats. *Endocrine* 9: 253-261.
- Yu Y, Newman H, Shen L, Sharma D, Hu G, Mirando AJ, Zhang H, Knudsen E, Zhang GF, Hilton MJ, Karner CM (2019). Glutamine Metabolism Regulates Proliferation and Lineage Allocation in Skeletal Stem Cells. *Cell Metab* 29: 966-978.
- Yuan L, Sheng X, Willson AK, Roque DR, Stine JE, Guo H, Jones HM, Zhou C, Bae-Jump VL (2015). Glutamine promotes ovarian cancer cell proliferation through the mTOR/S6 pathway. *Endocr Relat Cancer* 22: 577-591.
- Yuan Y, Xu P, Jiang Q, Cai X, Wang T, Peng W, Sun J, Zhu C, Zhang C, Yue D, He Z, Yang J, Zeng Y, Du M, Zhang F, Ibrahimi L, Schaul S, Jiang Y, Wang J, Sun J, Wang Q, Liu L, Wang S, Wang L, Zhu X, Gao P, Xi Q, Yin C, Li F, Xu G, Zhang Y, Shu G (2020). Exercise-induced α -ketoglutaric acid stimulates muscle hypertrophy and fat loss through OXGR1-dependent adrenal activation. *EMBO J* 39: e103304.
- Zdzisińska B, Żurek A, Kandefer-Szerszeń M (2017). Alpha-Ketoglutarate as a Molecule with Pleiotropic Activity: Well-Known and Novel Possibilities of Therapeutic Use. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 65: 21-36.
- Zhang C, Yeh S, Chen YT, Wu CC, Chuang KH, Lin HY, Wang RS, Chang YJ, Mendis-Handagama C, Hu L, Lardy H, Chang C (2006). Oligozoospermia with normal fertility in male mice lacking the androgen receptor in testis peritubular myoid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 17718-17723.
- Zhang D, Tang Z, Huang H, Zhou G, Cui C, Weng Y, Liu W, Kim S, Lee S, Perez-Neut M, Ding J, Czyn D, Hu R, Ye Z, He M, Zheng YG, Shuman HA, Dai L, Ren B, Roeder RG, Becker L, Zhao Y (2019). Metabolic regulation of gene expression by histone lactylation. *Nature* 574: 575-580.
- Zhang J, Pavlova NN, Thompson CB (2017). Cancer cell metabolism: the essential role of the nonessential amino acid, glutamine. *EMBO J* 36: 1302-1315.
- Zhang Z, Hu H, Luo Q, Yang K, Zou Z, Shi M, Liang W (2024). Dihydroxyacetone phosphate accumulation leads to podocyte pyroptosis in diabetic kidney disease. *J Cell Mol Med* 28: e18073.
- Zhao J, Ma Y, Zhang Y, Fu B, Wu X, Li Q, Cai G, Chen X, Bai XY (2019). Low-dose 2-deoxyglucose and metformin synergically inhibit proliferation of human polycystic kidney cells by modulating glucose metabolism. *Cell Death Discov* 5: 76.
- Zhou Q, Shima JE, Nie R, Friel PJ, Griswold MD (2005). Androgen-regulated transcripts in the neonatal mouse testis as determined through microarray analysis. *Biol Reprod* 72: 1010-1019.

- Zhou X, Kudo A, Kawakami H, Hirano H (1996). Immunohistochemical localization of androgen receptor in mouse testicular germ cells during fetal and postnatal development. *Anat Rec* 245: 509-518.