

UNIVERSIDAD DE VALPARAISO
Facultad de Ciencias Medicas
Programa de Magister en Ciencias Medicas
Mencion Biología Celular y Molecular

TESIS DE MAGISTER:

**FSH - TESTOSTERONA Y BISFENOL A, COMO
MODULADORES DE LA PROLIFERACION Y DE LA
EXPRESION DE PROTEINAS DE LA BARRERA
HEMATOTESTICULAR Y ADAM 10 EN CÉLULAS DE
SERTOLI IN VITRO**

Por

JULIO ARDUINO BUÑAY NOBOA

Tutor:

DR. RICARDO MORENO MAURO

Septiembre, 2011

UNIVERSIDAD DE VALPARAISO
Facultad de Ciencias Medicas
Programa de Magister en Ciencias Medicas
Mencion Biología Celular y Molecular

**FSH - TESTOSTERONA Y BISFENOL A, COMO
MODULADORES DE LA PROLIFERACION Y DE LA
EXPRESION DE PROTEINAS DE LA BARRERA
HEMATOTESTICULAR Y ADAM 10 EN CÉLULAS DE
SERTOLI IN VITRO.**

**Tesis presentada a la Universidad de Valparaiso de Chile como parte
de los requisitos para optar al grado de Magister en Ciencias
Medicas Mención Biología Celular y Molecular**

Por

JULIO ARDUINO BUÑAY NOBOA

Septiembre, 2011

UNIVERSIDAD DE VALPARAISO

Facultad de Ciencias Medicas

Programa de Magister en Ciencias Medicas

Mencion Biología Celular y Molecular

El tribunal examinador.

**Constituido por los profesores abajo firmantes,
Aprueba la defensa de la Tesis de Magister titulada:**

**FSH - TESTOSTERONA Y BISFENOL A, COMO MODULADORES
DE LA PROLIFERACION Y DE LA EXPRESION DE PROTEINAS
DE LA BARRERA HEMATOTESTICULAR Y ADAM 10 EN
CÉLULAS DE SERTOLI IN VITRO.**

Presentada con fecha, por el candidato a Magister

JULIO ARDUINO BUÑAY NOBOA

**Se califica el trabajo realizado, el manuscrito sometido y la defensa
oral, con nota..... (,).**

.....

.....

.....

Valparaíso, 14 de Septiembre del 2011

Dedicado a mi Madre y a la memoria de mi Padre, quienes me criaron con amor y sabiduría, enseñándome valores y otorgándome las herramientas para ser un hombre de bien.

Para ellos siempre, mi amor y mi esfuerzo.

AGRADECIMIENTOS

Gracias a mi familia, al apoyo incondicional de mis hermanas Erika y Verónica, sin el cariño y la ayuda que ellas me han brindado no habría podido seguir adelante, además son mi modelo a seguir

Gracias a las personas que me enseñaron a equivocarme, a tener paciencia, a construir entereza a ellos que me guiaron con sus retos y discusiones a redescubrir una nueva forma de ver y vivir la vida, a mi tutor el Dr. Ricardo Moreno y a ellos mis compañeros de laboratorio en especial a Raul, Paulina O., Carlos, Don Pedro, Natalia, Paulina M. En general a todos los que estuvieron y hoy están en el laboratorio, son aquellas personas que acogieron a un extraño y con pasión le transmitieron sus enseñanzas, le brindaron amistad, respeto y compañerismo a todos ellos solo me queda retribuirles con los mismo valores.

Agradezco de igual forma a la Universidad de Valparaíso por diseñar este programa de Magister al Dpto. de Ciencias Biomédicas, y a cada uno de mis profesores por ayudarme a despertar en mi la curiosidad por la ciencia, por otorgarme las bases necesarias para realizar este trabajo. Así mismo agradezco a mis compañeros de magister que me brindaron apoyo y compañerismo en cada momento que compartimos como estudiantes.

De igual forma agradezco al Dr. Omar Ramírez y al Dr. Steffen Hertel del laboratorio de SCIAN por brindarme su apoyo y otorgarme el conocimiento necesario para llevar a cabo algunos puntos importantes en este trabajo.

Finalmente agradezco a Dios porque desde el primer día en que empecé esta etapa de mi vida me supo acompañar y aun se que guía mis pasos.

INDICE:

Indice General.....

Indice de Figuras.....

Resumen.....

Indice General.

I.	INTRODUCCION.....	9
	I.1 EL TESTICULO Y LA FUNCION REPRODUCTIVA.....	9
	I.2 LA CELULA DE SERTOLI Y SU PAPEL EN LA ESPEMATOGENESIS.....	10
	I.3 LA BARRERA HEMATOTESTICULAR.....	12
	I.3.a UNIONES ESTRECHAS.....	13
	I.3.b UNIONES ADHERENTES.....	14
	I.3.c UNIONES DE COMUNICACIÓN.....	15
	I.3.d DESMOSOMAS YOTRAS UNIONES.....	16
	I.4.e ROL DE HORMONAS EN LA FORMACION DE LA BARRERA HEMATOTESTICULAR.....	17
	I.4 FISIOLOGIA DE LA BARRERA FISIOLOGIA.....	19
	I.5 CULTIVOS PRIMARIOS DE CELULAS DE SERTOLI.....	20
	I.6. PROTEINAS DE LA FAMILIA ADAMS Y SUS FUNCIONES EN LA ESPERMATOGENESIS.....	21
	I.6 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	23
II.	HIPOTESIS.....	24
III.	OBJETIVOS.....	24
	III.1 OBJETIVO GENERAL.....	24
	III.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	25
IV.	MATERIALES Y METODOS.....	26
	IV.1 ANIMALES.....	26
	IV.2 ANTICUERPOS Y REACTIVOS Y HORMONAS.....	26
	IV.3 CULTIVO PRIMARIO DE CELULAS DE SERTOLI.....	27

V.1.5. DETERMINAR QUE LA EXPRESION Y LOCALIZACIÓN DE ADAM 10 CAMBIA FRENTE A TRATAMIENTOS POR FSH, TETOSTERONA Y BISFENOL A <i>IN VITRO</i>.....	68
VI. DISCUSION.....	71
VII. CONCLUSION.....	80
VIII. FIGURAS COMPLEMENTARIAS Y LISTA DE ABREVIATURAS.....	81
IX.REFERENCIAS.....	85

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Sección Transversal del túbulo Seminífero de rata.	10
Figura 2: La Célula de Sertoli.....	12
Figura 3: Formación de la barrera hematotesticular.....	18
Figura 4: Proteína de la familia ADAMs y su función.	22
Figura 5: Evaluación de la morfología de células de Sertoli extraídas.	37
Figura 6: Identificación de Células de Sertoli extraídas.....	38
Figura 7: Cuantificación de pureza de cultivo primario de células de Sertoli.....	39
Figura 8: Estudio de la proliferación de células de Sertoli in vitro.....	41
Figura 9: Medición del ciclo celular de células de Sertoli	43
Figura 10: Localización y expresión de proteínas de adhesión <i>in vivo</i>.....	45
Figura 11: Expresión y localización de proteínas constitutivas de la BHT <i>in vitro</i>.....	48
Figura 12: Co-localización de proteínas de uniones en cultivos primarios de Sertoli en Matrigel.....	49
Figura 13: Cuantificación del grado de co-localización de proteínas de uniones en cultivos de Sertoli en Matrigel.....	51
Fig.14. Cuantificación del grado de co-localización según niveles de cortes en plano Z, de proteínas de uniones en cultivos primarios de Sertoli en Matrigel.....	53
Figura 15: Estudio de la viabilidad celular de células de Sertoli en cultivo.....	54
Figura 16: Evaluación de la proliferación de células de Sertoli bajo estimulación con hormona FSH.....	55
Figura 17: Evaluación de la adición de hormonas y suplementos sobre el ciclo celular.....	57
Figura 18: Bisfenol A altera los niveles proteicos de ZO-1 de células de Sertoli en cultivo.....	59
Figura 19: Bisphenol A (BPA) altera la expresión de uniones celulares de células de Sertoli formadoras de BHT, <i>in Vitro</i>.....	60

Figura 20: Hormonas FSH y/o testosterona median cambios en la expresión de ZO-1 en células de Sertoli, <i>in vitro</i>.....	61
Figura 21: Tratamientos con BPA y hormonas modulan la expresión y localización de ZO-1 en células de Sertoli en cultivo.....	63
Figura 22: Tratamientos con BPA y hormonas modulan la expresión y localización de Claudina-11 en células de Sertoli en cultivo.....	64
Figura 23: Detección de ADAM 17 en cultivos de células de Sertoli.....	66
Figura 24: Expresión, localización y cambios mediados por PMA, de la proteína ADAM 10 en cultivos de células de Sertoli.....	67
Figura 25: Expresión de ADAM10 en células de Sertoli <i>in vitro</i>, es regulada principalmente por testosterona.	

INDICE DE TABLAS.

Tabla 1: Anticuerpos Primarios y secundarios empleados:.....26

Tabla 2: Hormonas y/o Suplementos empleados:.....27

RESUMEN:

La célula de Sertoli es la célula clave para la mantención y progresión de la espermatogénesis. Además de entregar diversos factores tróficos a las células germinales, forma la barrera hematotesticular (BHT). El desarrollo y función de esta célula es regulado vía endócrina por dos hormonas, la hormona folículo estimulante (FSH) y la hormona testosterona. Se conoce además que ciertos compuestos químicos presentan toxicidad sobre la función reproductiva modulando las adhesiones de la BHT, entre ellos se nombran a los xenoestrogenos derivados de la fabricación de plásticos, en especial Bisfenol A (BPA). Diversos estudios de nuestro laboratorio han determinado que BPA provoca apoptosis de células germinales mediada por la activación de un nuevo grupo de proteínas, ADAM 10 y ADAM 17, metaloproteasas implicadas en el clivaje de sustratos en el testículo, aunque todavía es muy poco lo que se conoce sobre su función a nivel testicular.

Para comprender un poco más todos estos fenómenos desde el punto de vista exclusivo de la célula de Sertoli, nosotros decidimos estudiar si la proliferación de células de Sertoli *in vitro*, al igual que la expresión de proteínas de adhesión formadoras de la BHT y ADAM 10 pueden ser moduladas por FSH, testosterona y Bisfenol A, que es el objetivo principal de esta tesis.

Para poder cursar este estudio nosotros tuvimos que implementar y caracterizar en nuestro laboratorio un modelo de cultivo primario de células de Sertoli de ratas de 17 días de edad, mostrando que es factible tener un cultivo celular con un alto grado de pureza, que expresa y localiza las mismas proteínas de adhesión de la BHT. Y cuyas células proliferan *in vitro* potenciadas por FSH y testosterona. Posteriormente sobre este sistema se demostró que la expresión y localización de proteínas TJ formadoras de la barrera hematotesticular son aumentadas por FSH y testosterona, mientras que disminuyen en tratamientos con Bisfenol A.

Del mismo modo utilizando nuestro modelo de cultivo, se muestran las primeras evidencias de la presencia de ADAM 10, en células de Sertoli. Demostrando que la expresión y localización subcelular de esta proteína es modulada por testosterona y por xenoestrogenos como Bisfenol A.

En conjunto estos resultados permiten proponer que las hormonas FSH y testosterona al igual que tóxicos ambientales como Bisfenol A modulan de diferente forma la expresión de proteínas formadoras de la BHT como también la expresión y localización de ADAM10 en las células de Sertoli, nueva proteína implicadas probablemente en el mecanismo de daño por toxicidad a nivel reproductivo.

1. INTRODUCCION

I.1 EL TESTICULO Y LA FUNCION REPRODUCTIVA

Los testículos son órganos pares y ovalados cuyas principales funciones son dos: la producción de espermatozoides y la síntesis de hormonas masculinas. En la mayoría de mamíferos se localizan al interior de la cavidad abdominal, retroperitonealmente, y en el hombre adulto están suspendido al interior del escroto por los cordones espermáticos.

Cada testículo contiene lóbulos cónicos o piramidales constituidos por delgadas estructuras llamadas túbulos seminíferos, estos descansan en la parte apical del testículo formando “*la rete testis*”, la cual a su vez converge en el epidídimo, que se continúa con el conducto deferente, conducto eyaculador y uretra (Ham 1975).

En los testículos se reconocen tres compartimientos. El compartimiento intersticial formado por: tejido conjuntivo, vasos sanguíneos y linfáticos, donde se localizan las células de Leydig que secretan testosterona. Continúa el compartimiento peritubular o pared tubular, formado por una membrana basal y una túnica propia de células especializadas contráctiles llamadas células mioideas, además de material secretado por ellas cuya funcionalidad está bajo control gonadotrófico y androgénico.

El tercer compartimiento lo forman los túbulos seminíferos (Fig.1), que son las unidades funcionales en los testículos. Constituyen un epitelio estratificado y especializado donde se localizan las células de Sertoli y las células germinales en grados de diferenciación; en ellos toma lugar la espermatogénesis.

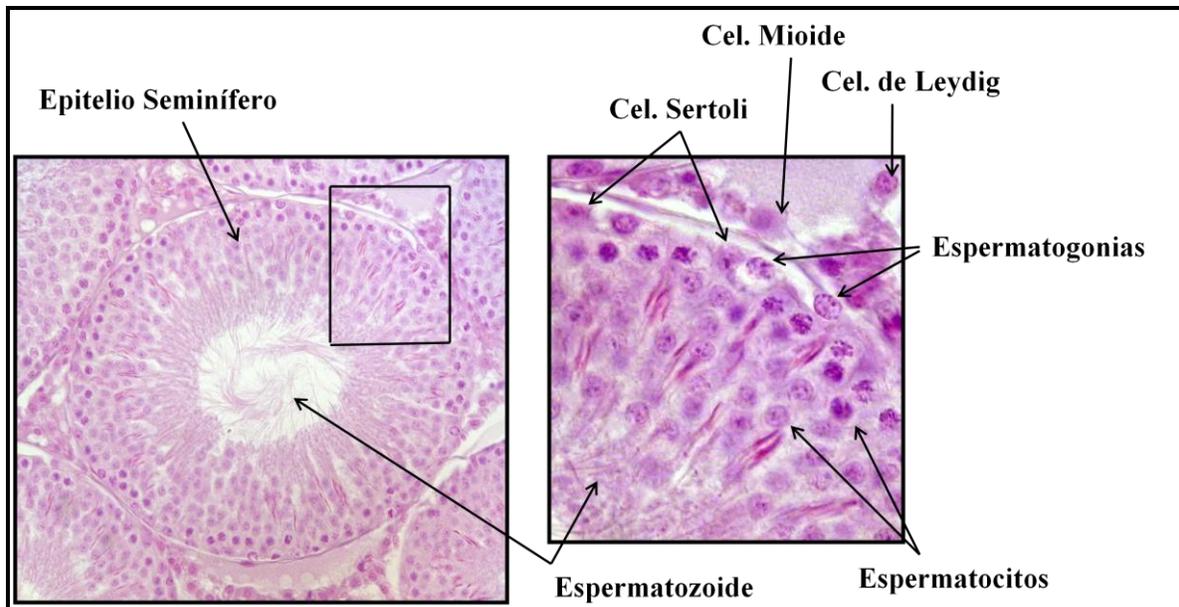


Figura 1: Sección transversal del túbulo seminífero de rata.

Microfotografía de corte transversal de testículo, especificando los tipos celulares que conforman el testículo.

I.2 LA CELULA DE SERTOLI Y SU PAPEL EN LA ESPERMATOGENESIS

La espermatogénesis es el proceso de maduración, proliferación y diferenciación de células germinales, que ocurre junto a un continuo contacto con la célula de Sertoli donde comparten morfológicamente distintas uniones de membrana (Russell 1977). El principal objetivo de la espermatogénesis es la producción de espermatozoides (células haploides) desde espermatogonias (células diploides).

Este fenómeno biológico posee 4 distintas fases: **Mitosis** (división celular en que las espermatogonias más indiferenciadas originan dos células hijas con el mismo número de cromosomas). **Meiosis** (proceso de división celular por la cual los espermatocitos, células diploides $2n$, generan espermátidas haploides $1n$). **Espermiogénesis** (fase de diferenciación donde las células espermátidas se desarrollan a espermatozoides) y **espermiación** (fase de liberación de espermatozoides del túbulo seminífero hacia el epidídimo).

Estos eventos ocurren sucesivamente en distintos estadios: 14 en la rata (Hess 1990), 12 en el ratón y 6 en el hombre. Estos estadios se diferencian debido a la agrupación de distintos tipos celulares en un momento dado.

En 1895 Enrico Sertoli uso el término “Célula Madre”, (Wessel 2011) para definir una célula que encontró en el epitelio seminífero y que hoy lleva su nombre (Fig. 2), sugiriendo con esta observación de forma muy perceptiva e intuitiva la verdadera función de la célula de Sertoli, entre sus funciones más importantes se incluyen: 1) Proveer un soporte estructural y albergar a las células germinales, 2) conferir polaridad celular, y 3) Crear una barrera inmunológica para secuestrar antígenos de la circulación sistémica que podrían afectar la meiosis de células germinales (Russell 1993).

Cada célula de Sertoli soporta entre 30 a 50 células germinales en diferentes estadios de desarrollo y localmente produce factores autocrinos y paracrinos para coordinar diferentes eventos de la espermatogénesis (Cheng, Elisa et al. 2010). Las células germinales que no logran pasar hacia alguno de los eventos de la espermatogénesis cursan hacia apoptosis que refleja un ajuste en el número de células germinales que pueden ser mantenidas de forma adecuada por la célula de Sertoli (Moreno, Lizama et al. 2006).

Un siglo después del descubrimiento de Enrico Sertoli, varios investigadores del área mostraron que muchas de las funciones de la célula de Sertoli se llevan a cabo al constituirse la barrera hematotesticular (BHT) (Dym and Fawcett 1970), llamada también barrera de células de Sertoli, apareciendo después de la formación de uniones estrechas (TJ) entre células de Sertoli adyacentes, responsable de formar un compartimento basal y adluminal en el epitelio seminífero.

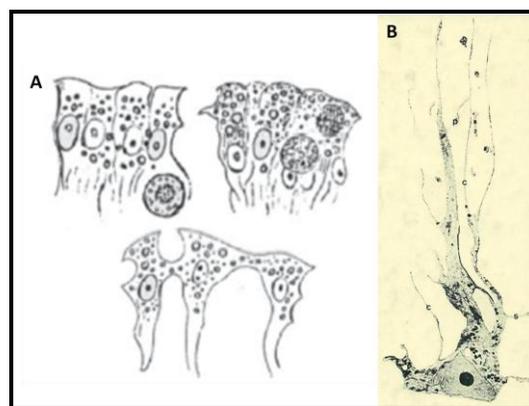


Figura 2: La Célula de Sertoli.

A) Células epiteliales encontradas en el túbulo seminífero, dibujadas por Enrico Sertoli, (Sertoli E 1865), los sitios de contacto entre ellas forman la BHT. B) Dibujo de la célula de Sertoli, (Russell LD 1993).

I.3 LA BARRERA HEMATOTESTICULAR.

La barrera hematotesticular es la ultraestructura más importante del epitelio seminífero para mantener la espermatogénesis, se conoce que se forma entre los días 15 al 18 de postparto, en la rata previa al comienzo de la primera ola de la espermatogénesis.

Las células de Sertoli son las responsables de la formación de la barrera hematotesticular (BHT), que controla la entrada y salida de nutrientes, y otros compuestos químicos dentro del túbulo seminífero, así como también previene el tráfico bidireccional de moléculas (Russell LD 1993), y mantiene la polaridad celular monitoreando el influjo paracelular de agua, electrolitos, hormonas y biomoléculas.

La BHT aísla al compartimiento adluminal donde, yacen las células germinales, de las células inmunitarias, conformando un microambiente único en el compartimiento apical del epitelio seminífero para separar los eventos de desarrollo postmeiótico de células germinales, excluyendo los componentes derivados de la sangre que podrían afectar la espermatogénesis (Dhiren S. Dave 2007) (Mruk, Silvestrini et al. 2008).

La barrera hematotesticular está constituida por: uniones estrechas (TJ), uniones de comunicación (GJ), desmosomas y uniones adherentes (AJ) únicas en el testículo denominadas (especialización ectoplasmica y complejo tubulobulbar). Estas uniones se localizan entre células de Sertoli adyacentes, cercanas a la lamina basal (Russell and Peterson 1985).

En contraste con otros epitelios donde las uniones adherentes están distintivamente situadas por debajo de las uniones delgadas, en la porción apical de los epitelios. En la BHT los complejos de adhesión célula – célula, co-existen, en un compartimiento específico, próximo a la membrana basal, teniendo una arquitectura y localización única, y formando morfológicamente una circunferencia sellada.

I.3.a UNIONES ESTRECHAS EN LA BARRERA HEMATOTESTICULAR:

La definición entre espacios basales y apicales en el túbulo seminífero es caracterizada de acuerdo a la presencia de TJ entre células de Sertoli adyacentes que conforman la barrera

hematotesticular, y son encontradas en el compartimiento basal del epitelio seminífero adyacentes a la lamina basal (Cheng and Mruk 2002). Se ha descrito que las TJ en células de Sertoli son una de las uniones celulares más estrechas en mamíferos (Dym and Fawcett 1970).

Existen 3 familias de proteínas de tipo TJ: 1) Ocludina; es una proteína de adhesión celular que ha sido demostrado que influencia la permeabilidad a iones y solutos, en la BHT en la rata (Siu ER 2009), 2) Claudinas (Tsukita S 1999), proteínas constitutivas de TJ que confieren adhesiones más fuertes que Ocludinas y se ha descrito que pueden formar complejos heterodímeros (Furuse, Sasaki et al. 1998). Y 3) (JAM) (junctional adhesión molecules), son proteínas miembros de la familia de las inmunoglobulinas que actúa como proteínas de andamiaje, está concentrada entre las uniones intercelulares, de ahí su nombre. (Martin-Padura, Lostaglio et al. 1998) (Fanning, Mitic et al. 1999).

Diferentes proteínas de la familia de las Claudinas (1-3-4-5-7-8-11), se localizan en el testículo, pero solo Claudina-11 se encuentra en las células de Sertoli (Kaiyu'u-Lino 2007; Cornelia F 2009), al igual que en otras barreras epiteliales como en los oligodendrocitos, que forman la barrera hematoencefalica. Lo cual indica que esta proteína es capaz de formar contactos transcelulares requeridos para sellar espacios intercelulares como en el epitelio del túbulo seminífero, confirmando funcionalidad y adhesividad celular (Morgado-Díaz 2007). Además en testículos de ratones *Cldn11*^{-/-} las células germinales no entran en meiosis, produciendo infertilidad, esto señala aun más, la importancia de esta proteína, propia de la célula de Sertoli para la correcta función espermatogénica.

Un grupo importante de proteínas de adhesión de uniones estrechas, lo conforman las proteínas adaptadoras al citoesqueleto, entre ellas la mas estudiada es la familia de proteínas, *Zona Occludens* (ZO-1, ZO-2, ZO-3) proteínas asociadas a MAGUK kinasas, que forman parte de la BHT (Stevenson, Siliciano et al. 1986; Jianliang 2009) y son una plataforma para la transducción de señales.

En testículos maduros ZO-1 está asociada a TJ y a AJ en los sitios de contacto de células de Sertoli – Sertoli y Sertoli - germinales, estando implicada en conformar una unión mecano-química entre las membranas celulares (Yamazaki, Tokumasu et al. 2011) a través de la

asociación con proteínas del citoesqueleto, contribuyendo con las propiedades de sellado (Itoh, Furuse et al. 1999).

I.3.b UNIONES ADHERENTES, EN LA BARRERA HEMATOTESTICULAR:

Las AJ están constituidas por familias de proteínas que unen elementos del citoesqueleto de una célula a otras o con la matriz extracelular, conformando un sistema que mantiene la integridad de los tejidos.

Las AJ entre células de Sertoli adyacentes y células de Sertoli - células germinales, forman la especialización ectoplasmica y el complejo tubulobulbar. Estas uniones solo son encontradas en el microambiente del túbulo seminífero, coexistiendo con las TJ, GJ y desmosomas, para constituir la BHT (Parreira, Russell et al. 2002).

Las moléculas, componentes de estos sistema son los complejos Cadherinas/Cateninas (Nikki P.Y. Lee 2003) y Nectin/Afadin (Mruk, Lee et al. 2004), al igual que el complejo Laminina 333/ $\alpha 6\beta 1$ integrinas (Yan, Mruk et al. 2008).

Recientes descubrimientos han mostrado que en la porción apical del túbulo seminífero, la especialización ectoplasmica también confiere orientación y polaridad ilustrando que algunas de las funciones inicialmente adscritas a TJ, como es la polaridad celular, también son parte de las propiedades inherentes a las AJ (Wong, Mruk et al. 2008).

Ha sido demostrado que la expresión de Cadherina-E; una de las principales AJ, constitutivas de la BHT es más alta cuando se ensamblan las TJ, sugiriendo que el ensamblaje de TJ requiere el reclutamiento de uniones adherentes. De igual forma estudios inmunohistoquímicos han demostrado que el reclutamiento del complejo de unión Cadherina-E/ β -catenina en células de Sertoli se correlaciona con la formación de la BHT (Byers, Sujarit et al. 1994).

Los eventos de la dinámica de las Uniones adherentes y su regulación en el testículo son uno de los más intrigantes fenómenos de la espermatogénesis, siendo muy poco conocidos.

I.3.c UNIONES DE COMUNICACIÓN, EN LA BARRERA HEMATOTESTICULAR

La formación de la barrera hematotesticular y por consiguiente la espermatogénesis, requiere una comunicación intracelular directa, en especial entre las células de Sertoli adyacentes y células de Sertoli con las células germinales, que es mediada por uniones de Comunicación o GJ, que son canales intercelulares que unen el citoplasma de células vecinas en numerosos tejidos (Mese, Richard et al. 2007).

Las GJ están constituidas por poros hexaméricos formados por oligomerización de proteínas de la familia de las conexinas (Cx) en especial la Conexina 4 (Cx-43), que es la GJ predominante en el testículo.

La Cx-43 está presente entre células de Sertoli adyacentes en los sitio de formación de BHT, al igual que entre Sertoli - germinales y células germinales adyacentes, (Roscoe, Barr et al. 2001; Decrouy, Gasc et al. 2004). Su función más importantes es regular el crecimiento celular y la diferenciación controlando el paso de pequeñas moléculas con una relativa masa molecular de 1kDa, como son precursores metabólicos, nutrientes e incluyendo segundos mensajeros como inositol (1,4,5)-triphosphate, cAMP e iones (Michelle W. M. Lia 2009).

Por otro lado los desmosomas son un tipo de adhesión célula – célula que usa filamentos intermedios como su sitio de anclaje, se relacionan de forman intima con las conexinas, pudiendo esta interacción molecular; desmosomas / GJ otorgar propiedades de adhesión celular en la BHT (Mruk, Silvestrini et al. 2008; Yan, Mruk et al. 2008), y sirven como plataforma para la transducción de señales (Mese, Richard et al. 2007).

Hay evidencias que el principal constituyente de los desmosomas en células de Sertoli Plakophilin-2, se relaciona con Cx-43, formando un complejo proteico que regula la dinámica de la BHT, a través de sus efectos sobre la redistribución de los complejos de TJ. Permitiendo probablemente a los espermatoцитos en preleptoteno en tránsito por la BHT usar las uniones de desmosomas para facilitar su movimiento, manteniendo al mismo tiempo las funciones inmunológicas de la barrera hematotesticular (Michelle W. M. Lia 2009).

I.3.d HEMIDESMOSOMAS Y OTRAS UNIONES CÉLULA - CÉLULA.

Hemidesmosomas son uniones entre filamentos intermedios de células adyacentes y la matriz extracelular y son detectadas en la porción más basal de la BHT en las células de Sertoli (Mruk, Lee et al. 2004). Solo se conocen como posibles componentes, la interacción entre Laminina $\gamma 3 \beta 3 / \beta 1$ integrina (Yan 2008), pero su completa composición bioquímica permanece largamente inexplorada.

Cabe mencionar el papel de la lámina basal y la túnica propia, que conforman el compartimiento peritubular en el epitelio seminífero.

Está formada por una zona acelular, que consiste en varias capas de matriz extracelular compuesta principalmente de fibras de Colágeno tipo IV y Laminina, siendo una forma modificada de matriz extracelular, adyacente a la célula de Sertoli (Dym and Fawcett 1970) la cual no ha sido demostrado, sea una barrera fisicoquímica.

La zona celular está formada por células mioideas peritubulares y fibroblastos, en algunas especies la membrana basal del epitelio seminífero y las células mioideas constituyen una barrera parcial a la libre difusión. pero en el hombre no es así, como ha sido demostrado en estudios por microscopía electrónica con el uso de trazadores (Fawcett DW 1956).

Es así como solo los complejos de uniones entre células de Sertoli son los sitios anatómicos de la barrera hematotesticular. (Fig. 3)

I.3.e ROL DE LAS HORMONAS EN LA FORMACION DE LA BARRERA HEMATOTESTICULAR

La espermatogénesis es un complejo evento bioquímico, que involucra la participación del eje hipotálamo-pituitaria-testicular, como regulador crucial, mediante la secreción de la hormona hipotalámica, liberadora de gonadotrofina (GNRH) y 2 hormonas pituitarias, hormona folículo estimulante (FSH) y hormona luteinizante (LH)

La hormona folículo estimulante (FSH) estimula la proliferación de las células de Sertoli durante el periodo neonatal (Meachem, McLachlan et al. 1996; Allan, Garcia et al. 2004), e indirectamente la LH controla la espermatogénesis a través de la producción de la hormona

testosterona producida por las células de Leydig (Walker 2009), que es la hormona androgénica más importante y cuya principal función es regular la espermatogénesis estimulando la expresión génica de varias proteínas indispensables para este proceso.

Se conoce que la célula de Sertoli es el blanco para las hormonas folículo estimulante (FSH) y testosterona, y además es la única célula testicular que posee el receptor para FSH y el receptor de andrógenos. La dinámica de estas hormonas sobre la células de Sertoli, le permite soportar la maduración de células germinales que conlleva a la espermatogénesis (Sharpe, McKinnell et al. 2003)

También está descrito que tanto FSH como testosterona tienen efectos en la dinámica de la BHT, regulando la formación de las especializaciones ectoplasmica y estimulando la organización de las TJ y AJ entre células de Sertoli y células de Sertoli – células germinales (Sluka, O'Donnell et al. 2006).

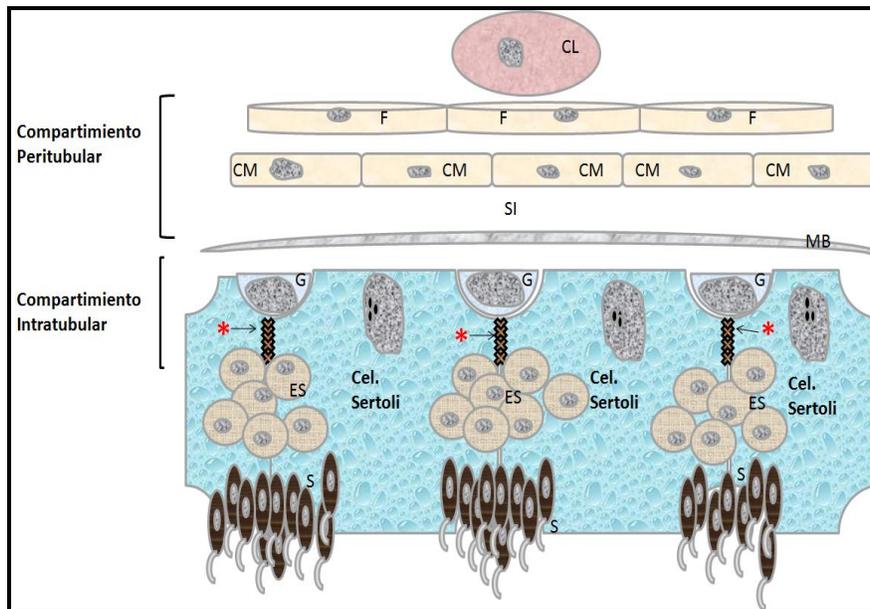


Figura 3: Formación de la barrera hematotesticular.

Esquema que muestra células de Sertoli comunicadas entre sí, formando la barrera hematotesticular, además se muestra la distribución de algunas células testiculares, CL: Célula de Leydig; F: fibroblastos; CM: células Mioideas; MB: Membrana basal del túbulo seminífero; SI: sustancia intercelular; G: espermatogonias; ES: espermatocitos; S: espermátidas. (*) Uniones entre células de Sertoli que conforman el sitio anatómico de la barrera hematotesticular.

I.4 FISILOGIA DE LA BARRERA HEMATOTESTICULAR

Mientras los cambios morfológicos durante la espermatogénesis ya son conocidos desde décadas atrás. Los eventos bioquímicos que regulan y coordinan las etapas de la reestructuración de uniones celulares en la barrera hematotesticular y en la espermiación, permanecen largamente inexplorados y desconocidos, en especial el papel de FSH y otros factores autocrinos en estos procesos.

Se conoce que existe una extensiva reestructuración de las uniones de la BTH, para permitir el tránsito de los espermatoцитos en preleptoteno / leptoteno a nivel del compartimiento basal del túbulo seminífero, atravesando la BHT y entrando las células germinales al compartimiento adluminal, para continuar con su diferenciación durante los estados VIII al IX del Ciclo del epitelio seminíferos, siendo un evento muy importante para la progresión de la espermatogénesis (Russell 1977).

Se conoce que muchas citoquinas en especial $TNF\alpha$ y $TGF\beta$, hormonas como testosterona y elementos de la matriz extracelular como metaloproteasas, son importantes reguladores de la dinámica de las uniones de las BHT. Promoviendo la ruptura de los complejos de unión, manteniendo y al mismo tiempo facilitando el ensamblaje de nuevas proteínas de adhesión celular (Yan, Mruk et al. 2008; Cheng, Wong et al. 2010) y todo ello de forma sincronizada para poder mantener el tránsito y diferenciación de espermatoцитos tanto como las funciones inmunológicas, demostrando que es un mecanismo muy eficiente.

En resumen, enormes esfuerzos se están realizando para discernir cada vez más la compleja dinámica del microambiente formado por la BHT y su importancia en el proceso de la espermatogénesis. Sin embargo son cada vez mayores las interrogantes que quedan al definir nuevos modelos, como por ejemplo, cuál es la composición bioquímica de los elementos que regulan la BHT, qué señal los gatilla, cuáles son las proteínas blanco, qué tipo de cascada de señalización forma, cuáles son sus relaciones fisiológicas y funcionales, y cuál es el mecanismo biológico que las genera.

I.5. CULTIVOS PRIMARIOS DE CELULAS DE SERTOLI Y SUS APLICACIONES.

Cultivos primarios de células de Sertoli han llegado a ser una técnica muy popular, para investigar las funciones de la célula de Sertoli y para clarificar su función en la espermatogénesis. Se destacan los trabajos pioneros de *Steinberger* en el campo (Steinberger and Steinberger 1966; Steinberger and Steinberger 1970; Steinberger and Steinberger 1971; Steinberger 1975; Steinberger, Heindel et al. 1975). Pero a la fecha muy pocos modelos *in vitro* han permitido reproducir y testear la fisiología de la BHT o investigar otros parámetros tales como la toxicidad de ciertos compuestos químicos sobre la función reproductiva, (Legendre, Froment et al.).

Entre los compuestos tóxicos que provocan daño a las funciones reproductivas se puede nombrar entre los más conocidos a: Bisfenol A (BPA), que es un toxico ambiental de tipo estrogénico, usado para la manufactura de policarbonatos, epóxidos y resinas plásticas. En general todos las personas están siempre en contacto a este tipo de elementos o a sus derivados, los cuales se metabolizan muy rápido en el cuerpo (Fiorini, Tilloy-Ellul et al. 2004).

Diversos estudios han mostrado que Bisfenol A perturba la integridad de la barrera hematotesticular (Li, Mruk et al. 2009), esta propiedad de agente disruptor de tipo reversible, de las adhesiones de la BHT; le han permitido a este compuesto ser utilizado como un agente útil para el estudio del trafico de proteínas y de la regulación de la BHT (Zhang, Lin et al. 2008; Li, Mruk et al. 2010).

I.6. PROTEINAS DE LA FAMILIA ADAMS Y SUS FUNCIONES EN LA ESPERMATOGENESIS.

En la búsqueda de nuevos mecanismo de regulación de la espermatogénesis, específicamente sobre la dinámica de las adhesiones celulares de la BHT, se podrían

proponer múltiples moléculas. En nuestro laboratorio se han estado llevando a cabo muchas investigaciones sobre un grupo específico de proteínas, las metaloproteasas de la familia ADAMs y su papel fisiológico en los fenómenos de reproducción.

Las proteínas ADAMs (A desintegrin and metalloproteases) son proteínas transmembrana de tipo I. Por su estructura molecular combinan características de moléculas de adhesión celular y proteinasas, ya que poseen un dominio metaloproteasa formado por la secuencia de unión a un átomo de zinc que define su capacidad de proteína proteolítica, mientras que su dominio “*desintegrin*” se une a un fragmento de integrina lo que le proporciona sus propiedades de adhesión en membranas celulares (Primakoff and Myles 2000).

Esta familia de proteínas son fundamentales para el control de múltiples procesos en el desarrollo y la homeostasis; cumpliendo varias funciones en procesos celulares, destacando: la fertilidad, la neurogenesis, y el control del ciclo celular (Blobel 2000), y al mismo tiempo cuando sus funciones no son reguladas tienen una importante conexión en estados patológicos incluyendo: Cáncer, enfermedades cardiovasculares, y Alzheimer.

De 37 proteínas de la familia ADAMs conocidas, 25 de ellas se han descrito, expresadas de forma exclusiva o predominante en el tejido reproductivo (Wolfsberg, Straight et al. 1995; Primakoff and Myles 2000). Hay evidencias que sugieren, la existencia de un sistema en red de algunas de las proteínas de la familia ADAMs, que cumplen funciones en testículo y epidídimo (Kim, Oh et al. 2006; Han, Choi et al. 2009), jugando este grupo de moléculas, en espermatozoides un papel importante en los procesos de maduración, adhesión y migración al útero, eventos que conducen a la fertilidad (Edwards, Handsley et al. 2008).

ADAM 17, también conocida como TACE, enzima convertidor de TNF- α , que es requerida para el desarrollo de tejidos epiteliales. Y ADAM10 también conocida como CD156c, metaloproteasa con alta capacidad proteolítica, comparten homología estructural y algunos sustratos, Además ambas provocan la transducciones y regulación de señales que llevan a proliferación y desarrollo en muchos epitelios (Maretzky, Reiss et al. 2005; Reiss, Maretzky et al. 2005),.

Investigaciones en nuestro laboratorio han revelado que estas dos metaloproteasas están en testículo y son implicadas en el clivaje de sustratos, y en vías de señalización que inducen

muerte celular en células germinales (Lizama, Rojas-Benitez et al. 2010; Lizama, Rojas-Benitez et al. 2011) y además estudios pionero realizados en nuestro laboratorio han demostrado que también median la apoptosis de células germinales inducida por xenoestrogenos (dato no publicado).

Existiendo evidencias importantes de la participación de ADAM10 y ADAM17 en procesos relevantes durante la espermatogénesis, al igual que en daño a nivel reproductivo producido por tóxicos ambientales. Sería importante estudiar su expresión en la célula de Sertoli, sus mecanismos de regulación y su relevancia en procesos fisiológicos.

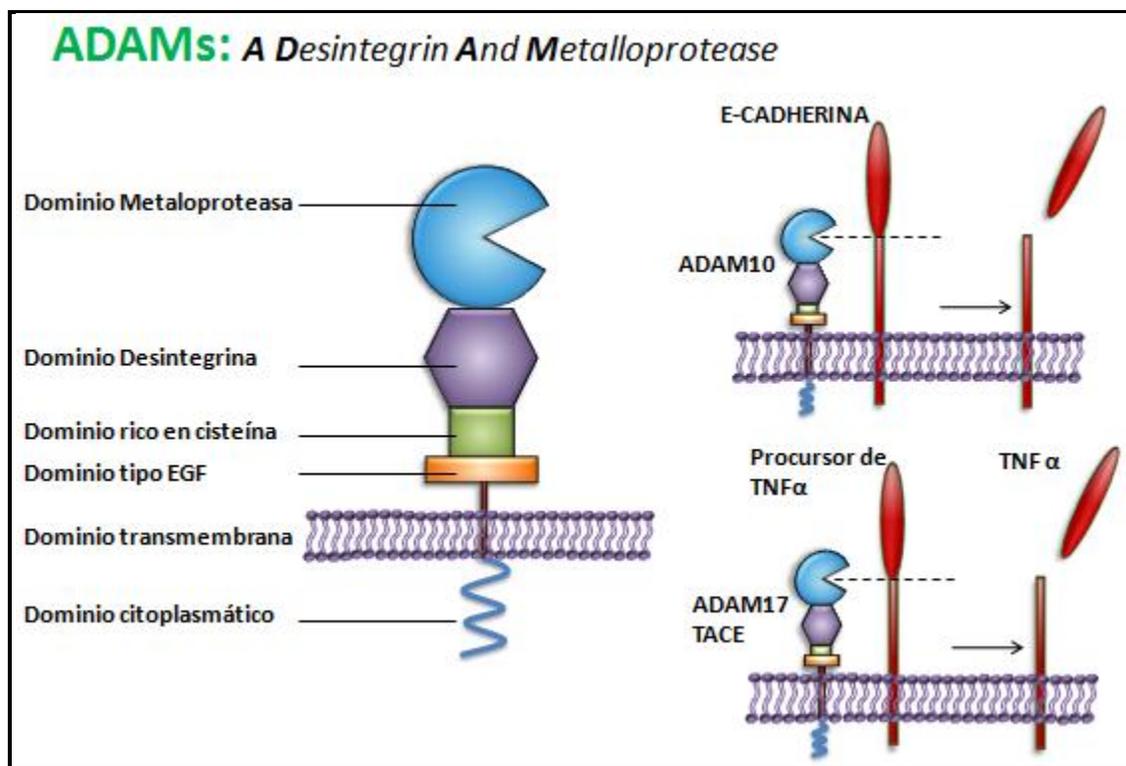


Figura 4: Proteína de la familia ADAMs y su función.

Esquema muestra, estructura molecular de proteína de la familia ADAMs y su función proteolítica.

I.6 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:

Por las evidencias presentadas, es importante poder contar con un sistema modelo *in vitro*, que pueda estudiar más detalladamente las funciones de la célula de Sertoli, aislada del componente espermatogénico, su dinámica y respuesta a factores tróficos, hormonales o tóxicos ambientales.

Con estas referencias se plantea la interrogante. ¿Podría un cultivo de células de Sertoli, proliferar y expresar proteínas de adhesión celular formadoras de la barrera hematotesticular y ser estos procesos modulados por factores paracrinicos como hormonas propias de la fisiología testicular así como por tóxicos ambientales?

En este trabajo de investigación, se probaran metodologías que intenten diferenciar y caracterizar un cultivo primario de células de Sertoli en lo que respecta, si las células en nuestro estudio pueden o no proliferar *in Vitro*. Al mismo tiempo se intentará definir la formación de uniones celulares entre células de Sertoli *in vitro*, iguales a los conocidas y expresadas en la BHT, al igual que con suficiente validez, determinar si estos procesos pueden ser modulados por hormonas y/o tóxicos ambientales.

Además de proponer por primera vez la expresión y modulación de proteínas de la familia ADAMs en células de Sertoli, nuevas proteína implicadas probablemente en el mecanismo de daño por toxicidad a nivel reproductivo.

II. HIPOTESIS

FSH, Testosterona y Bisfenol A. son moduladores de la proliferación, y de la expresión de proteínas de la barrera hematotesticular y ADAM 10, de células de Sertoli en cultivo.

III. OBJETIVOS

III.1 OBJETIVO GENERAL

1. Estudiar si la proliferación de células de Sertoli en cultivo es modulada por FSH, Testosterona y Bisfenol A.
2. Estudiar el efecto de FSH, Testosterona y Bisfenol A sobre la expresión de proteínas de la barrera hematotesticular y ADAM 10 en células de Sertoli *in vitro*.

III.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 1.1 Caracterizar un modelo *in Vitro* de cultivo de células de Sertoli de rata y Evaluar la expresión y localización de proteínas formadoras de la barrera hematotesticular.
- 1.2 Determinar que la adición de FSH y testosterona aumenta la proliferación de células de Sertoli en cultivo
- 2.1 Determinar que la expresión y localización de proteínas de adhesión celular cambia frente a tratamientos con Bisfenol A, FSH y testosterona *in Vitro*
- 2.2 Evaluar la expresión y localización de ADAM 10 y 17 en células de Sertoli *in Vitro*.
- 2.3 Determinar que la expresión y localización de ADAM 10 cambia frente a tratamientos con por FSH, Testosterona y Bisfenol A. *in Vitro*

IV. MATERIALES Y METODOS

IV.1 ANIMALES

Para todos los experimentos se utilizaron ratas machos Sprague-Dawley de 17 días de edad, procedentes del bioterio de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica de Chile, con sede en la ciudad de Santiago.

Las ratas fueron mantenidas bajo un ciclo luz-noche de 12 horas con agua y comida *ad libitum* y fueron sacrificadas por dislocación cervical. Las investigaciones se llevaron a cabo; siguiendo las reglas extendidas por la Guía para el cuidado y uso de Animales agrícolas en la investigación y por el Consejo Nacional de Investigaciones.

IV.2 ANTICUERPOS, REACTIVOS Y HORMONAS

Anticuerpos Primarios y Secundarios usados en el estudio, se describen en la siguiente tabla:

Anticuerpos Primarios	Procedencia	Tipo/Huésped
Claudina-11	Santa Cruz, Biotechnology, CA, USA	Policlonal / Conejo
Zona Ocludens-1 (ZO-1)	Zymed - Invitrogen, Carlsbad, CA, USA	Policlonal / Conejo
E-Cadherina	BD, Biosciences, Franklin Lakes, NJ USA	Monoclonal/Ratón
FAS-L	R&D Systems, Minneapolis, MN USA	Policlonal / Ratón
FAS - (APO-1)	Santa Cruz, Biotechnology, CA, USA	Policlonal / Conejo
Clusterin - α/β	Santa Cruz, Biotechnology, CA, USA	Policlonal / Conejo
β -actina	Sigma, ST. Louis, MO, USA	Policlonal / Ratón
Vimentina	Sigma, ST. Louis, MO, USA	Policlonal / Ratón
ADAM-10	Abcam, Cambridge, MA, England	Policlonal / Conejo
ADAM-17	Abcam, Cambridge, MA, England	Policlonal / Conejo
Anticuerpos Secundarios	Procedencia	
Anti-ratón-FITC	Zymed - Invitrogen, Carlsbad, CA, USA	-----
Anti-rata-FITC	Zymed - Invitrogen, Carlsbad, CA, USA	-----
Anti-conejo-FITC	Zymed - Invitrogen, Carlsbad, CA, USA	-----
Anti-ratón-HRP	CPL Biologicals, Inc, USA	-----
Anti-conejo-HRP	CPL Biologicals, Inc, USA	-----

Tabla 1: Anticuerpos Primarios y secundarios empleados:

Las hormonas y suplementos empleados para enriquecer el medio de cultivo, en diferentes experimentos, se describen en la siguiente tabla:

Hormonas y/o Suplementos	Concentraciones empleadas
Folículo Estimulante recombinante humana	5 - 10 ng/ml
Testosterona	3 μ M
4 Androstene-3,17diona	5 - 25 μ M
Insulina	5 μ g/ml
Ac. L-ascórbico	50 μ g/ml

Tabla 2: Hormonas y/o Suplementos empleados:

IV.3 CULTIVO PRIMARIO DE CELULAS DE SERTOLI

Ratas machos prepúberes de 17 días de edad se sacrificaron por dislocación cervical, se extrajeron ambos testículos los cuales se decapsularon y se colocaron en PBS estéril para luego cambiar por 15 ml de medio de cultivo DMEM-F12 incompleto (sin suero) en un matraz autoclavado dentro de cámara de flujo. La eliminación del suero ha permitido desarrollar un sistema definido al cual se le puede adicionar hormonas o factores requeridos en condiciones de alta pureza y a concentraciones definidas.

El protocolo de aislación diseñado es una modificación del método descrito por: (Grima, Pineau et al. 1992; Li, Lee et al. 2001). Los testículos aislados se sometieron a una digestión enzimática, con la solución de digestión No.1, se empleo 0,5 mg/ml de Colagenasa tipo I (Sigma, St.Louis, MO, USA), 0,1 mg/ml de hialuronidasa (Sigma, St.Louis, MO, USA); 0,05 mg/ml de DNAsa (Sigma, St.Louis, MO, USA). Se agito suavemente por un máximo de 20 minutos, hasta obtener y observar los túbulos seminíferos separados (sirve para eliminar células endoteliales y remanentes de células sanguíneas). Se lavaron los túbulos seminíferos con medio de cultivo fresco por 3 minutos, se dejaron precipitar los túbulos por gravedad y se retiro el medio (estos lavados se realizaron 3 veces).

A continuación se sometieron los túbulos seminíferos a una segunda digestión enzimática (sirve para eliminar remanentes de células de Leydig), se empleó una solución de digestión No. 2 que consta de: 15 ml de DMEM-F12 suplementado con Glicina 1M y EDTA 2mM, se agitó suavemente por 10 – 15 minutos, y se repitieron 3 lavados. Se volvió a realizar la primera digestión enzimática (sirve para eliminar remanentes de células mioideas peritubulares) con la solución No. 1, repitiendo 3 lavados y luego se disgregaron mecánicamente los túbulos seminíferos con pipeta Pasteur entre 10 a 15 veces.

La suspensión celular resultante se filtró mediante mallas de nylon de 250 y 70 μm (Small Parts, Inc. Miramar, FL, USA), el filtrado se centrifugó a 500 rpm por 3 minutos, se eliminó el sobrenadante (remanente de células germinales) y el precipitado (células de Sertoli) se resuspende en medio DMEM-F12 suplementado con antibióticos, para plaquear a una densidad de 1×10^6 células/ml.

Cuando se requirió, se plaquearon células sobre cubreobjetos cubiertos por Matrigel (Sigma), a una concentración de 2.5 mg/ml. Matrigel es un suplemento extraído de sarcomas de rata, que consiste principalmente en moléculas de matriz extracelular, como laminina, Proteoglicanos, heparan sulfato y Colágeno IV, contiene también diversos factores de crecimiento como EGF-IGF, y significativas cantidades de proteasinas, activador del plasminógeno, metaloproteasas y factores angiogénicos como TGF (Kleinman and Martin 2005).

El manejo y desecho de animales de experimentación, se realizó de acuerdo a lo estipulado en el Manual de Normas de Bioseguridad, editado por CONICYT en 1994. Los restos de animales sacrificados y los remanentes del proceso de cultivo se eliminaron rutinariamente como desechos biológicos, siguiendo los protocolos de la Universidad, para estos fines.

IV.4 TRATAMIENTOS

Las células se cultivaron según los tiempos descritos para cada experimento en una estufa a 37 °C en una atmosfera de 95% de O₂ y 5 % de CO₂, los protocolos de cultivos primarios de células de Sertoli son bastantes ambiguos en definir la temperatura de cultivo, teniendo como rango 35 a 37 °C, en el laboratorio se eligió trabajar bajo 37 °C. Se reemplazó el medio de cultivo cada 24 horas y la mayoría de ensayos se realizan a partir del tercer día de plaqueo.

Para el estudio de los efectos de hormonas y suplementos *in vitro*, sobre las células de Sertoli extraídas y purificadas, el medio de cultivo se suplemento con las soluciones de hormonas y/o suplementos antes descritos por 24 o 48 horas. Como control las células se cultivaron en medio DMEM/F12 incompleto (sin suero).

Para el estudio de los efectos de xenoestrogenos, sobre las células de Sertoli extraídas y purificadas, al medio de cultivo se adiciona concentraciones variables de Bisfenol A (BPA) (Sigma) por 24 horas.

IV.5 ESTUDIOS DE VIABILIDAD Y PROLIFERACION CELULAR

IV.5.a Incorporación de Azul de Tripán

La viabilidad de las células de Sertoli extraídas, se estudio a 1, 3, 5 días de cultivo en DMEN/F12 incompleto y/o suplementado con Matrigel, y frente a tratamiento. Transcurridos los periodos de tiempo necesarios, se adicionaron 10 µl de azul de Tripán (Sigma, St. Louis. MO, USA) a cada pocillo y se incubaron por 10 minutos.

A continuación, las células se extrajeron de cada pocillo por tratamiento con tripsina y adicionando una alícuota de 10 µl en cámara de Neubauer, por microscopia de campo claro se cuantifica el porcentaje de viabilidad celular restando el número de células en proceso de

muerte teñidas de color azul frente al total de células presentes otorgado por el conteo de los respectivos cuadrantes en la cámara de Neubauer, y expresando este dato en porcentaje.

IV.5.b Incorporación de CFSE, acoplada a Citometría de Flujo.

Para evaluar la proliferación celular se midió la especificidad de la pérdida de fluorescencia del colorante carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE), (Molecular Probes, Invitrogen, USA), cuantificando el porcentaje de intensidad de fluorescencia de CFSE a (λ excitación 491 nm, λ emisión 518 nm). Se midió utilizando un citómetro de flujo (FACS Calibur Becton Dickinson).

Las células a una densidad de 1×10^6 células/ml resuspendidas en PBS se cargaron con 3,3 mM de (CFSE) stock, incubándose por 15 minutos a 37 °C en una atmosfera de 95% de O₂ y 5 % de CO₂, se centrifugaron y se resuspendieron en medio DMEN-F12, volviéndose a incubar bajo las mismas condiciones durante 30 minutos, para finalmente sembrarlas en placas de 60 x 15 mm. Se requirió de un mínimo de 6 lapsos temporales para el análisis de proliferación; apartados en espacios de 12 – 24 – 48 – 72 – 96 y 120 horas, tomando como punto inicial 0 horas de cultivo, el mismo que es usado como control positivo de intensidad de fluorescencia. Un paso crítico en el diseño del experimento fue, tomar como control el valor de autofluorescencia, que fue obtenido usando células no cargadas con CFSE (Hawkins 2007).

Transcurrido los tiempos de incubación se extrajeron las células por rastrillos y fueron fijadas con paraformaldehído (PAF al 4%) al 4%, y almacenadas a 4 ° C. La intensidad de fluorescencia, el tamaño y la granularidad de las células de Sertoli se estudio mediante citometría de flujo, los resultados fueron analizados con el programa FCS express flow plus image versión 4.0.

IV.5.c Medición de Ciclo Celular

La proliferación celular es un proceso cuidadosamente regulado, las células tanto en cultivo como *in vivo* crecen y proliferan a medida que avanzan por las etapas de su ciclo celular. La citometría de flujo es capaz de identificar la distribución de las células durante las diferentes fases del ciclo celular, pudiendo ser reconocidas 3 distintas fases en una población de células proliferativas: Fase G0/G1, Fase S (síntesis de DNA) y Fase G2/M (mitosis), entendiéndose que la población celular está en fase proliferativa cuando hay una disminución de la fase G0/G1 y un aumento de la Fase G2/M.

Células de Sertoli aisladas según protocolo y plaqueadas en 1×10^6 células/ml fueron cultivadas en placas de 60 x 15 mm y fueron extraídas a las 12 – 24 – 48 – 72 – y 96 horas, fijadas en etanol 70% y almacenadas a -20°C , hasta ser leídas. Antes de la lectura, las células fueron marcadas con buffer de ciclo celular que contiene 50 $\mu\text{g/ml}$ de yoduro de propideo (IP) y detergente en etanol, para permeabilizar las membranas y permitir la entrada de IP al núcleo, La cantidad de IP unida al DNA de las células fijadas fue medida a: λ excitación 493 nm, λ emisión 630 nm, por citómetro (FACS Calibur Becton Dickinson).

Sobre 5000 células marcadas IP positivo, fueron analizadas en la citometría por cada muestra. Para el análisis de las fases del ciclo celular fue usado el programa FCS express flow plus image versión 4.0.

IV.6 INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA POR MICROSCOPIA CONFOCAL

Células de Sertoli aisladas y purificadas de testículos de rata de 17 días, fueron sembradas por 4-5 días, en cubreobjetos de plástico colocados en placas de 24 pocillos cubiertos con, o sin Matrigel. Se retiró medio de cultivo de las placas y células se fijaron con Paraformaldehído (PFA) 4% en PBS pH 7.4, durante 10 -15 minutos a temperatura ambiente, posteriormente las células se lavaron cuidadosamente 4 veces con PBS por 5 minutos, para retirar el exceso de (PFA), que pueda interferir. Se permeabilizó con una solución de PBS-BSA 1% - TritonX-100(0.01%), se bloqueó 1 hora con 500 μl a cada

cover de PBS-BSA 1%, luego se adicionó anticuerpo primario y se incubó en cámara húmeda toda la noche a 4°C, finalmente se revela con anticuerpos anti ratón o conejo, descritos en la sección anticuerpos, en caso de ser necesario se tiñen los núcleos con (IP). Las muestras se observaron bajo microscopios confocales (Olimpus Fluoview SV-1000, IX 82 y Zeis Modelo LSM 510).

Todos los parámetros fueron mantenidos constantes, para un particular tipo de experimento, las imágenes fueron adquiridas en 8 bits y se usaron 2 canales, para el canal No 1 se uso un anticuerpo secundario ligado a FITC (Fluorescein Isothiocyanate)(λ excitación 488 nm, λ emisión 505-525 nm); y para el canal No.2 se uso un anticuerpo secundario ligado a rodamina (λ excitación 513 nm, λ emisión 560 nm) o IP (excitación 493 nm, λ emisión 630 nm). Cuando se requirió se capturaron stacks de imágenes a intensidad $I(x,y,z) - E [0, 255]$; tamaño del voxel $\Delta x / \Delta y / \Delta z = 70/70/300$ nm. Se garantizó que la intensidad $I(x,y,z)$, no estuviese saturada y que el fondo de la imagen fuese superior a 1, ajustando la potencia del laser, la ganancia y el offset del detector. Se empleó objetivos de 60X y zoom digital, al igual que reconstrucciones tridimensionales de cortes en planos Z.

Los grupos de imágenes confocales fueron deconvolucionadas usando el software Huygens Scripting (Scientific Volumen Imaging, Hilversum, Netherlands), el procesamiento y análisis de las imágenes fue desarrollado en el laboratorio SCIAN (Universidad de Chile) usando el software Interactive Data Language (ITT, Boulder, CO)

IV.6.a Medición de la Colocalización de proteínas de adhesión celular

La fisiológica función de una proteína está fuertemente relacionada con su localización y es crucial para entender su rol en los procesos biológicos (Bolte and Cordelieres 2006).

Esta definición tiene mayor importancia en un microambiente como el formado por las células de Sertoli, en el túbulo seminífero dado que las TJ de la BHT diseñan un límite entre el dominio apical y el basolateral de la célula de Sertoli.

Microscopia confocal es usada frecuentemente para estudiar la distribución espacial o localización de una macromolécula en una particular estructura subcelular, en especial cuando la distribución de la estructura subcelular no es uniforme, por ejemplo como la observada en membranas celulares donde la delgadez es aproximadamente 50 °A.

Es extremadamente importante entender el error asociado con las diferentes técnicas de colocalización (Comeau, Costantino et al. 2006). Es por eso que es conveniente usar un modelo deconvolucionado, que nos pueda guiar a una correcta interpretación de las imágenes fluorescentes en Microscopia Confocal (Fink, Morgan et al. 1998)

El procedimiento de deconvolución empleado, establece un umbral entre lo que se considera señal y ruido usando un algoritmo basado en estimadores de máximos comunes (PSF), este procedimiento es esencial para el análisis de imágenes y para los cálculos de coeficientes de co-localización (Ramirez, Vidal et al. 2009). La segmentación de ROI en nuestras imágenes fue otra metodología empleada, que se basa en el proceso que separa objetos o R.O.I que tengan algún significado dentro de la imagen, mediante criterios de proximidad, similitud y continuidad.

Co-localización se define como la presencia de diferentes moléculas en un mismo espacio bidimensional en una célula dos moléculas fluorescentes co-localizan cuando la emisión de fotones son detectados dentro del mismo pixel (2 dimensiones) o voxel (tres dimensiones). Hasta ahora ninguna metodología estándar se ha establecido para poder caracterizar la co-localización, de forma inequívoca, por la gran diversidad de estructuras biológicas de interés

El análisis de imágenes empleado produce 2 coeficientes que representan la fracción del objeto que co-localiza en cada componente de una imagen en canales duales (Manders 1993). los coeficientes Manders 1 (M1) y Manders 2 (M2); describen la contribución de la intensidad de fluorescencia de cada uno de los canales seleccionados, para los pixeles de interés, de cada ROI (Zinchuk, Zinchuk et al. 2007). Así para la cuantificación de la co-localización se calculo en el programa determinado M1 y M2 entre las regiones de interés de las imágenes procesadas, según la siguiente definición.

$$M_1 = \frac{\sum_i I_{Ch1(ROI1 \cap ROI2)}}{\sum_i I_{Ch1(ROI1)}}, \quad M_2 = \frac{\sum_i I_{Ch2(ROI1 \cap ROI2)}}{\sum_i I_{Ch2(ROI2)}}$$

Cabe destacar que los criterios de deconvolucion y segmentación, fueron mantenidos constantes para el análisis de todas las imágenes dentro de una categoría en particular. La calidad de la segmentación fue controlada interactivamente solapando la imagen fluorescente original, con las mascararas que crea la segmentación en cada canal.

IV.7 WESTERN BLOTS

Células de Sertoli extraídas y cultivadas bajo las condiciones antes descritas, al igual que extractos proteicos de testículos decapsulados usados como control; se separaron para cuantificación de proteínas, extraídas mediante sonicación en tampón RIPA (50 mM Tris-HCL pH 7,4; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA, 1 mM NAF, 1% deoxicolato de Sodio; 1 mM PMSF y coctel de inhibidor de proteasas (Sigma, St. Louis, MO, USA). La cuantificación de proteínas se determinó mediante el método descrito por Bradford (1976). Seguido, 20 µg de proteínas se separaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida SDS-PAGE; en porcentajes entre 7.5% y 15% dependientes del peso molecular de las proteínas estudiadas. Las proteínas se transfirieron a una membrana de Nitrocelulosa (Thermo Scientific). Luego de incubar toda la noche con los anticuerpos primarios, las membranas se lavaron tres veces por 5 minutos en TBS - Tween al 0,1%. Para luego incubarse por una hora con sus respectivos anticuerpos secundarios acoplados a HRP.

Cada Western Blot fue revelado por quimioluminioscencia (Kit de revelado Perkin-Elmer). Para todos los casos como control de carga se utilizo la detección de β-actina (1:5000, Sigma. St, Louis, MO, USA).

IV.8 ANALISIS ESTADISTICO

Análisis estadísticos, fueron desarrollados usando el programa GraphPad Prism, versión 5.01 (GraphPAd Software, La Joya, CA, USA)

V. RESULTADOS

V.1 ESTUDIAR SI LA PROLIFERACION Y EXPRESION DE PROTEINAS DE LA BHT y ADAM-10, SON MODULADAS *IN VITRO* POR FSH – TESTOSTERONA Y BISFENOL A

V.1.1 CARACTERIZAR UN MODELO *IN VITRO* DE CULTIVO DE CELULAS DE SERTOLI DE RATA Y EVALUAR LA EXPRESION Y LOCALIZACION DE PROTEINAS FORMADORAS DE LA BARRERA HEMATOTESTICULAR.

V.1.1.a Estudiar la Pureza de Cultivo por Morfología

El empleo de cultivos primarios de Células de Sertoli posee la desventaja, de contener en muchos casos más de 1 tipo celular y frecuentemente no mantienen sus funciones por periodos prolongados (Mather 1980), por tal aseveración se necesita para diseñar un modelo de cultivo primario establecer un grado de pureza del cultivo. Está descrito que células de Sertoli *in vitro* poseen una alta tasa glucolítica, y producen lactato y piruvato, por ello se ha encontrado que el medio mínimo DMEM-F12 puede ser útil para el cultivo primario de este tipo celular, con estos datos se diseñaron las condiciones optimas para disminuir al mínimo la contaminación y proliferación de células germinales *in vitro*.

Las células de Sertoli extraídas según protocolo detallado en secciones anteriores fueron primero analizadas morfológicamente, una vez marcados con 1% de azul de Toluidina, la gran mayoría de las células del cultivo mostraron una morfología uniforme, similar a la descrita en la literatura para la célula de Sertoli, siendo relevante mencionar, para su identificación, la observación de núcleo ovoide con gránulos de heterocromatina y diferenciación de nucléolos tripartitos, al igual que se distingue en todas las células una gota lipídica, y un extenso citoplasma, con abundante granularidad, características de la célula en estudio (Fig 5).

Este resultado revela que en examen directo al microscopio las células obtenidas en cultivo primario presentan la misma morfología descrita en la literatura para la célula de Sertoli.

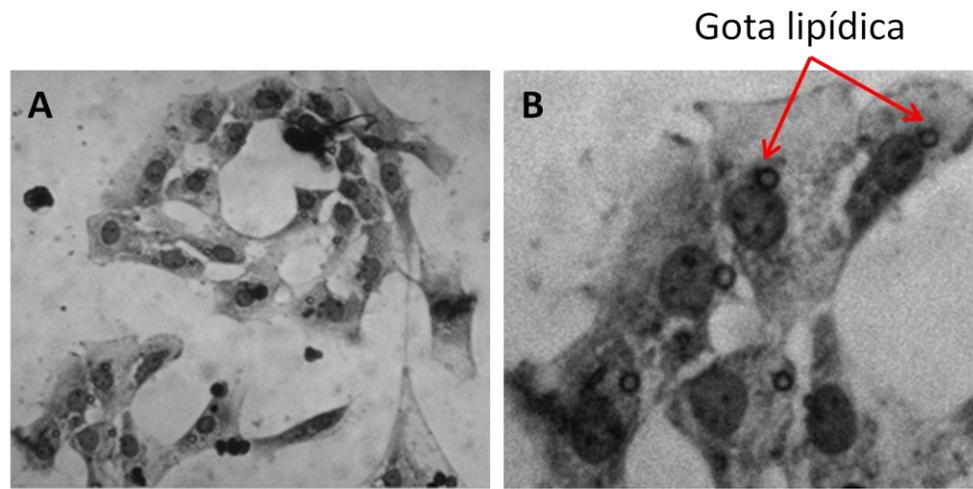


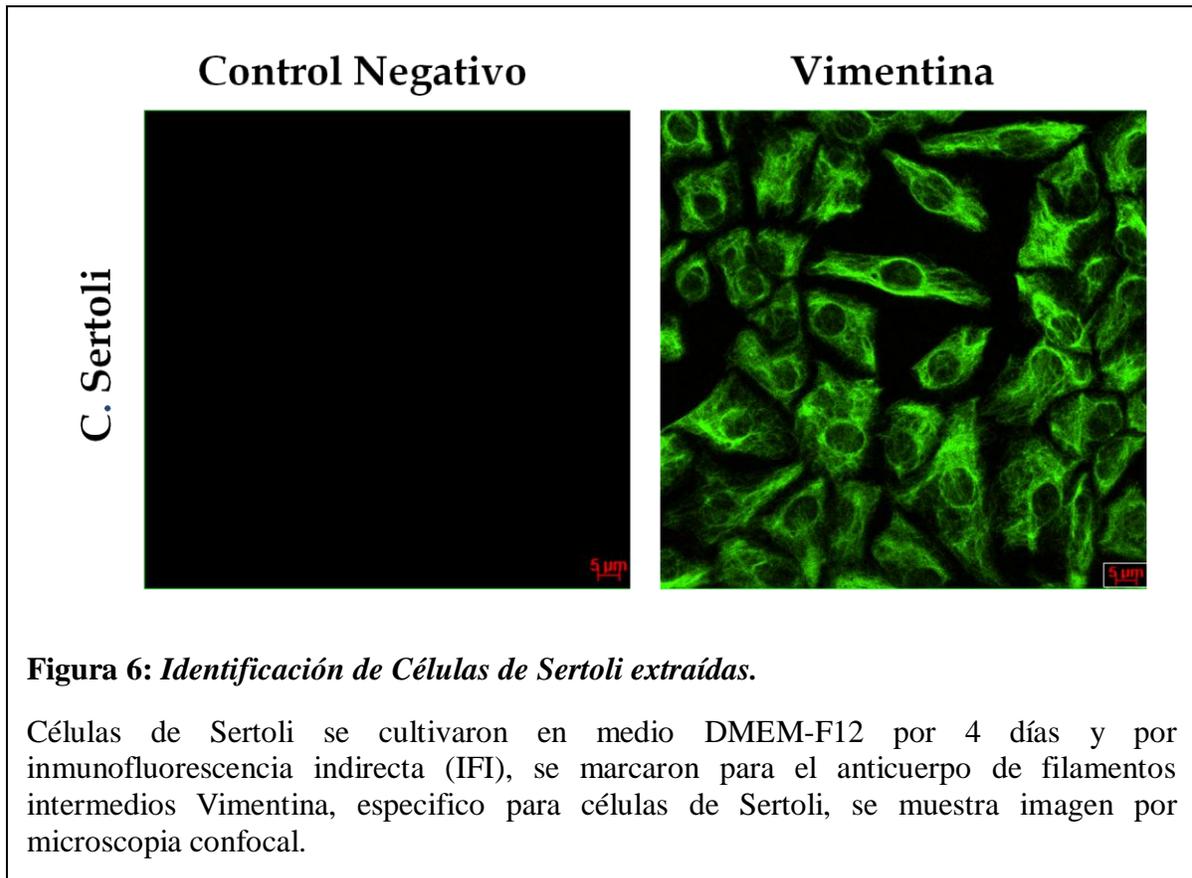
Figura 5: Evaluación de la morfología de células de Sertoli extraídas.

Células de Sertoli de ratas de 17 días se cultivaron en medio DMEM-F12 sin suero, y se marcaron con solución de azul de Toluidina por 5 minutos previo a la examinación directa al microscopio. Se puede distinguir células alargadas, con citoplasma granular, núcleos ovoides, nucléolos tripartitos y la presencia de una gota lipídica, características morfológicas de las células de Sertoli. Imágenes en escala de grises, en A) imagen adquirida con objetivo 40X, B) adquirida a 60X.

V.1.1.b Medir la Pureza del cultivo por el uso de Marcadores Celulares.

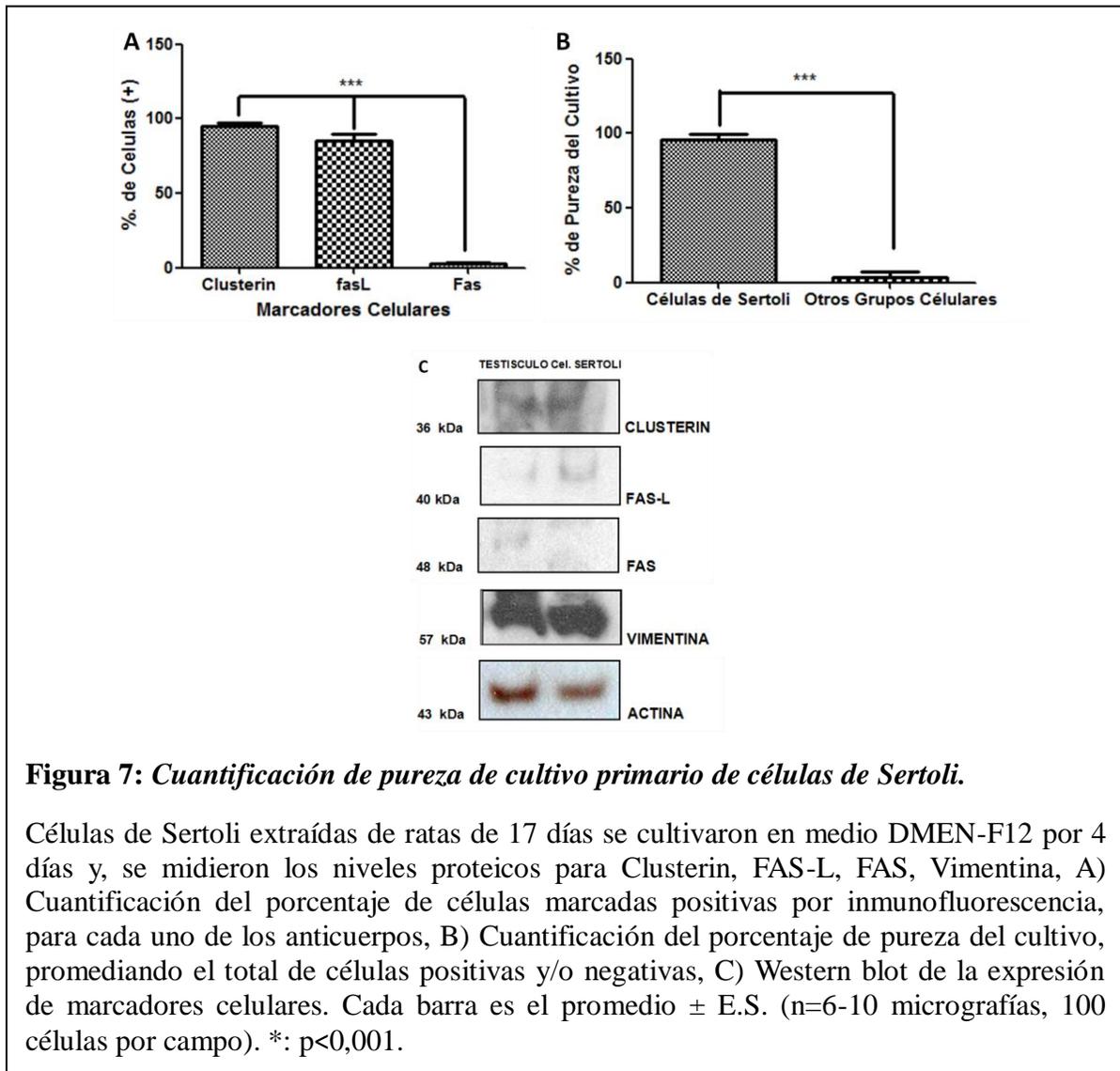
Para demostrar y cuantificar la pureza del modelo de cultivo primario, se emplearon marcadores celulares y se midió sus niveles por western blot e inmunofluorescencia indirecta con microscopia confocal. Se uso como marcador positivo para células de Sertoli, la expresión de Clusterin, Vimentina, FAS-L y como marcadores de células germinales el receptor FAS.

Para evaluar la identidad y pureza de nuestro cultivo primario de células de Sertoli, con respecto a una posible contaminación con células germinales, se detecto por inmunoreacción la marcación contra la proteína de citoesqueleto Vimentina, que marcó la mayoría de las células del cultivo (Fig. 6)



Luego para cuantificar el porcentaje de pureza en nuestro cultivo se evaluó la presencia de Clusterin (Clark and Griswold 1997; Davidson, Bell et al. 2007), FAS-L y FAS (Xu, Li et al. 1999), contando el número de células marcadas positivas para cada uno de los anticuerpos estudiados frente a la marcación nuclear con IP, Los resultados mostraron que más del 95% de las células cultivadas fueron Clusterin y FASL positivas, y sólo un pequeño porcentaje, inferior al 5% fueron FAS positivas (Fig. 7A). Por otro lado, estos resultados fueron corroborados por western blot, donde se observó que las células en cultivos no presentaban niveles proteicos para la proteína de células germinales FAS, pero si expresan niveles para proteínas propias de célula de Sertoli (Fig. 7B).

Estos resultados demuestran el alto porcentaje de pureza (+ 95%) del cultivo primario de células de Sertoli usado en nuestro modelo, existiendo solo una insignificante contaminación con otros grupos celulares.



V.1.1.c Estudio de la proliferación de células de Sertoli *in vitro*

La cuantificación de fluorescencia para examinar la proliferación celular por microscopia, es una metodología que podría resultar muy lenta y poco eficiente, es por eso que la reemplazamos por una metodología de medición de fluorescencia por citometría de flujo. Se realizó un ensayo de incorporación de carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) que es un compuesto fluorescente y permeable a la célula. El (CFSE) tiene dos grupos acetatos que se encuentran a los extremos de la molécula, lo que le otorga una alta permeabilidad por las membranas celulares. Sin embargo, una vez en el citoplasma estos

grupos acetatos son removidos por esterasas intracelulares, que le otorga una salida más lenta a través de las membranas, lo que facilita al grupo succinimidyl de esta molécula que pueda reaccionar con grupos aminos intracelulares de forma estable, acumulándose en altas concentraciones a nivel celular (Parish 1999) . Por lo tanto cuando la célula se divide, el compuesto se reparte homogéneamente entre las dos células hijas, por lo que la intensidad de fluorescencia disminuye a la mitad, pudiéndose de esta manera cuantificar la proliferación celular (Yates 2007) (Liu, Yu et al. 2006).

Los resultados mostraron un desplazamiento a la izquierda en el población marcada con CFSE a tiempo cero, a medida que transcurrió el período de cultivo (Fig. 8A, B). Esto se interpretó como una pérdida de fluorescencia asociada a la proliferación celular a lo largo del período de incubación. Lo que indica claramente que las células están proliferando en cultivo, bajo las condiciones establecidas como observa en Fig. 8C.

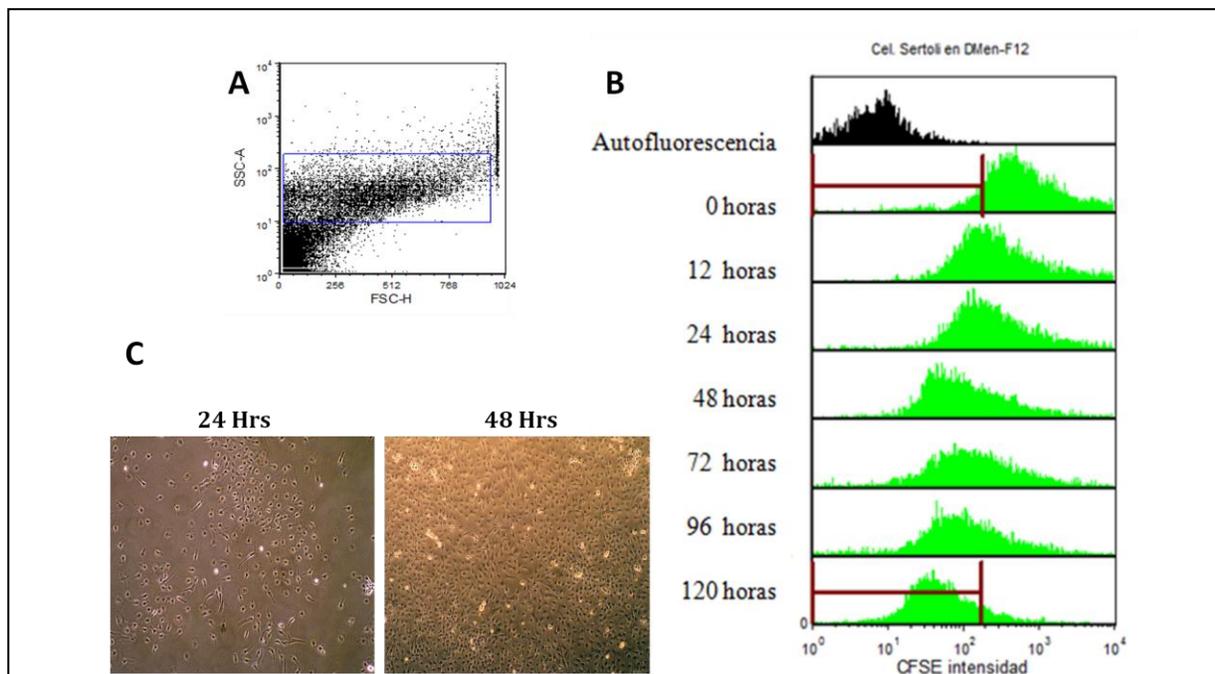


Figura 8: Estudio de la proliferación de células de Sertoli in vitro.

Se estudió en células de Sertoli en cultivo el curso de su proliferación de 0 a 120 horas, por incorporación con CFSE, midiendo la intensidad de fluorescencia por citometría de flujo. A) Población de células de Sertoli cargadas con CFSE y analizadas. B) Curso temporal de intensidad de CFSE, como control se observa el peak de intensidad de fluorescencia a tiempo (0 horas). C) Micrografías de células en cultivo a 24 – 48 hrs.

V.1.1.d. Estudio del ciclo celular de células de Sertoli en cultivo.

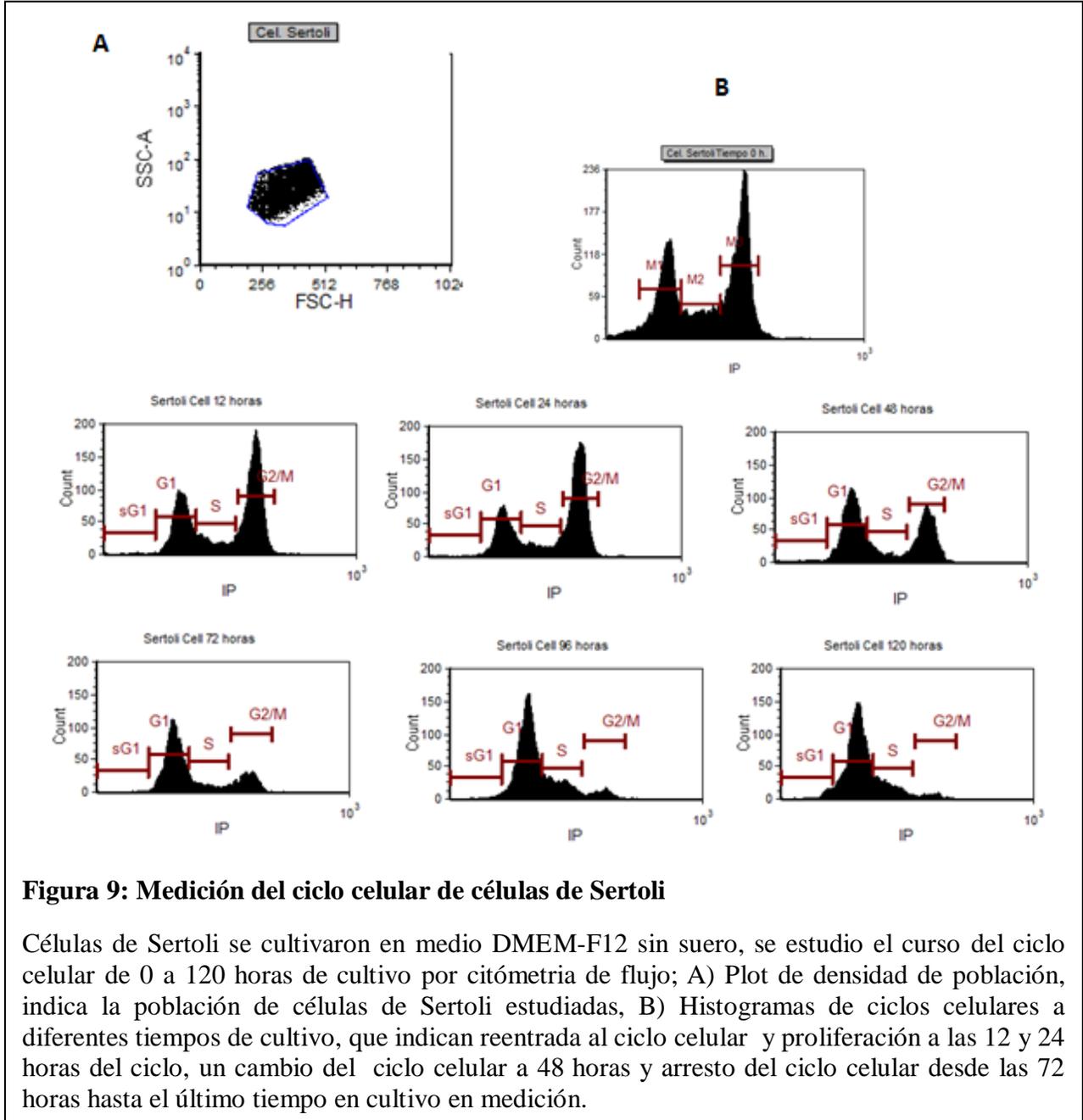
Para validar los resultados obtenidos y confirmar, si las células de Sertoli extraídas de ratas prepúberes podrían proliferar en cultivo, se empleó la citometría de flujo como metodología de elección para el análisis del contenido de DNA, y así definir el grado de proliferación celular (Darzynkiewicz, Halicka et al. 2010)

Cuatro distintas fases pueden ser reconocidas en células en proliferación, G1, S (fase de síntesis de DNA), G2 y fase M (mitosis) (Nunez 2001). En este contexto, se decidió observar los ciclos celulares de nuestro modelo de cultivo primario a distintos tiempos del cultivo.

Es así como se extrajeron células cultivadas en medio DMEM-F12 a diferentes tiempos, fijándose y marcándose con un colorante para ácidos nucleicos (yoduro de propidio, IP), se pudo obtener una serie de histogramas que muestran las distintas fases de ciclo celular en cada tiempo de cultivo desde 0 horas hasta 120 horas. Se observó de 12 a 24 horas de cultivo un aumento en las fases S y G2/M lo que indica una reentrada al ciclo celular y proliferación, a las 48 horas un cambio del ciclo, y desde las 72 horas hasta el último tiempo de medición, un arresto del ciclo celular con aumento en las fases G0/G1 y disminución en las fases S y G2/M, lo que indica cese de proliferación y quiescencia de las células de Sertoli en cultivo (Fig. 9B).

Toda población celular colocada en cultivo es sujeta a algo de muerte. En el modelo de cultivo primario un porcentaje no significativo de células en fase subG1 observadas en el estudio por citometría, son resultados de los procesos de preparación celular y porque las células de tipo germinal, no logran sobrevivir en el ambiente de cultivo diseñado exclusivamente para las células de Sertoli.

Ambos ensayos son concluyentes en referir que las células de Sertoli extraídas y procesadas están proliferando hasta aproximadamente el tercer día del cultivo.



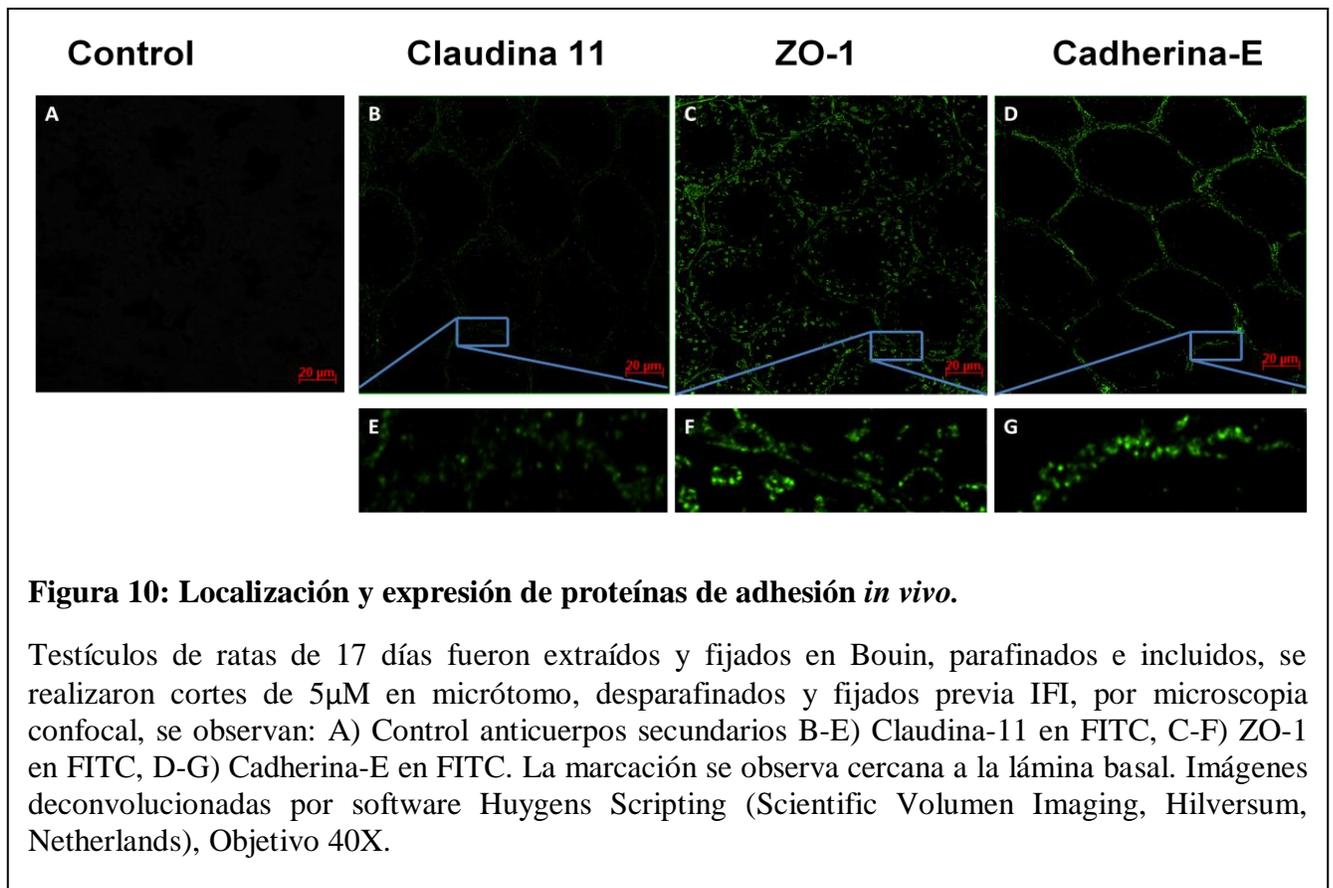
V.1.1.e Localización y expresión de proteínas de adhesión *in vivo*

En primer lugar, decidimos estudiar *in vivo*, la presencia y localización de las moléculas de adhesión elegidas para nuestro estudio, representantes de uniones estrechas (Claudina-11,

ZO-1) y uniones adherentes (E-Cadherina), mediante inmunofluorescencia indirecta por microscopia confocal, se observaron cortes de 5 μm , de túbulo seminíferos de ratas de 17 días prepúberes, fijados en Bouin, y desparafinados.

En los resultados se observa a la proteína ZO-1, repartida alrededor de la lámina basal entre los lugares de contacto de Sertoli - Sertoli y Sertoli - germinales. La presencia de Claudina-11 se observó de manera más difusa entre los lugares de contacto célula-célula, cercanos a la lámina basal, siendo este el sitio de unión de células de Sertoli adyacentes y el lugar de formación de la barrera hematotesticular.

De igual forma se evaluó la expresión de Cadherina-E, que se observó en los lugares de contacto de células de Sertoli adyacentes (Fig. 10). Lo que confirmó que *in vivo* en ratas de 17 días de edad, se está restableciendo un contacto íntimo entre células de Sertoli y se expresan proteínas constitutivas para formar la barrera hematotesticular.

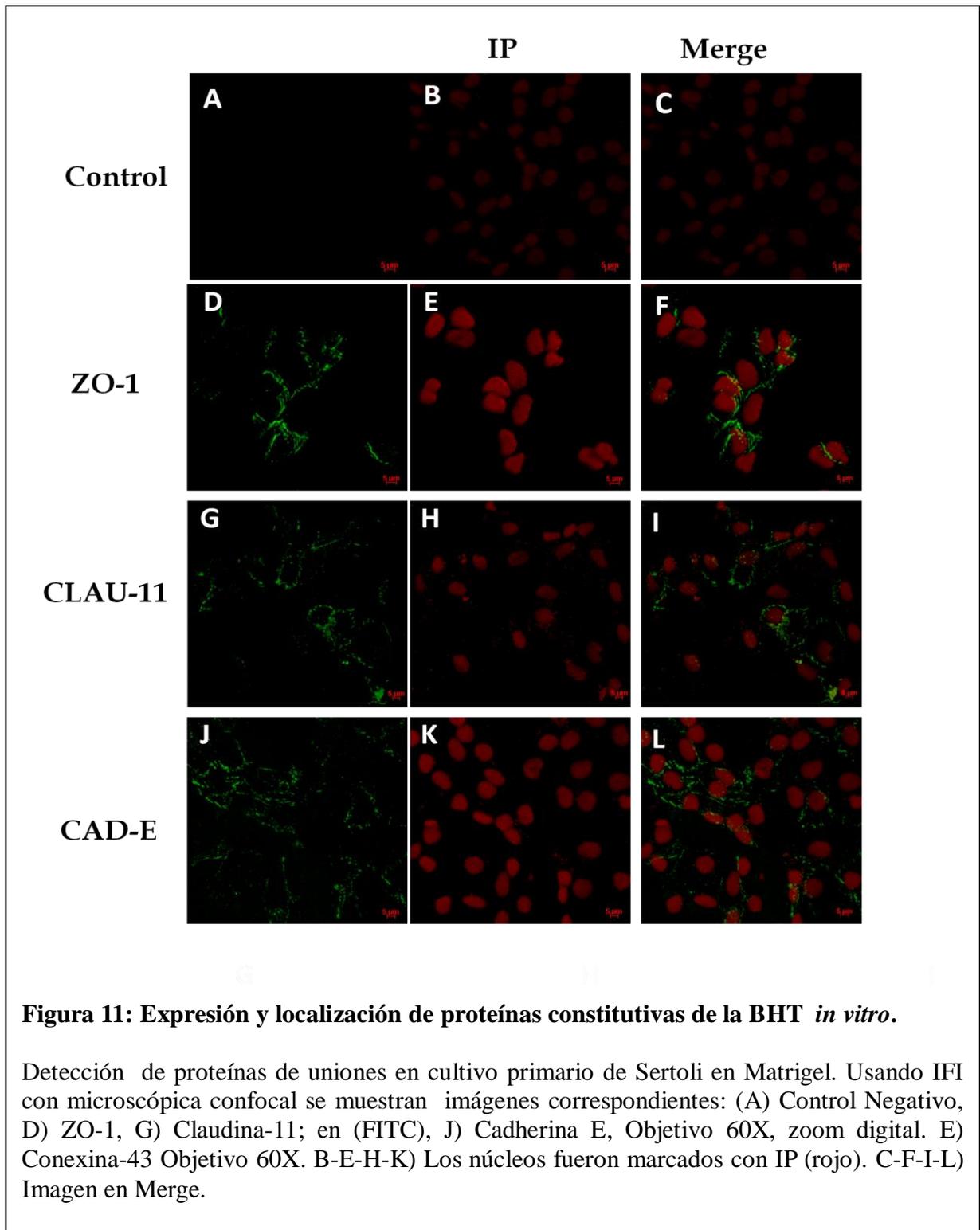


V.1.1.f Localización y expresión de proteínas constitutivas de la BHT *in vitro*.

Para responder la pregunta, si es factible diseñar un modelo *in vitro* de la barrera hematotesticular, es prioritario que las principales proteínas formadoras de ese sistema se expresen y localicen en los sitios de unión célula a célula. Se investigó si células de Sertoli extraídas y cultivadas sobre Matrigel 2.5 ng/ml en DMEM-F12 por 4 días, podrían expresar las proteínas constitutivas de TJ de la barrera hematotesticular, Claudina-11, y *Zona Occludens 1* (ZO-1); proteínas AJ, Cadherina-E.

Los resultados permitieron observar inmunoreacción (Fig. 11), tanto para Claudina-11, ZO-1, y Cadherina-E, cuando las células están estableciendo contactos por confluencia y que estas proteínas se localizan en los sitios de contacto célula - célula. Sólo para la proteína TJ, Claudina-11 se pudo visualizar que se define en los contornos de la célula, exclusivamente cuando hay un mayor porcentaje de confluencia en el cultivo celular, si la confluencia es menor la proteína se observa a nivel del citoplasma.

Estos ensayos confirman que en nuestro modelo *in vitro*, las células de Sertoli en cultivo, esta equipadas con la maquinaria necesaria para ensamblar iguales complejos de adhesión celular de uniones delgadas – adherentes y de comunicación como *in vivo*.



V.1.1.g Medición del grado de co-localización de Uniones Estrechas frente a Uniones adherentes en cultivo de células de Sertoli

Clásicamente se sabe que las proteínas de adhesión celular de la BHT, co-localizan *in vivo* (Siu and Cheng 2004). Para determinar el grado de colocalización de proteínas constitutivas de BHT, se fijaron cultivos de célula de Sertoli que tenían 5 días de plaqueo y se realizó IFI para dos proteínas, para localizar a cada uno de ellos en canales distintos. (fig. 12)

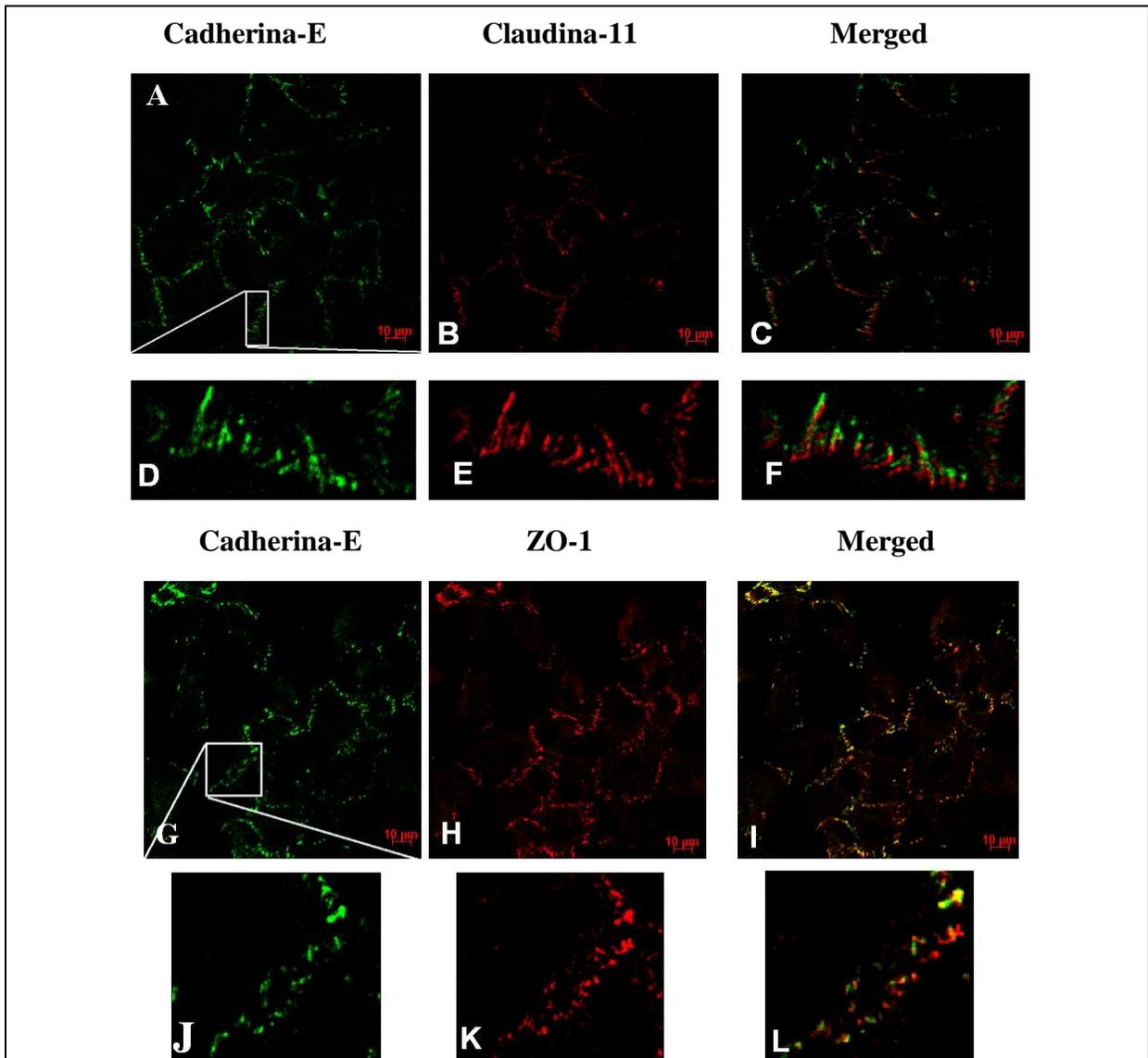


Figura 12: Co-localización de proteínas de uniones en cultivos primarios de Sertoli en Matrigel

Inmunofluorescencia por microscopia confocal muestra co-localización de complejos de unión célula-célula (A-D, G-J) E-Cadherina en (FITC), (B-E) Claudina-11 en (rodamina), (H-K) ZO-1 en (rodamina), (C-F, I-L) imagen en merged. Micrografías (D-E-F), (J-K-L) corresponden a zoom digital, de la R.O.I señalada en recuadro.

La superposición de imágenes reveló de forma visual una alta colocación pero no cuantifica la localización entre Claudina-11 con cadherina-E o ZO-1 con cadherina-E.

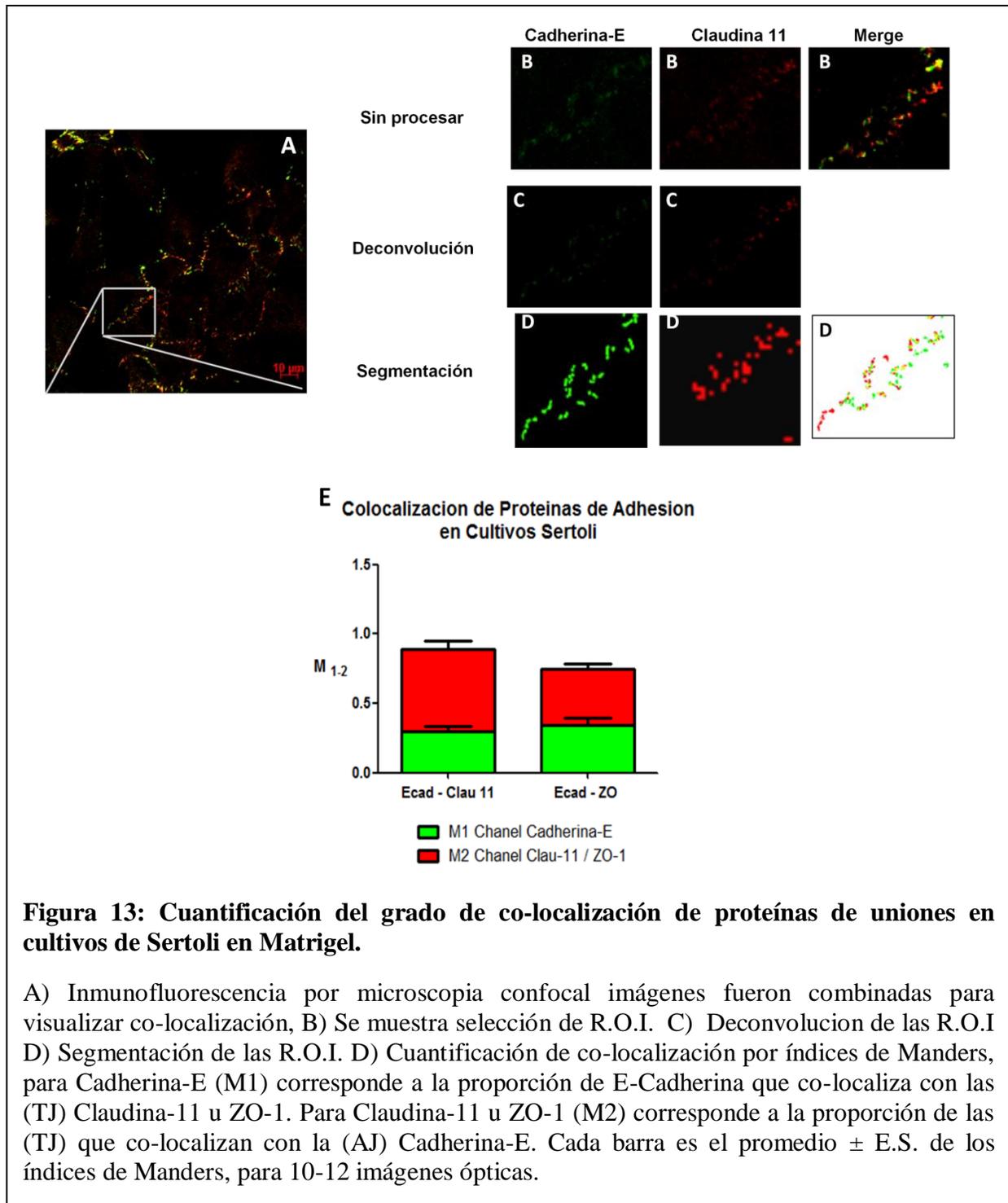
Mediante inmunofluorescencia indirecta por microscopia confocal, se tomaron grupos de imágenes de 0.5 μm de células de Sertoli cultivadas *in vitro* por 5 días, midiendo en dos canales la co-localización que podría haber entre Cadherina-E conjugado en FITC frente Claudina-11 o ZO-1 con un anticuerpo secundario conjugado a rodamina. Previa cuantificación, las imágenes tuvieron que ser deconvolucionadas, y también se realizó una confiable segmentación de R.O.I, de las imágenes obtenidas, aplicando un gradiente de filtros y seleccionando diferentes valores umbrales en histogramas, obteniendo una definición de los bordes de marca para los anticuerpos a estudiar.

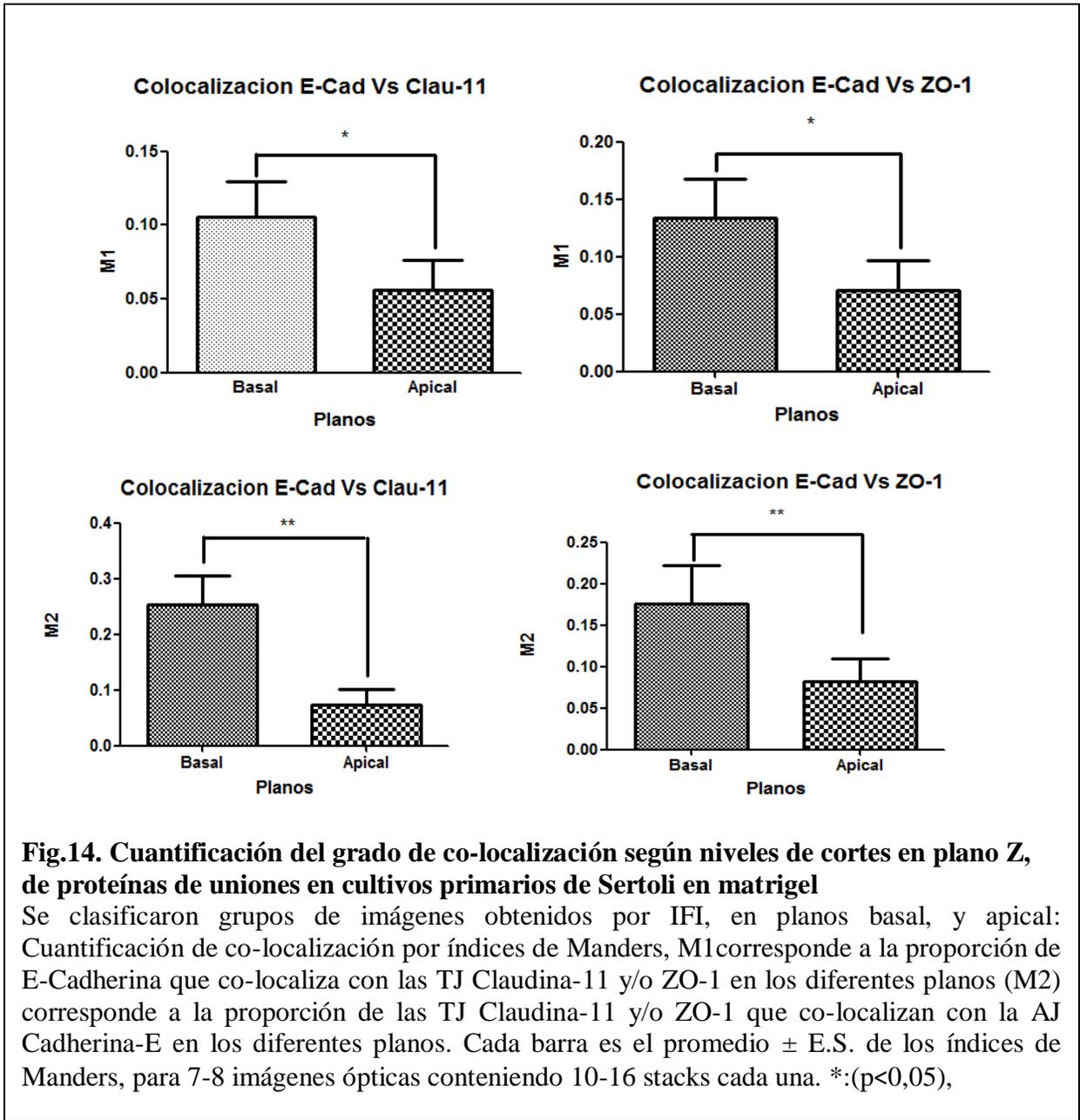
El análisis de los coeficientes de Manders indica que, para las proteínas TJ: + 88% de Claudina-11 y + 75% de ZO-1, que se encuentran en regiones de contacto célula – célula, co-localiza en el mismo compartimiento celular ocupado por la proteína AJ: Cadherina-E, mientras que solo alrededor del 30 – 35% de Cadherina-E co-localiza en los mismos compartimientos celulares que ocupan las proteínas Claudina-11 y ZO-1 respectivamente (Fig. 13).

Para determinar a qué nivel existía mayor ensamble y más cercana co-localización de nuestras proteínas de adhesión se realizó una cuantificación de la co-localización empleando los coeficientes de Manders, a secuencias de imágenes en planos (Z), adquiridas por IFI en canales duales por microscopia confocal, de células de Sertoli en cultivos, deconvolucionadas y segmentadas.

Los planos Z obtenidos en cada una de las imágenes se clasificaron en 2 grupos: Planos basales y planos apicales y se midieron los índices de Manders en cada uno de estos grupos. Los resultados mostraron que la co-localización de las proteínas Cadherina-E frente a las proteínas TJ es mayor (cuantificado por el índice M1), en las imágenes que agrupan a los planos basales. Mientras que la co-localización de Claudina-11 y ZO-1 frente a la proteína Cadherina-E (cuantificada por el índice M2), es significativamente mayor en el grupo de grupos de imágenes que agrupa los planos basales (Fig. 14). Pudiendo referir que estas proteínas se ubican y co-localizan en mayor porcentaje, en zonas basales del cultivo celular.

Este resultado demuestra que en las regiones de contacto-célula-célula de los cultivos de células de Sertoli se establecen uniones de tipos adherentes y delgadas que co-localizan en regiones basales.





V.1.2 DETERMINAR SI LA ADICION DE FSH Y TESTOSTERONA AUMENTA LA PROLIFERACION DE CELULAS DE SERTOLI EN CULTIVO.

V.1.2.a Estudiar la viabilidad de células de Sertoli en cultivo, y determinar si cambia frente a tratamientos con FSH y androstenadiona.

Las células de Sertoli aisladas según protocolo; se cultivaron, y se determinó primero la viabilidad celular por ensayos de incorporación con azul de tripán, calculando el porcentaje de células vivas. Al mismo tiempo, a las 24 horas de cultivo, las células de Sertoli extraídas se trataron bajo tres condiciones, medio con DMEM-F12 incompleto y medio DMEM-F12 suplementado con FSH a dosis variables y dos concentraciones de 4 Androstene-3,17diona (variable de testosterona), tal ensayo también lo usamos para definir en el cultivo dosis-respuesta de las células al tratamiento con FSH y 4 Androstene-3,17diona.

Los resultados mostraron que la viabilidad de células en cultivo incrementa en el tiempo, en las células cultivadas bajo las condiciones establecidas. Por otro lado, cuando las células de Sertoli se cultivaron con 2.5 μM de FSH más 2.5 o 25 μM de 4 Androstene-3,17diona, hubo un aumento significativo de la viabilidad a las 24 hrs (Fig.15)

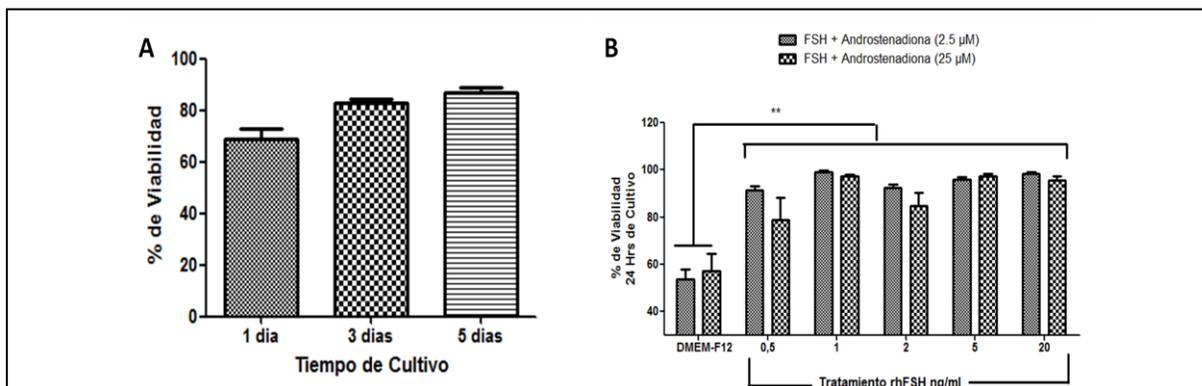


Figura 15: Estudio de la viabilidad celular de células de Sertoli en cultivo.

Células de Sertoli extraídas de ratas de 17 días se cultivaron en medio DMEM-F12 y se midió la viabilidad celular por ensayos con azul de Tripán. A) Las células de Sertoli extraídas mantienen su viabilidad bajo las condiciones establecidas, B) Células tratadas por 24 horas con concentraciones crecientes de FSH y dos diferentes concentraciones de 2-4 Androstenadiona presentan un aumento significativo de la viabilidad celular. Cada barra es el promedio \pm E.S. n=3; (p<0,001)

V.1.2.b. Evaluar cambios en la proliferación de células de Sertoli en cultivo bajo estimulación con hormona FSH.

La información obtenida utilizando marcadores ofrece un valioso poder para entender una función básica de las células en cultivo (la proliferación) y cómo esta función podría ser optimizada o modulada por una señal externa (Hyrien, Chen et al. 2010).

Para evaluar la proliferación celular se midió la intensidad media de fluorescencia en células incubadas con CFSE, con o sin tratamiento con 5 ng/ml de FSH. La intensidad de fluorescencia media (el área bajo la curva) se obtuvo por citometría de flujo. Los resultados mostraron que el curso temporal de pérdida de fluorescencia es similar entre el control y las células tratadas con FSH, salvo a las 12 hrs de incubación en que, en las células con FSH se observó un número significativamente mayor con respecto al control (Fig. 16).

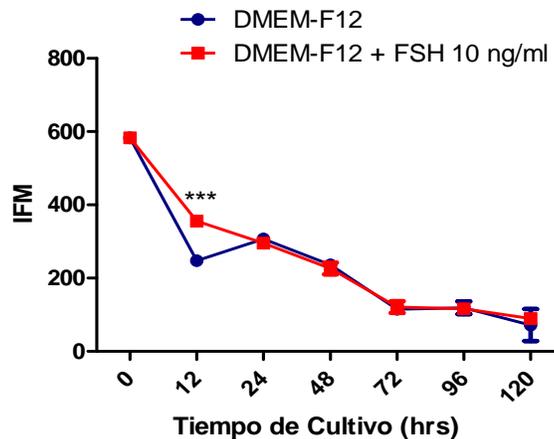


Figura 16: Evaluación de la proliferación de células de Sertoli bajo estimulación con hormona FSH.

Células de Sertoli se cultivaron en medio DMEM-F12 sin suero y medio suplementado con FSH 10 ng/ml, se estudió el curso de su proliferación de 0 a 120 horas de cultivo por incorporación con CFSE, midiendo la intensidad de fluorescencia por citometría de flujo. Plot de intensidad de fluorescencia de CFSE de control células en DMEM-F12 Vs células tratadas con FSH, relativo al tiempo de cultivo. Cada punto corresponde al promedio \pm E.S. (n=3). *(p<0,001)

V.1.2.c Determinar si existen diferencias que indiquen cambios en la proliferación, sobre las fases del ciclo celular, por la adición de hormonas y suplementos en células de Sertoli en cultivo.

Ensayos *in vivo* han demostrado que la estimulación por FSH controla (Orth, Higginbotham et al. 1984) e incrementa la proliferación de las células de Sertoli en ratas neonatales y prepúberes (Meachem, McLachlan et al. 1996). Por ello se quiso verificar si la adición de otros mediadores hormonales aparte de FSH, como testosterona, o insulina, al igual que suplementos antioxidantes, como ácido L-ascórbico, en las concentraciones antes descritas en materiales y métodos; podrían inducir un incremento en la proliferación, midiendo los cambios a nivel del ciclo celular

Se realizó un análisis del ciclo celular por citometría de flujo, de células de Sertoli cultivadas durante 96 horas tratadas con combinaciones de hormonas y/o suplementos. La distribución de las células en varias fases de sus ciclos celulares fue calculada midiendo el contenido del DNA marcado con IP. Para el análisis, se calculó el porcentaje de células en las respectivas fases del ciclo celular en cada uno de los tratamientos, respecto del control en medio basal; y se cuantificaron las diferencias encontradas, expresándolas en porcentaje. Los resultados mostraron (Fig.17) una disminución en las fases G0/G1 y de forma significativa en la fase S y aumentos significativos en la fase G2/M que se ven mayormente potenciado con la combinación de FSH - Testosterona y suplementos, lo que indica claramente que mientras con medio DMEM-F12 las células cesan su proliferación a las 96 horas, la adición de hormonas y suplementos indicados, permiten que las células continúen proliferando en cultivo.

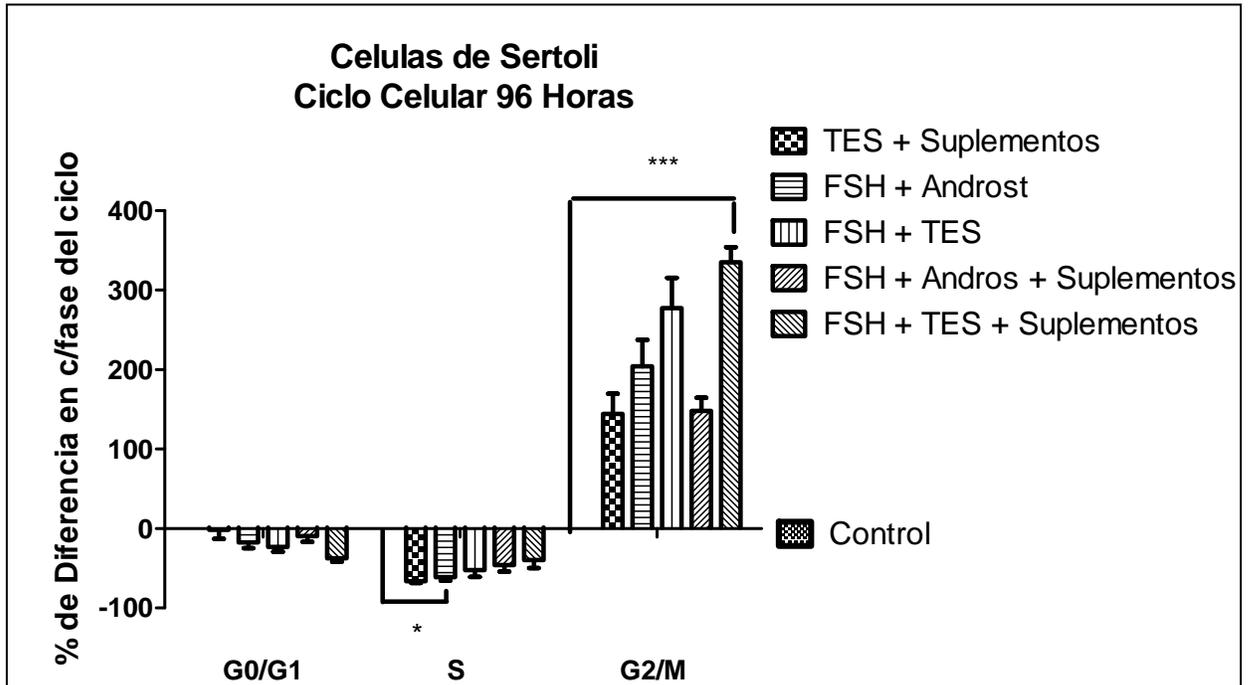


Figura 17: Evaluación de la adición de hormonas y suplementos sobre el ciclo celular.

Células de Sertoli se cultivaron por 96 horas bajo diferentes adiciones de hormonas y suplementos al medio DMEM-F12 y marcando con (IP), se realizó un análisis de fraccionamiento del ciclo celular por citometría de flujo, se pueden observar, disminución en las fases (G0/G1) y (S) y aumentos significativos en la fase G2/M que se ven mayormente potenciado con la combinación de FSH - testosterona y suplementos. Ciclo celular de células en DMEM-F12 tomadas como control, se observa a nivel (0) del eje de las X. Cada barra corresponde al promedio \pm E.S. (n=3), * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

Reuniendo estos datos, nuestros resultados demuestran que células de Sertoli de ratas de 17 días cultivadas bajo las condiciones establecidas, retoman el ciclo celular *in vitro* y proliferan, y además esta proliferación es potenciada por FSH y testosterona.

V.2.1. DETERMINAR SI LA EXPRESION Y LOCALIZACION DE PROTEINAS DE ADHESION CELULAR CAMBIA FRENTE A TRATAMIENTOS CON BISFENOL A, FSH Y TESTOSTERONA *IN VITRO*.

V.2.1a Determinar si BPA altera al expresión y localización de proteínas de adhesión celular formadoras de BHT, *in vitro*

Para empezar a diseñar nuestros experimentos al ser probadas concentraciones de BPA 50 - 100 μM (Li, Mruk et al. 2009), este compuesto indujo la muerte de las células en cultivo, por tal motivo fue necesario realizar una curva dosis-respuesta. Es así como las células de Sertoli se cultivaron por 5 días (tiempo requerido para visualizar una confluencia significativa) en medio DMEM-F12 y al sexto día se adiciono al medio concentraciones variables de BPA entre 0,1 a 10 μM , evaluando los cambios que produjeron en los niveles proteicos de la proteína adaptadora ZO-1, como control del vehículo del BPA, las células se trataron con etanol diluido en PBS al mismo volumen del BPA.

Los resultados mostraron que las células de Sertoli presentaron una disminución significativa de los niveles proteicos de ZO-1 a dosis bajas de BPA (0,5 – 1 μM) y a las dosis más alta empleada (10 μM), pero a dosis medias de BPA 5 μM , se observó aumento de niveles de proteína, cercanos al vehículo que no ocasionaron una pérdida total de la adhesión celular (Fig. 18).

Estos resultados permiten proponer que en células de Sertoli de ratas de 17 días, cultivadas bajo condiciones establecidas, la adición de BPA al medio de cultivo altera los niveles de proteínas ZO-1.

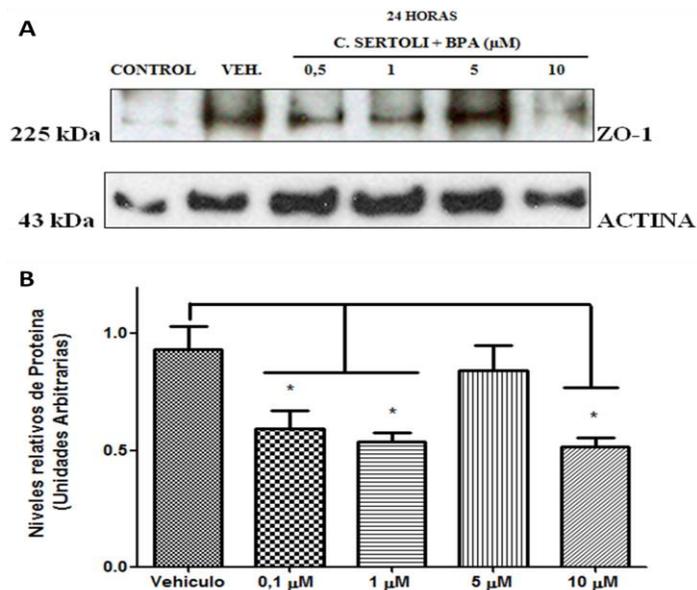


Figura 18: Bisfenol A altera los niveles proteicos de ZO-1 de células de Sertoli en cultivo.

Células de Sertoli, se trataron durante 24 horas a distintas concentraciones de BPA utilizando como control células en DMEM-F12 y como control-vehículo la adición de etanol 70%, A) Western Blot, B) Desintometría compara niveles proteicos de ZO-1 de células de Sertoli tratadas con vehículo frente a las tratadas con concentraciones crecientes de BPA. Cada barra corresponde al promedio \pm E.S (n=3), * $p < 0,05$

A partir de estos resultados se eligió, la concentración de 5 μ M de BPA, para tratar a las células de Sertoli en cultivo y posteriormente evaluar el efecto de este xenoestrogeno, sobre los niveles proteicos de Claudina-11, ZO-1 (TJ) y E-Cadherina (AJ), proteínas constitutivas de la BHT por Western Blot.

Los resultados mostraron que BPA produjo una disminución significativa en los niveles proteicos de Claudina-11 y un aumento significativo en los niveles de Cadherina-E. Sin embargo, no se observaron cambios estadísticamente significativos en los niveles de ZO-1 (Fig. 19) Estos resultados sugieren que *in vitro*, BPA podría inducir pérdida de las uniones estrechas al decrecer la expresión de Claudina-11.

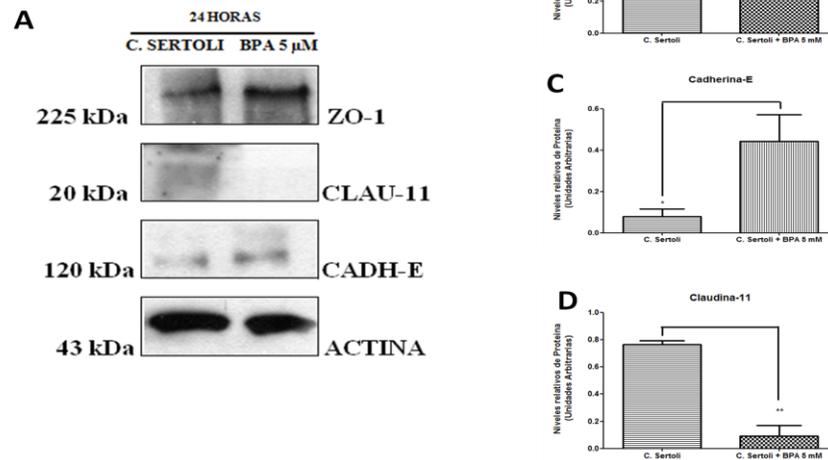


Figura 19: Bisphenol A (BPA) altera la expresión de uniones celulares formadoras de BHT, *in Vitro*.

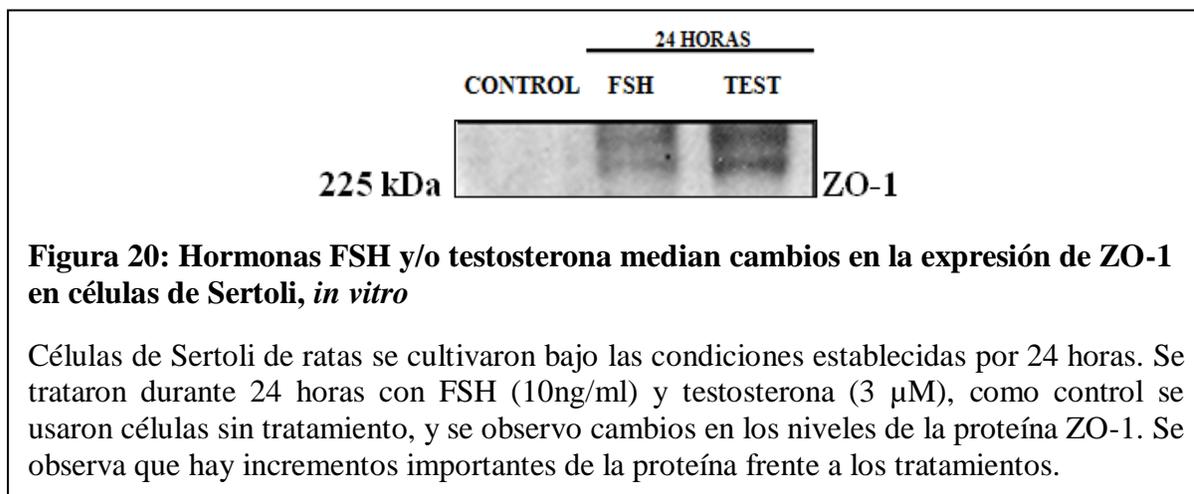
A) Niveles proteicos de proteínas de adhesión de células de Sertoli *in vitro* son afectadas por (BPA) 5 μM. B) desintometria para ZO-1. C) desintometria para Cadherina-E. D) desintometria de Claudina-11, utilizando β-Actina como control de carga. Control son células sin tratamiento. Cada barra corresponde al promedio ± E.S (n=3), * p< 0,05; ** p< 0,001.

En resumen, estos resultados muestran un cambio en los niveles de las proteínas de adhesión estudiadas en células de Sertoli.

V.2.3.b. Determinar si hormonas FSH y/o testosterona median cambios en expresión de uniones celulares de células de Sertoli, *in vitro*.

Las Células de Sertoli es la única célula del testículo que posee receptores tanto para FSH como para andrógenos, por ello *in vitro* deberían responder a estas hormonas y podrían modular sus adhesiones celulares tal como sucede *in vivo*. Para esto, las células de Sertoli en cultivo se incubaron con FSH a 10 ng/ml y testosterona a 3 μM, las dosis de estas hormonas empleadas se aproximan a sus concentraciones basales en la rata.

Los resultados mostraron que en células de 1 día de cultivo, luego de 24 hrs de tratamiento los niveles de ZO-1 principal proteína adaptadora de TJ y AJ aumentaron en relación a las células no tratadas (Fig.20)



Observando que las células de Sertoli en nuestro cultivo responden tanto a BPA como a hormonas. Para validar estos resultados observados, se sometieron las células de Sertoli extraídas y cultivadas por 5 días, a similares tratamiento ósea exposición con 5 μ M de BPA por 24 horas y con combinación de FSH 10 ng/ml + testosterona 3 μ M, para comparar los cambios producidos a nivel de la inmunoreacción y localización de las proteínas de adhesión de uniones estrechas, estudiadas en nuestro modelo. Por inmunofluorescencia indirecta con microscopia confocal se adquirieron imágenes, como control se utilizo células tratadas con etanol diluido en PBS en el mismo volumen del compuesto BPA (vehículo).

Así se pudo realizar ensayos utilizando anticuerpos con FITC para nuestras TJ estudiadas. ZO-1 y Claudina-11 y marcando los núcleos celulares con IP como se describió en secciones anteriores. Los resultados demuestran que tratamientos con BPA a concentraciones de 5 μ M provocan disminución de la localización de esta proteína a nivel de membrana. Mientras que tratamientos con combinación FSH + testosterona provocan incrementos en la expresión de estas proteínas y de su localización a nivel de membrana (Fig. 21-22).

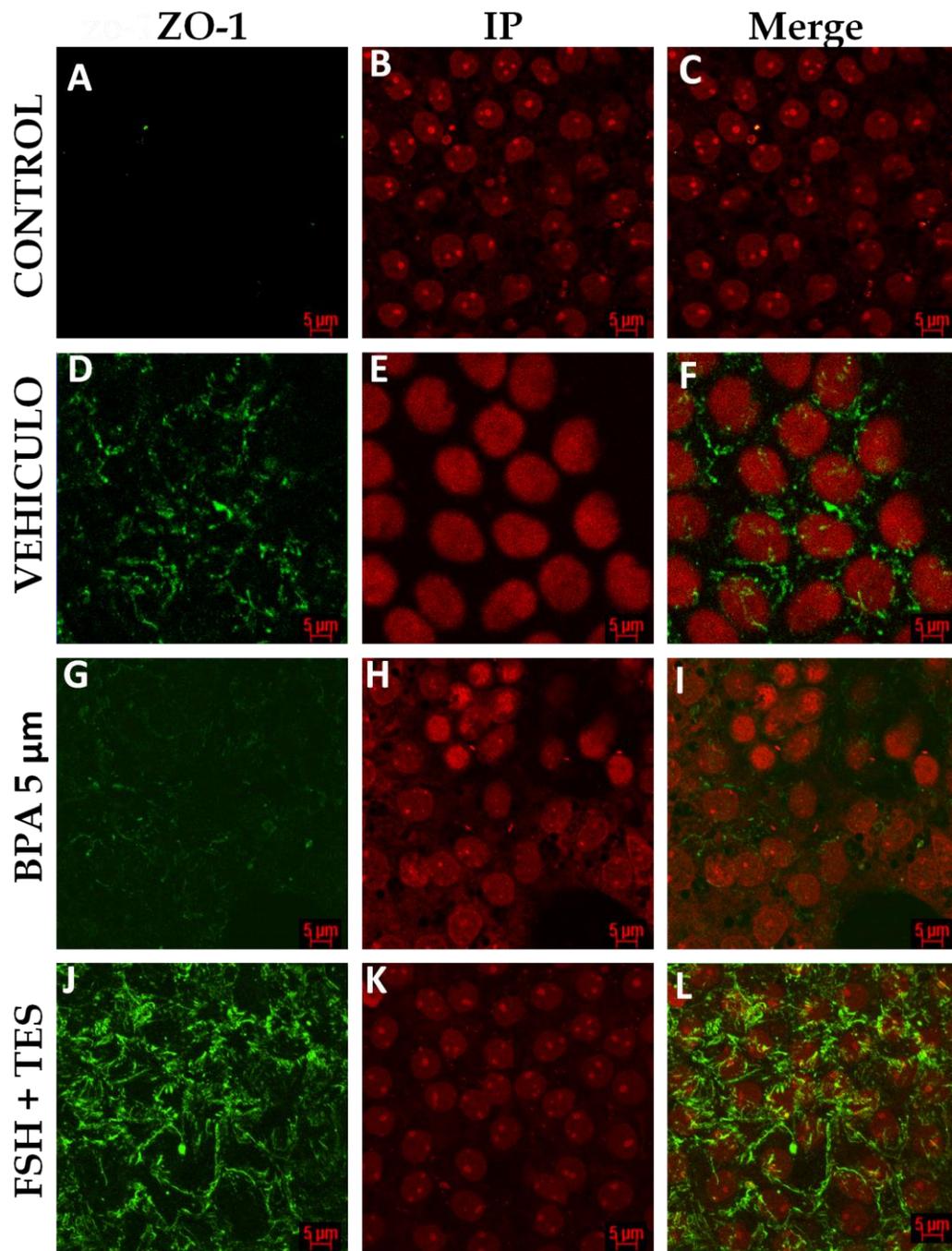


Figura 21: Tratamientos con BPA y hormonas modulan la expresión y localización de ZO-1 en células de Sertoli en cultivo.

Células de Sertoli tratadas con 5 μM de BPA y combinación de hormonas FSH 10 ng/ml y testosterona 3 μM, (A) Control negativo sin anticuerpo D) corresponde a ZO-1 con FITC en células sin tratamientos D) expresión de ZO-1 con FITC de células tratadas con BPA (J) expresión de ZO-1 con FITC de células tratadas con combinación de FSH – testosterona, micrografías (B-E-H-K) tinción nuclear con IP, micrografías (C-F-I-L) imagen en Merge.

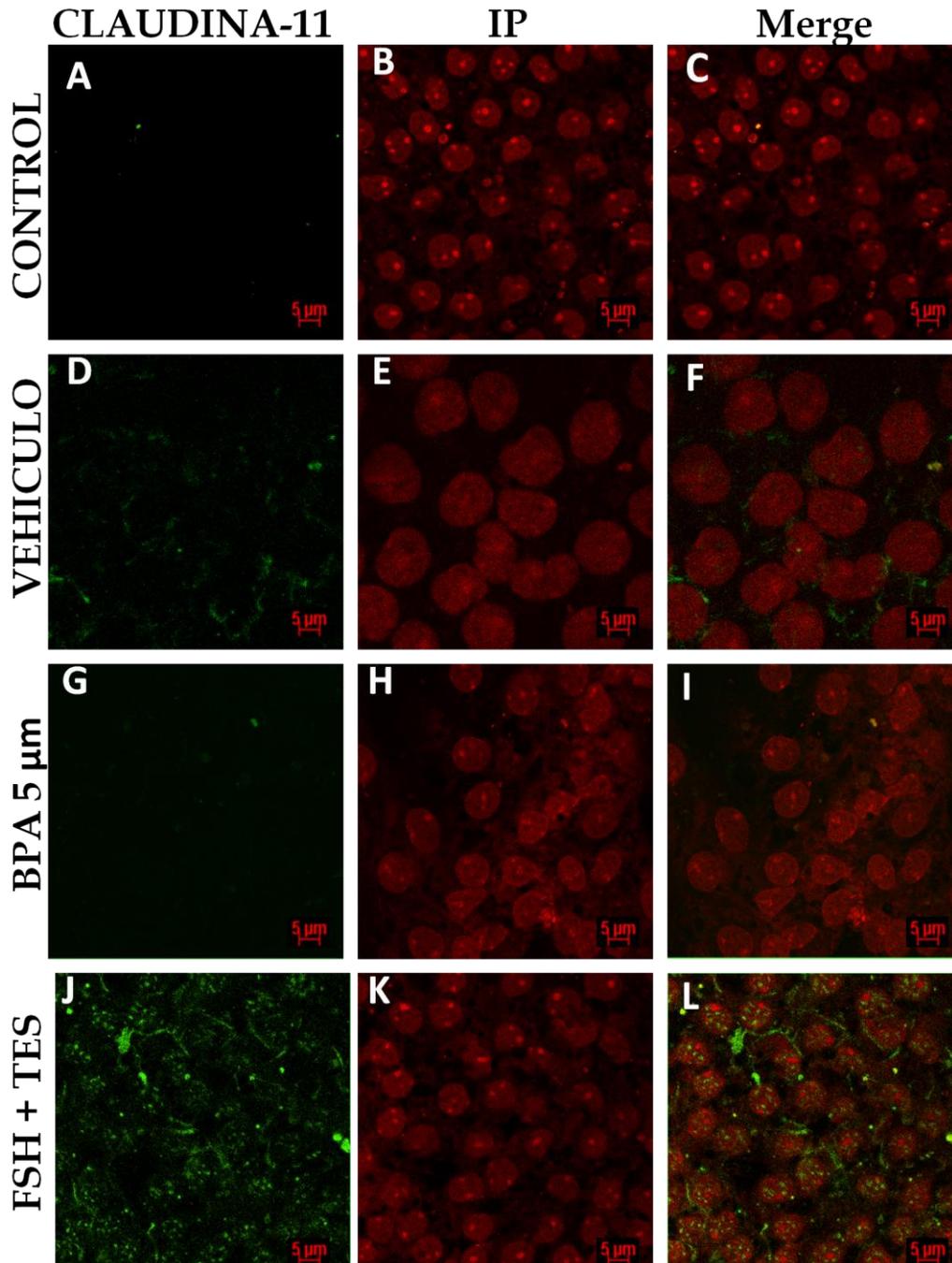


Figura 22: Tratamientos con BPA y hormonas modulan la expresión y localización de Claudina-11 en células de Sertoli en cultivo.

Células de Sertoli tratadas con 5 μM de BPA y combinación de hormonas FSH 10 ng/ml y testosterona 3 μM , (A) Control negativo (D) corresponde a Claudina-11 con FITC en células sin tratamientos (D) expresión de Claudina-11 con FITC de células tratadas con BPA (J) expresión de Claudina-11 con FITC de células tratadas con combinación de FSH, testosterona, (B-E-H-K) tinción nuclear con IP, micrografías (C-F-I-L) imagen en Merge.

V.1.4 EVALUAR LA EXPRESION Y LOCALIZACIÓN DE ADAM 10 Y ADAM 17 EN CELULAS DE SERTOLI *IN VITRO*.

Se han estado llevando a cabo investigaciones sobre un grupo específico de proteínas, las metaloproteasas de la familia ADAMs y su papel fisiológico en los fenómenos de reproducción, aunque es muy poco lo que se conoce sobre sus función a nivel testicular, salvo que intervienen en la apoptosis de células germinales (Lizama, Rojas-Benitez et al. 2010; Lizama, Rojas-Benitez et al. 2011). Trabajos anteriores han demostrado que dos metaloproteasas de esta familia, ADAM10 y ADAM17, median la apoptosis de células germinales inducida por xenoestrogenos (datos no publicados).

Dados estos antecedentes se determinó estudiar la expresión y localización de ADAM10 y 17 en células de Sertoli en cultivo, y evaluar si estas metaloproteasas son moduladas por tratamientos con activadores de proteínas kinasas, hormonas y xenoestrogenos.

V.1.4.a. Determinar si ADAM10 Y ADAM 17 se expresan en células de Sertoli *in vitro* y si esta expresión cambia por tratamientos con PMA y Bisfenol A.

Células de Sertoli extraídas según nuestro protocolo se cultivaron por 5 días en medio DMEM-F12, y se determino primero la expresión de ADAM17 y ADAM10, por inmunoreacción observada con microscopia confocal.

Los resultados demostraron que las células de Sertoli expresan ADAM10 y que la proteína se localiza en el citoplasma, alrededor de toda la célula (Fig. 23 D, F), mientras que hay existe una difusa expresión de ADAM17 del mismo modo a nivel del citoplasma de células de Sertoli en cultivo (Fig. 23 G, I).

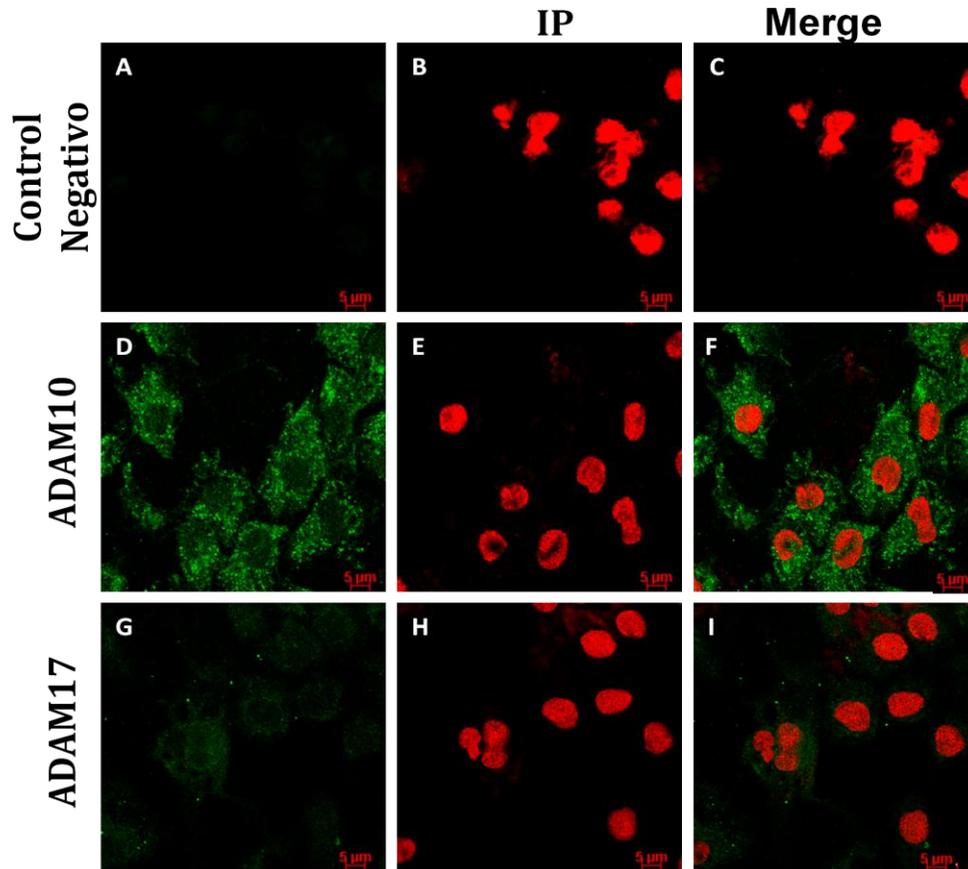


Figura 23: Detección de ADAM10 y ADAM17 en células de Sertoli en cultivo.

Inmunofluorescencia por microscopia confocal para células de Sertoli, se observa A) Control negativo, D) expresión de ADAM10, G) expresión de ADAM 17. Micrografías (B-E-H) tinción nuclear con IP, micrografías (C-F-I) imagen en Merge.

No se ha demostrado si metaloproteasas de la familia ADAMs, son directamente reguladas por proteínas kinasas, pero reportes previos han sugerido que, la activación de la proteína kinasa C (PKC) podría causar alteraciones en la localización subcelular de las proteínas de la familia ADAMs (Sundberg 2004). Y del mismo modo se desconoce si xenoestrogenos tengan efectos sobre la expresión de estas proteínas.

Por ello además de la expresión de ADAM10 en células de Sertoli en cultivo, se estudio el efecto de forbol-metil-acetato (PMA), compuesto análogo a diacilglicerol que se ha demostrado en tratamientos a periodos cortos, induce la activación de PKC en cultivos primarios (Reneau, Reyland et al. 2009).

Se trataron a las células de Sertoli cultivadas por 4 días, con PMA (200 ng/ml) por 2 y 4 horas y se midieron los niveles proteicos y la expresión de la proteína por inmunoreacción observada con microscopia confocal. Para estudiar el efecto de los xenoestrogenos sobre la expresión de ADAM10 se trataron células de Sertoli con BPA 5 μ M por 24 horas y se evaluó por inmunomarcación utilizando microscopia confocal

Los resultados demostraron que hay un aumento significativo de los niveles proteicos de ADAM10 en tratamientos con PMA a las 4 horas (Fig.24 B), este resultado se revalida por la Inmunomarcacion que presentan las células en cultivo tratadas con PMA durante el mismo intervalo (Fig.24 F - H) frente a células sin tratamiento.

También pudimos observar por inmunomarcación que la expresión de ADAM10 se ve aumentada por tratamientos con BPA 5 μ M (Fig.24 I-K)

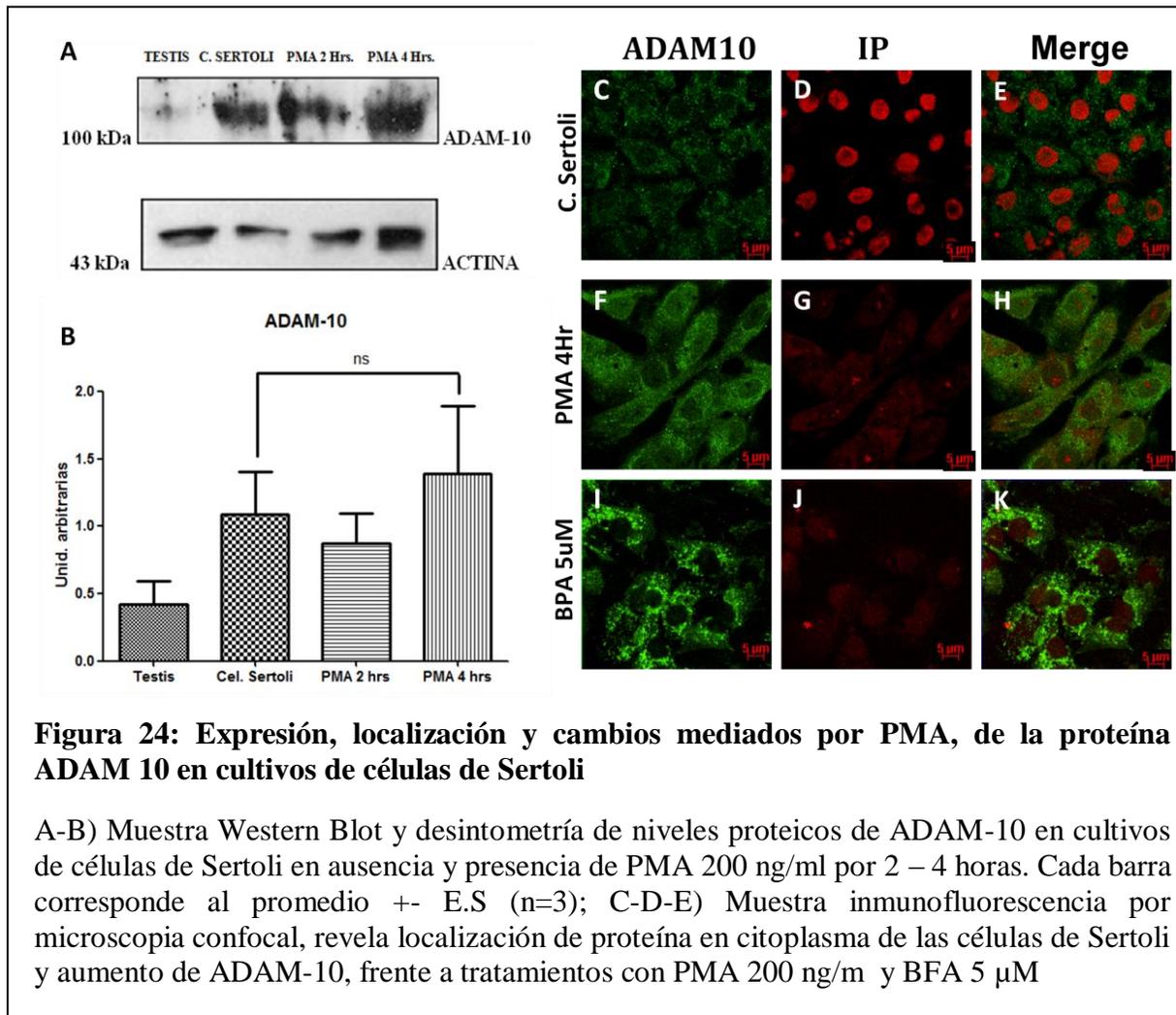


Figura 24: Expresión, localización y cambios mediados por PMA, de la proteína ADAM 10 en cultivos de células de Sertoli

A-B) Muestra Western Blot y desintometría de niveles proteicos de ADAM-10 en cultivos de células de Sertoli en ausencia y presencia de PMA 200 ng/ml por 2 – 4 horas. Cada barra corresponde al promedio \pm E.S (n=3); C-D-E) Muestra inmunofluorescencia por microscopia confocal, revela localización de proteína en citoplasma de las células de Sertoli y aumento de ADAM-10, frente a tratamientos con PMA 200 ng/m y BFA 5 μ M

V.1.5. DETERMINAR SI LA EXPRESION Y LOCALIZACIÓN DE ADAM10 CAMBIA FRENTE A TRATAMIENTOS CON FSH Y TESTOSTERONA.

Teniendo como antecedente, que ADAM10 se está expresando en células de Sertoli *in Vitro*, y que puede estar modulado por activadores de PKC, se decidió evaluar si la localización celular de esta metaloproteasa puede ser modulada también por tratamientos con hormonas. Para ello, células de Sertoli de ratas prepúberes, extraídas y cultivadas por 4 días, se trataron por 24 y 48 horas, con FSH 10 ng/ml, con testosterona 3 μ M y por combinación de FSH 10 ng/ml + testosterona 3 μ M, en distintos pocillos, para comparar los cambios producidos a nivel de la inmunoreacción y localización de ADAM10, evaluándolo por western blot y microscopía confocal,

Los resultados mostraron que en células de Sertoli *in vitro* los niveles proteicos de ADAM10 se ven aumentados frente a tratamientos principalmente con testosterona (Fig. 25 A-B), así como su inmunoreacción y localización subcelular (Fig. 25 I-K). Se observa además que en células tratadas con Testosterona, esta hormona está induciendo que ADAM10 se transloque a regiones de membrana, como indica (fig.25 K). Pudiendo sugerir que la regulación de esta proteína es por vía endocrina.

Todos estos resultados demuestran que existe expresión de ADAM 10 en células de Sertoli *in Vitro*, y que su expresión y localización subcelular cambia frente a tratamientos con hormonas FSH, Testosterona y tóxicos como Bisfenol A.

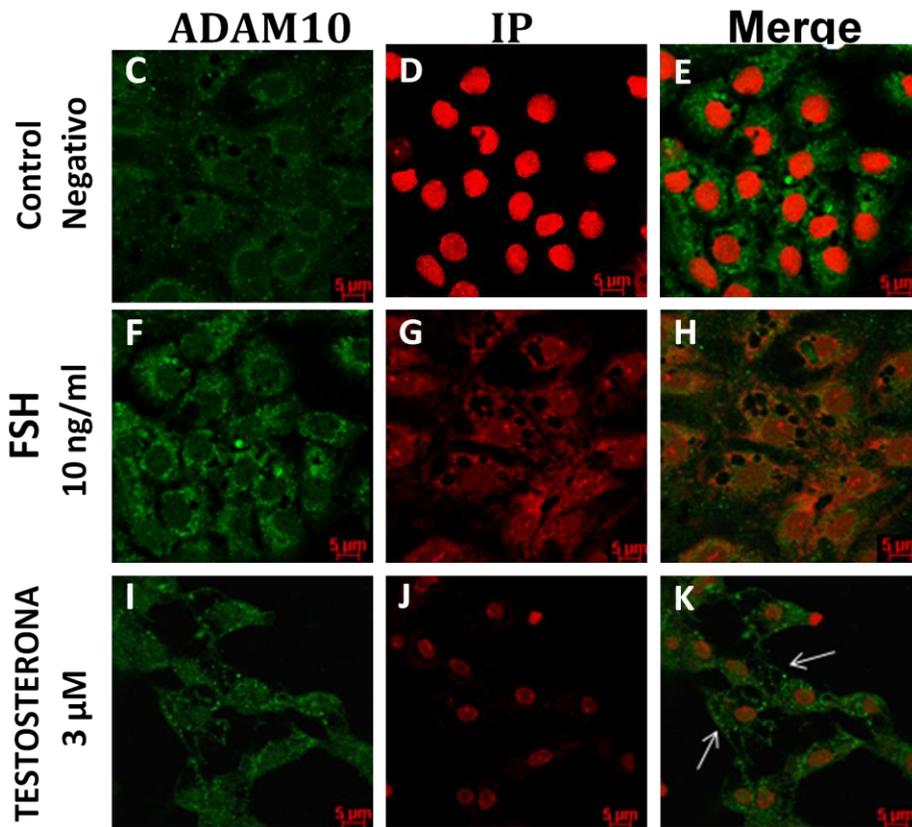
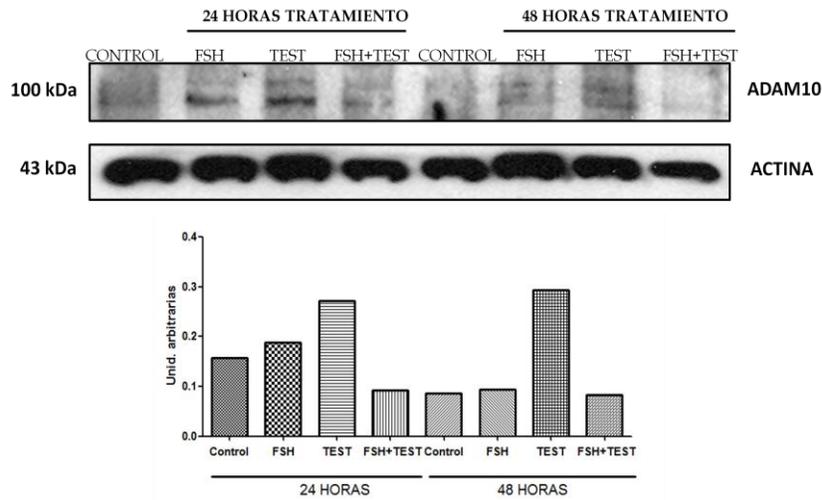


Figura 25: Expresión de ADAM10 en células de Sertoli *in vitro*, es regulada principalmente por testosterona.

A-B) Muestra Western Blot y desintometría de niveles proteicos de ADAM-10 en cultivos de células de Sertoli frente a tratamientos con hormonas FSH y testosterona por 24-48 hrs; F-H, I-K) Muestra inmunofluorescencia por microscopia confocal, revela cambio en la localización de ADAM10 frente a FSH y testosterona por 24 hrs, control C-E) células de Sertoli sin tratamientos, los núcleos se tiñeron con IP.

VI. DISCUSION

En el presente trabajo nosotros demostramos que aislando selectivamente células de Sertoli de otros tipos celulares en testículo, sin la complicación introducida por una variedad de múltiples factores y complejas interacciones celulares como sucede con estudios *in vivo*, desciframos que es posible que, células de Sertoli *in vitro* proliferen y formen adhesiones celulares iguales a las presentadas *in vivo*, y bajo este sistema determinamos efectos tanto de tóxicos ambientales como de factores hormonales paracrinos, que alteraron la funcionalidad de la célula de Sertoli, en lo que respecta a su proliferación y a la expresión de proteínas formadoras de la barrera hematotesticular y ADAM10.

Para ello se implemento un protocolo de aislación y cultivo de células de Sertoli de ratas de 17 días de edad (prepúberes) eligiéndose esta edad de ratas porque presentan células de Sertoli aun en etapa de diferenciación sin. Y además porque a esta edad aun no inicia la primera ola de espermatogénesis (Russell 1977), lo que aseguraría un menor número de células germinales, facilitando la aislación de células de Sertoli en cultivos (Russell and Steinberger 1989).

Además el microambiente en cultivo está diseñado para no incrementar la viabilidad de posibles células germinales que aun sigan adheridas a las células de Sertoli, junto con ello, se postula que para la mayoría de ensayos se empiecen a los tres días de cultivo, tiempo suficiente para que células de Sertoli se adhieran a la placa, cosa que no hacen las células germinales.

Células de Sertoli *in Vitro* asumen un fenotipo determinado, con características de células epiteliales en cultivos en monocapa (Kodani 1966). Su morfología esta descrita desde estudios pioneros *in vitro* (Vilar, Steinberger et al. 1966), la cual no es comparable con la morfología de otras células testiculares y es fácilmente distinguible de las células germinales en cualquier de sus estadios (Anway, Folmer et al. 2003). En comparación, por ejemplo, con las células de Leydig que poseen núcleos ovoides y redondos, con un margen liso nuclear y numerosas gotas lipídicas, o con células peritubulares mioides, con

abundantes filamentos citoplasmáticos con un núcleo central alargado. Se observó que las células de Sertoli extraídas presentaron características morfológicas típicas, destacándose la presencia de una gota lipídica, lo que permite una fácil identificación.

Se evaluó la presencia de marcadores celulares positivos como la proteína de citoesqueleto vimentina, ya que es conocido que células de Sertoli pero no células germinales expresan esta proteína de filamentos intermedios, convirtiéndola en un excelente marcador para identificar y evaluar la pureza de células de Sertoli en cultivo (Yang and Han 2010).

De igual forma se empleó como marcadores de pureza en nuestro cultivo la presencia de Clusterin, una apo-proteína, producida por células de Sertoli de rata *in vivo*, y es exclusiva de este grupo celular (Clark and Griswold 1997; Davidson, Bell et al. 2007). FAS-L proteína propia de células de Sertoli en el túbulo seminífero y FAS proteína receptora de FASL, exclusiva de células germinales (Xu, Li et al. 1999) que fue utilizada como control negativo.

Así, se logró cuantificar el porcentaje de pureza de nuestra técnica de cultivo, que es sobre el 95% con estos datos pudimos confirmar que nuestro cultivo primario, presenta una insignificante contaminación con otros grupos celulares del testículo.

Proliferación de células de Sertoli in vitro:

La célula de Sertoli es considerada una célula diferenciada (Chaudhary, Sadler-Riggelman et al. 2005) y quiescente (Sharpe, McKinnell et al. 2003), que expresa genes que están involucrados en la regulación de su ciclo celular (Ahmed, Barten-van Rijbroek et al. 2009). Esta diferenciación ocurre al entrar la rata a la pubertad y finaliza hacia los 18 días de edad e involucra la pérdida de la actividad proliferativa, que va ligada a la formación de uniones estrechas (TJ) entre células de Sertoli y a la formación de la BHT. Es por ello que es importante estudiar la proliferación y la diferenciación de las células *in Vitro* al exponer un modelo de cultivo.

Investigaciones pioneras en cultivos de células de Sertoli ilustraron la ausencia de proliferación después de la pubertad *in vivo* e *in vitro*. (Steinberger and Steinberger 1971),

otros estudios también establecieron que células de Sertoli de rata solo proliferan hasta los 15 días después del nacimiento, y otros estudios con el empleo de marcadores de proliferación como KI67 confirmaron lo expuesto por Steinberger, encontrando ausencia de proliferación (Orth, Higginbotham et al. 1984). Todos estas investigaciones y sus ensayos son concluyentes en determinar que no está descrita la proliferación de células de Sertoli en mamíferos adultos. Otros estudios han comprobado que existe una limitada franja de tiempo para la actividad mitótica de FSH en células de Sertoli, indicando que las células de Sertoli maduras requieren factores adicionales como testosterona para regular su proliferación. (Orth, Higginbotham et al. 1984) acelerando la maduración de las células de Sertoli.(Sharpe, McKinnell et al. 2003). Curiosamente resultados con la línea celular TM4; derivadas de células de Sertoli muestran de forma contraria un significativo estímulo a hormona folículo estimulante FSH y no a LH a concentraciones óptimas de 0.5 ng/ml (Mather 1980), induciendo proliferación celular.

Es así como se emplearon tratamientos con (FSH), ya que se conoce que la tasa de proliferación de las células de Sertoli en fase de diferenciación *in vivo*, es influenciada por (FSH) siendo además su principal mitógeno (Means, Dedman et al. 1980; Buzzard, Farnworth et al. 2003), al igual que se conoce que el crecimiento de línea celular TM4 estimulada por varias hormonas en especial FSH (Mather 1980).

Pero nuestros resultados mostraron que bajo las condiciones de cultivo establecidas, las células de Sertoli aisladas de ratas de 17 días proliferan, reingresando al ciclo celular. Para demostrarlo se realizaron dos tipos de ensayos de proliferación *in vitro*, la cuantificación de la pérdida de fluorescencia del (CFSE) por cada célula en división y el estudio del ciclo celular, ambos ensayos resultaron satisfactorios en demostrar proliferación de las células *in vitro* siendo el reingreso al ciclo celular prolongado por tratamientos con FSH y Testosterona. Mientras que se postula, que esta proliferación se detiene al establecer las células en cultivo, uniones TJ y AJ, entre células adyacentes (confluencia), junto con el establecimiento de propiedades de barrera y polaridad celular *in vitro*.

Expresión y co-localización de proteínas de adhesión celular en células de Sertoli en cultivo

Se conoce que la principal función de las células de Sertoli es crear un ambiente apropiado para el desarrollo de células germinales, y su maduración, a través de la formación de un íntimo contacto entre las células de Sertoli adyacentes, las que originan la barrera hematotesticular.

Para estudiar proteínas de adhesión de BHT *in vitro*, primero fue necesario, observar su expresión en tejido testicular *in vivo*. Eligiéndose como principales representantes del sistema de adhesión de la BHT, la expresión de ZO-1, Claudina-1 1 y Cadherina-E.

Los resultados mostraron específicamente que la intensidad de fluorescencia observada para Claudina-11 es más difusa, porque *in vivo* a los 17 días las células de Sertoli de rata, aun están en proceso de diferenciación. La expresión y localización de ZO-1 y Cadherina-E, fue según lo esperado *in Vivo*, esto es, en los sitios de contacto de células de Sertoli adyacentes alrededor de la lamina basal.

Luego se prosiguió a realizarse la misma detección de las proteínas de adhesión celular, estudiadas, pero en nuestro sistema *in vitro*.

Claudina-11 es una proteína específica de la formación de TJ, y su presencia en células de Sertoli adyacentes en nuestro cultivo, es esencial para la formación de BHT *in vitro*. Esto es complementado con la expresión de ZO-1; Cadherina E y Conexina Cx-43, los resultados mostraron que las células de Sertoli en cultivo desarrollan la misma maquinaria proteica para constituir adhesiones propias de la BHT.

Aunque se determinó la co-localización de la proteína AJ Cadherina-E frente a las proteínas TJ Claudina-11 y ZO-1 en los mismos sitios de contacto célula – célula, esta es una metodología muy subjetiva, por eso se decidió cuantificar la co-localización de las proteínas de uniones delgadas y de uniones adherentes estudiadas, en nuestro cultivo de células de Sertoli, empleándose un análisis de las imágenes adquiridas por microscopía confocal en dos canales duales, haciendo uso de los índices de Manders.

Los coeficientes de Pearson, empleados en otros estudios de co-localización, no usan un umbral global de intensidad (Pearson 2007), y otorga interpretaciones de la co-localización muy ambiguas. Estos otorgan valores de co-localización de 1 o -1, siendo ese valor negativo muy difícil de cuantificar además de poco exacto para medir colocalización en estructuras biológicas más complejas, como las membranas celulares.

Los coeficientes de Manders proveen una información relevante y cuantitativa sobre la relación posicional entre objetos biológicos y una clara representación de un completo solapamiento entre dos estructuras biológicas (Manders 1993). Tomando esas referencias y nuevas metodologías empleadas en el Laboratorio SCIAN (Scientific Imagen Análisis, de la Universidad de Chile), se realizó un análisis de procesamiento de imágenes en dos canales duales. Para definir la ubicación y medir la real co-localización de las proteínas constitutivas de la BHT estudiadas con anterioridad.

La interpretación de los coeficientes de Manders en nuestras células de cultivo es simple, entre 88 y 75% de Claudina 11 y ZO-1 respectivamente co-localiza en el mismo compartimiento o espacio celular que Cadherina E, mientras que solo un 30% a 35% de Cadherina-E termina co-localizando con las TJ, Claudina-11 y ZO-1 respectivamente.

También se demuestra que estas moléculas co-localizan en mayor cantidad en planos basales que en planos apicales, de igual forma como se desarrollan las adhesiones celulares en la BHT *in vivo*. Se espera a futuro analizar las mismas características en condiciones de confluencia y en unidades bicamerales para medir propiedades de la barrera hematotesticular y su funcionalidad.

Las adhesiones celulares en cultivos de células de Sertoli, son moduladas por FSH – testosterona y Bisfenol A.

La funcionalidad de las conexiones de la BHT en testículo de mamíferos, tienen parámetros bien definidos que se alteran por varios estímulos, uno de ellos son los xenoestrogenos ambientales que provocan pérdida de su función.

Se ha mostrado en nuestro laboratorio que ratas adultas tratadas con bisfenol A, presentan apoptosis de células germinales (dato no publicado). Además se ha sugerido también que bisfenol A, causa disminución en la producción de testosterona por las células de Leydig (Nakamura, Yanagiba et al. 2010) al igual que ruptura de la barrera hematotesticular de ratas de 20 días de edad. (Li, Mruk et al. 2009). Es así como primera aproximación, se utilizó tratamientos con bisphenol A (BPA), para determinar podría alterar los niveles de proteínas formadoras de la BHT estudias en nuestro modelo. Y se observo que los niveles proteicos de ZO-1, que es una de las principales proteínas de andamiaje de las uniones en la BHT disminuyen significativamente con dosis variables de BPA, es muy interesante notar que, a concentraciones de 5 μ M, hay un aumento de los niveles proteicos de ZO-1 respecto a los otros tratamientos pero no del control, aunque no fueron corroborados con un ensayo de inmunoreacción que demuestra muy poca expresión de proteína, lo cual nos podría hacer suponer que a esa especifica concentración podrían aumentar la expresión de la proteína, pero no así su localización subcelular.

De un mismo modo, se puede precisar, que hay una disminución significativa de los niveles proteicos de las TJ, representada en nuestro modelo por Claudina-11. Así los resultados de esta tesis indican que BPA estaría modulando negativamente la expresión de las proteínas Claudina-11, ZO-1 y Cadherina-E; proteínas de adhesión formadoras de la BHT, en cultivos primarios de células de Sertoli, aunque hacen falta más investigaciones y ensayos para determinar el o los mecanismos que estaría participando en este proceso.

La formación y regulación de uniones celulares entre las células de Sertoli para dar origen y establecer los procesos dinámicos de la BHT, es mediada por los dos principales reguladores endocrinos de la espermatogénesis: La hormona folículo estimulante (FSH) y la hormona testosterona. La FSH puede regular la formación de especializaciones ectoplasmicas y estimular la extensión de uniones adherentes en células de Sertoli (Sluka, O'Donnell et al. 2006). Modelos de hipofisectomía (Grover, Sairam et al. 2004) y modelos knockout para el receptor de FSH, revelan defectos en la habilidad de la célula de Sertoli para mantener a las células germinales, incrementando la apoptosis, y haciendo poco

eficiente la espermatogénesis (Grover, Sairam et al. 2004). Por otro lado, es bien conocido el papel de la testosterona en la formación de la barrera hematotesticular, modulando las adhesiones celulares desde la pubertad.

Recientes estudios han demostrado que la estimulación por andrógenos en especial testosterona, es crucial para mantener la integridad de la BHT (Walker 2009), al igual que se conoce que FSH juega un rol importante en la restructuración de las uniones adherentes entre células de Sertoli adyacente (Sluka, O'Donnell et al. 2006).

Estos antecedentes apoyarían la hipótesis de que proteínas de adhesión celular *in vitro* pueden ser moduladas por FSH y testosterona, lo cual fue confirmado en nuestros ensayos donde, FSH y testosterona aumentan tanto la expresión como la localización a nivel de membrana de, ZO-1 y Claudina-11 *in vitro*, proteínas formadoras de la BHT.

Expresión y modulación de ADAMs 10 y 17 en cultivos de células de Sertoli

ADAM17 y ADAM10, son proteínas pertenecientes a la familia de las “A disintegrin metallopeptidasas”, que comparten cierta homología estructural. Y las cuales aun no se han comprobado pertenezcan a algún grupo celular específico en el testículo.

ADAM17 es una proteína transmembrana que se entiende participa en el procesamiento del factor de necrosis tumoral (TNF- α), este proceso es conocido como “shedding” e implica la ruptura y liberación de las membranas celulares de un ectodominio soluble llamado pro-TNF α , que posee una importante actividad fisiológica, posiblemente regulando la dinámica de proteínas de adhesión celular en la BHT, por ello es de importancia determinar su expresión en las células de Sertoli *in vitro*.

Al mismo tiempo se conoce que, ADAM10 tiene como sustratos a moléculas de adhesión celular de tipo AJ (Maretzky, Reiss et al. 2005; Reiss, Maretzky et al. 2006) y que es responsable de la restructuración de las uniones célula - célula en otros epitelios, además de regular la proliferación, adhesión, migración y metástasis en células cancerígenas, mediada por la activación de proteínas kinasas (Zachary, Kohutek et al. 2009). Se adiciona que,

estudios en nuestro laboratorio han podido determinar que ambas proteínas participan regulando los procesos de apoptosis fisiológica de células germinales y la inducida por xenoestrogenos (dato no publicado).

Por ello fue de importancia investigar la presencia de estas dos proteínas, exclusivamente en las células de Sertoli en cultivo, para dilucidar si se expresan o no en este específico grupo celular del testículo, y los resultados mostraron que ADAM 10 se expresa de forma importante en células de Sertoli, además que su expresión aumenta por tratamientos con PMA, mientras que la expresión de ADAM17 es muy difusa y no presenta cambios frente a la exposición con activadores generales de PKC.

La transducción de señales por la hormona FSH en células de Sertoli ha sido considerada ser mediada principalmente a través de la activación de AMPc como segundo mensajero, que a su vez es dependiente de la vía de proteínas Kinasas en especial PKA, algunos estudios han demostrado que DAG y PKC también juegan un papel importante en la acción de FSH .

Es también conocido que Xenoestrogenos producen citotoxicidad a las células de Sertoli por estrés oxidativos (Yi Gong 2006) , donde influjos de Ca, activación de AMPc y proteínas Kinasas podrían estar mediando este proceso

Siendo estas vías comunes también en la modulación de ADAM10, es de esperar que tanto FSH y Xenoestrogenos como Bisfenol A, afecten de una u otra forma la expresión de esta proteína en células de Sertoli *in vitro*, como lo pudimos observar en nuestro estudio. Además se podría pensar que estos cambios mediados por FSH, Testosterona y Bisfenol A, en la expresión y localización de ADAM10 podrían promover su actividad permitiéndole acceder a sus sustratos, y cumplir con funciones específicas en las células de Sertoli.

VII. CONCLUSIONES

Nuestros resultados muestran, que el modelo de cultivo de células de Sertoli establecido y caracterizado en nuestro laboratorio, posee + 95% de pureza, y cuya viabilidad y proliferación aumenta al enriquecer los medios de cultivo con dosis cercanas a los niveles basales, de hormonas folículo estimulante y testosterona, demostrando que las células de Sertoli en cultivo, bajo condiciones establecidas retoman su ciclo celular y proliferan *in vitro*. Al mismo tiempo empleando nuevas metodologías para cuantificar la real co-localización de estructuras biológicas, se determinó que las células de Sertoli en cultivo expresan y localizan ZO-1, Claudina-11 y Cadherina-E proteínas formadoras de la barrera hematotesticular, en las mismas zonas de contacto que células de Sertoli adyacentes *in vivo*.

Con el modelo de cultivo de células de Sertoli diseñado, se demostró que la expresión y localización de proteínas de adhesión de la barrera hematotesticular aumentan por tratamientos con FSH y testosterona, además de que xenoestrogenos como Bisfenol A, tiene efectos negativos sobre ellas, pero son necesarias mayores evidencias experimentales y funcionales para determinar qué mecanismos están involucrados en la dinámica de las proteínas de adhesión mediadas por estas factores.

Esta tesis también destaca, ya que muestran las primeras evidencias de la presencia de metaloproteasas de la familia de las ADAMs, en células de Sertoli *in vitro*. Y que la expresión y localización subcelular de estas moléculas es modulada por PMA, FSH, testosterona y xenoestrogenos como bisfenol A; abriendo un nuevo campo para el estudio de la célula de Sertoli y la función reproductiva.

En conjunto estos resultados permiten proponer que las hormonas FSH y testosterona al igual que tóxicos ambientales como bisfenol A modulan de diferente forma la expresión de proteínas formadoras de la BHT como también la expresión y localización de ADAM10 en las células de Sertoli.

VIII. FIGURAS COMPLEMENTARIAS Y LISTA DE ABREVIATURAS

ADAMs:	A desintegrin and metalloproteases
AJ:	Uniones adherentes
BHT:	Barrera hematotesticular
BPA:	Bisfenol A
BSA:	Albumina de Suero bovino
CFSE:	Carboxifluoresceína diacetato succinimidil ester
Clau-11:	Claudina-11
Cx:	Conexina
CEL.:	Célula
DNA:	Acido desoxirribonucleico
E.S.:	Desviación estándar
FITC:	Fluoresceína isothiocianato
FSH:	Hormona folículo estimulante
GJ:	Uniones de comunicación
Hrs:	horas
IFI:	Inmunofluorescencia indirecta
IP:	Yoduro de Propidio
LH:	Hormona luteinizante
M1:	Coficiente Manders 1
M2:	Coficiente Manders 2

PMA:	Forbol-metil-acetato
PBS:	Tampón Fosfato salino
PKC:	Proteína kinasa C
R.O.I:	Regiones de interés
TGF:	Factor de crecimiento transformante
TES:	Testosterona
TJ:	Uniones estrechas
TNF:	Factor de necrosis tumoral
ZO-1:	<i>Zona Ocludens-1</i>

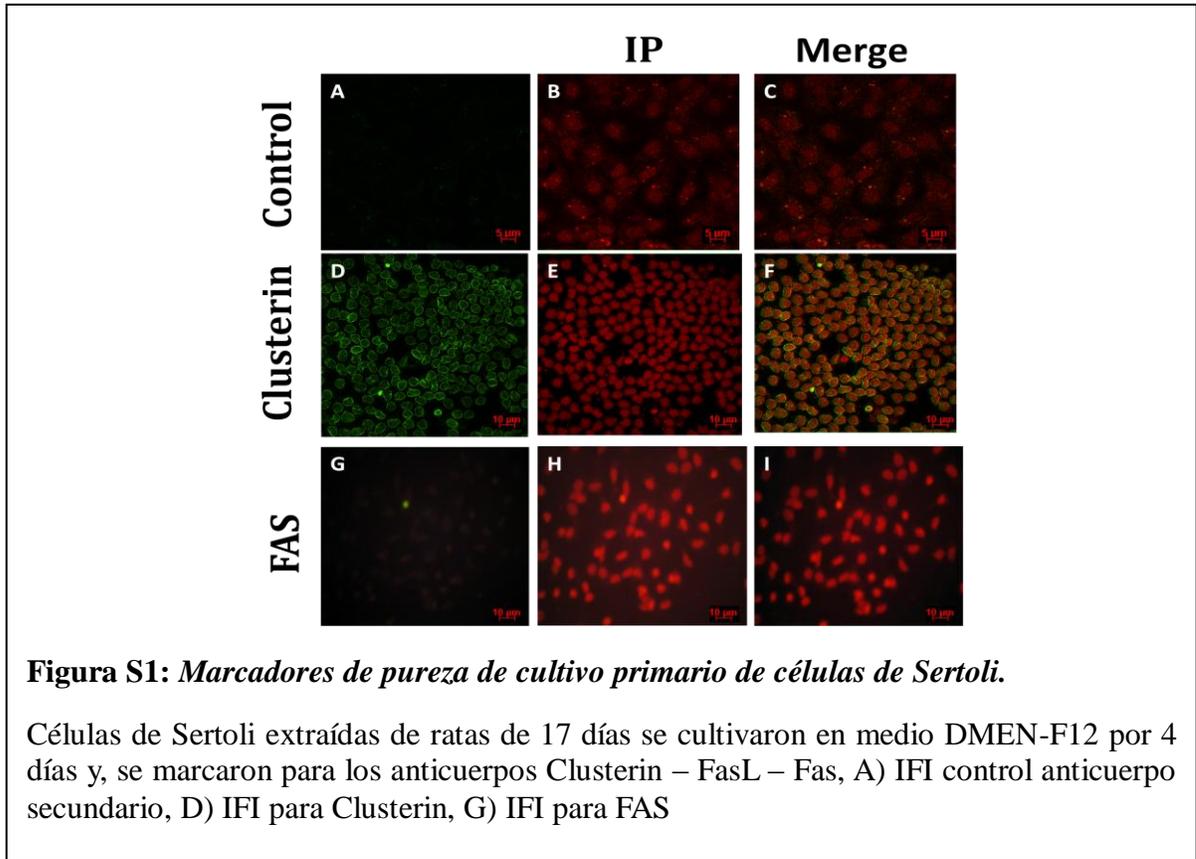
Anexo 1:

Tratamientos Vs Tiempos	Fase (G0/G1)		Fase (S)		Fase (G2/M)	
		Diferencia %		Diferencia %		Diferencia %
T (0 Horas)	31,85		16,68		46,63	
96 Horas						
Control	66,2		21,14		7,53	
TES + Suplementos	51,34	-22,45	8,08	-61,78	16,04	113,01
FSH + Androstenadiona	48,47	-26,78	10,15	-51,99	19,75	162,28
FSH + TES	46,4	-29,91	13,74	-35,00	25,81	242,76
FSH + Androstenadiona + Suplementos	52,31	-20,98	14,99	-29,09	19,27	155,91
FSH + TES + Suplementos	37,53	-43,31	16,99	-19,63	33,08	339,31

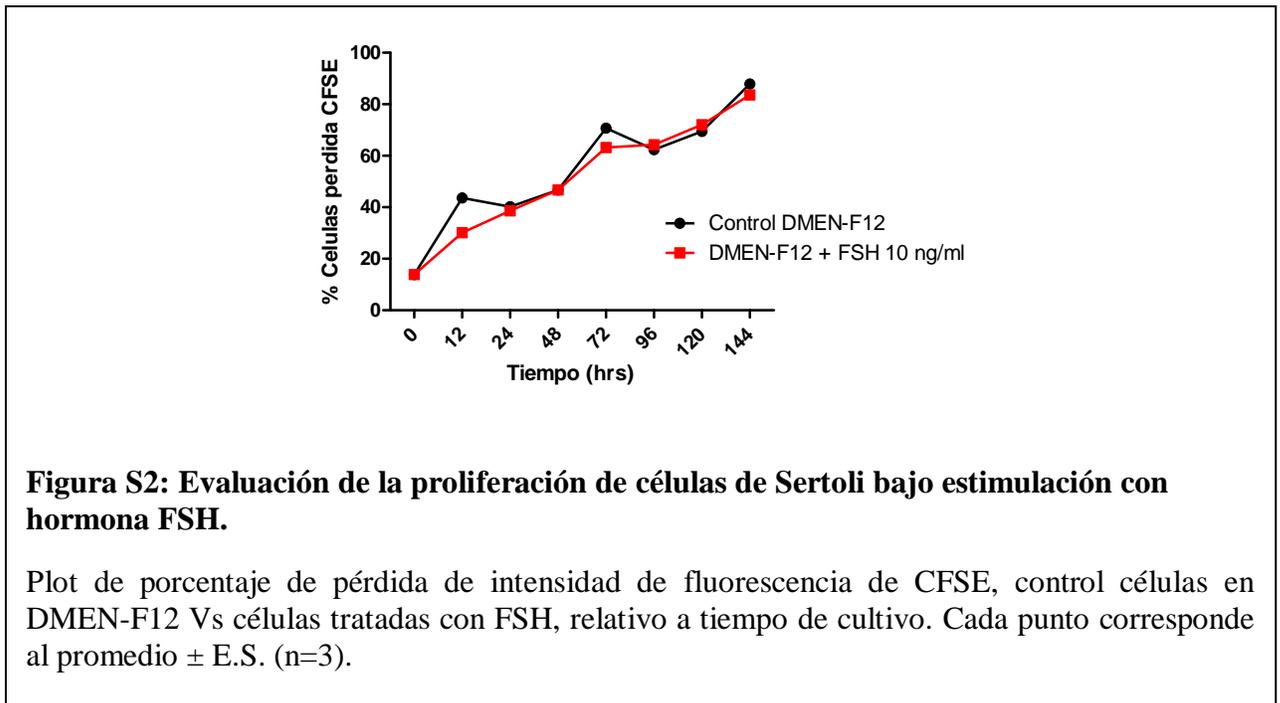
Tabla S.No 3: Análisis de fraccionamiento de ciclo celular por citometría de flujo a las 96 horas de cultivo:

Células de Sertoli tratadas con combinaciones de hormonas y/o suplementos. La distribución de las células en varias fases del ciclo fueron calculadas midiendo el contenido del DNA por marcación con yoduro de propidio (IP) usando el programa FCS express flow plus image versión 4.0.

Anexo 2:



Anexo3



IX. REFERENCIAS:

- Ahmed, E. A., A. D. Barten-van Rijbroek, et al. (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**(6): 1084-1091.
- Allan, C. M., A. Garcia, et al. (2004). "Complete Sertoli cell proliferation induced by follicle-stimulating hormone (FSH) independently of luteinizing hormone activity: evidence from genetic models of isolated FSH action." Endocrinology **145**(4): 1587-1593.
- Anway, M. D., J. Folmer, et al. (2003). "Isolation of sertoli cells from adult rat testes: an approach to ex vivo studies of Sertoli cell function." Biol Reprod **68**(3): 996-1002.
- Blobel, C. P. (2000). "Remarkable roles of proteolysis on and beyond the cell surface." Curr Opin Cell Biol **12**(5): 606-612.
- Bolte, S. and F. P. Cordelieres (2006). "A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy." J Microsc **224**(Pt 3): 213-232.
- Buzzard, J. J., P. G. Farnworth, et al. (2003). "Proliferative phase sertoli cells display a developmentally regulated response to activin in vitro." Endocrinology **144**(2): 474-483.
- Byers, S. W., S. Sujarit, et al. (1994). "Cadherins and cadherin-associated molecules in the developing and maturing rat testis." Endocrinology **134**(2): 630-639.
- Clark, A. M. and M. D. Griswold (1997). "Expression of clusterin/sulfated glycoprotein-2 under conditions of heat stress in rat Sertoli cells and a mouse Sertoli cell line." J Androl **18**(3): 257-263.
- Comeau, J. W., S. Costantino, et al. (2006). "A guide to accurate fluorescence microscopy colocalization measurements." Biophys J **91**(12): 4611-4622.
- Cornelia F (2009). "Claudin-11 is over-expressed and dislocated from the blood–testis barrier in Sertoli cells associated with testicular intraepithelial neoplasia in men." Histochem Cell Biol **131**: 755–764.
- Chaudhary, J., I. Sadler-Riggleman, et al. (2005). "The helix-loop-helix inhibitor of differentiation (ID) proteins induce post-mitotic terminally differentiated Sertoli cells to re-enter the cell cycle and proliferate." Biol Reprod **72**(5): 1205-1217.
- Cheng, C. Y., W. P. Elisa, et al. (2010). "Regulation of spermatogenesis in the microenvironment of the siminiferous epithelium; New insights and advances." Molecular and Celular Endrocrinology **315**: 49-56.
- Cheng, C. Y. and D. D. Mruk (2002). "Cell junction dynamics in the testis: Sertoli-germ cell interactions and male contraceptive development." Physiol Rev **82**(4): 825-874.
- Cheng, C. Y., E. W. Wong, et al. (2010). "Regulation of spermatogenesis in the microenvironment of the seminiferous epithelium: new insights and advances." Mol Cell Endocrinol **315**(1-2): 49-56.
- Darzynkiewicz, Z., H. D. Halicka, et al. (2010). "Analysis of cellular DNA content by flow and laser scanning cytometry." Adv Exp Med Biol **676**: 137-147.
- Davidson, A. G., R. J. Bell, et al. (2007). "Isolation, culture, and characterization of canine Sertoli cells." In Vitro Cell Dev Biol Anim **43**(10): 324-327.
- Decrouy, X., J. M. Gasc, et al. (2004). "Functional characterization of Cx43 based gap junctions during spermatogenesis." J Cell Physiol **200**(1): 146-154.
- Dhiren S. Dave, M., John T (2007). "Is the Testis a Chemo-Privileged Site? Is There a Blood–Testis Barrier?" Rev Urol. **VOL. 9**: 28 - 32.
- Dym, M. and D. W. Fawcett (1970). "The blood-testis barrier in the rat and the physiological compartmentation of the seminiferous epithelium." Biol Reprod **3**(3): 308-326.

- Edwards, D. R., M. M. Handsley, et al. (2008). "The ADAM metalloproteinases." Mol Aspects Med **29**(5): 258-289.
- Fanning, A. S., L. L. Mitic, et al. (1999). "Transmembrane proteins in the tight junction barrier." J Am Soc Nephrol **10**(6): 1337-1345.
- Fawcett DW, B. M. (1956). "The fine structure of Sertoli cells in the human testis." Anat Rec **24**: 401.
- Fink, C., F. Morgan, et al. (1998). "Intracellular fluorescent probe concentrations by confocal microscopy." Biophys J **75**(4): 1648-1658.
- Fiorini, C., A. Tilloy-Ellul, et al. (2004). "Sertoli cell junctional proteins as early targets for different classes of reproductive toxicants." Reprod Toxicol **18**(3): 413-421.
- Furuse, M., H. Sasaki, et al. (1998). "A single gene product, claudin-1 or -2, reconstitutes tight junction strands and recruits occludin in fibroblasts." J Cell Biol **143**(2): 391-401.
- Grima, J., C. Pineau, et al. (1992). "Rat Sertoli cell clusterin, alpha 2-macroglobulin, and testins: biosynthesis and differential regulation by germ cells." Mol Cell Endocrinol **89**(1-2): 127-140.
- Grover, A., M. R. Sairam, et al. (2004). "Structural and functional modifications of sertoli cells in the testis of adult follicle-stimulating hormone receptor knockout mice." Biol Reprod **71**(1): 117-129.
- Ham, A. W. (1975). "Aparato Reprodutor Masculino." In: Tratado de Histologia 6 edicion en español(Editorial Interamericana): 839 -867.
- Han, C., E. Choi, et al. (2009). "Comprehensive analysis of reproductive ADAMs: relationship of ADAM4 and ADAM6 with an ADAM complex required for fertilization in mice." Biol Reprod **80**(5): 1001-1008.
- Hawkins, E. D. (2007). "Measuring lymphocyte proliferation, survival and differentiation using CFSE time-series data." Natural Protocol **2**(No. 9): 2057-2067.
- Hess, R. A. (1990). "Quantitative and qualitative characteristics of the stages and transitions in the cycle of the rat seminiferous epithelium: light microscopic observations of perfusion-fixed and plastic-embedded testes." Biol Reprod **43**(3): 525-542.
- Hyrien, O., R. Chen, et al. (2010). "An age-dependent branching process model for the analysis of CFSE-labeling experiments." Biol Direct **5**: 41.
- Itoh, M., M. Furuse, et al. (1999). "Direct binding of three tight junction-associated MAGUKs, ZO-1, ZO-2, and ZO-3, with the COOH termini of claudins." J Cell Biol **147**(6): 1351-1363.
- Jianliang, X. (2009). "Zona Occludens-2 Is Critical for Blood–Testis Barrier Integrity and Male Fertility." Molecular Biology of the Cell **20**: 4268-4277.
- Kaiyu'u-Lino (2007). "Claudin-11 expression and localisation is regulated by androgens in rat Sertoli cells in vitro." Reproduction **133**: 1169-1179.
- Kim, T., J. Oh, et al. (2006). "Expression and relationship of male reproductive ADAMs in mouse." Biol Reprod **74**(4): 744-750.
- Kleinman, H. K. and G. R. Martin (2005). "Matrigel: basement membrane matrix with biological activity." Semin Cancer Biol **15**(5): 378-386.
- Kodani, M. K., K. (1966). "The in vitro cultivation of mammalian Sertoli cells." Proc Natl Acad Sci U S A **56**(4): 1200-1206.
- Legendre, A., P. Froment, et al. "An engineered 3D blood-testis barrier model for the assessment of reproductive toxicity potential." Biomaterials **31**(16): 4492-4505.
- Li, J. C., T. W. Lee, et al. (2001). "Regulation of Sertoli cell myotubularin (rMTM) expression by germ cells in vitro." J Androl **22**(2): 266-277.

- Li, M. W., D. D. Mruk, et al. (2009). "Disruption of the blood-testis barrier integrity by bisphenol A in vitro: is this a suitable model for studying blood-testis barrier dynamics?" Int J Biochem Cell Biol **41**(11): 2302-2314.
- Li, M. W., D. D. Mruk, et al. (2010). "Connexin 43 is critical to maintain the homeostasis of the blood-testis barrier via its effects on tight junction reassembly." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(42): 17998-18003.
- Liu, D., J. Yu, et al. (2006). "Statistical determination of threshold for cellular division in the CFSE-labeling assay." J Immunol Methods **312**(1-2): 126-136.
- Lizama, C., D. Rojas-Benitez, et al. (2010). "TACE/ADAM17 is involved in germ cell apoptosis during rat spermatogenesis." Reproduction **140**(2): 305-317.
- Lizama, C., D. Rojas-Benitez, et al. (2011). "Involvement of TACE/ADAM17 and ADAM10 in etoposide-induced apoptosis of germ cells in rat spermatogenesis." J Cell Physiol.
- Manders, E. M. M. (1993). "Measurement of co-localization of objects in dual colour images." Journal of Microscopy **169**(7): 375-382.
- Maretzky, T., K. Reiss, et al. (2005). "ADAM10 mediates E-cadherin shedding and regulates epithelial cell-cell adhesion, migration, and beta-catenin translocation." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(26): 9182-9187.
- Martin-Padura, I., S. Lostaglio, et al. (1998). "Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration." J Cell Biol **142**(1): 117-127.
- Mather, J. P. (1980). "Establishment and characterization of two distinct mouse testicular epithelial cell lines." Biol Reprod **23**(1): 243-252.
- Meachem, S. J., R. I. McLachlan, et al. (1996). "Neonatal exposure of rats to recombinant follicle stimulating hormone increases adult Sertoli and spermatogenic cell numbers." Biol Reprod **54**(1): 36-44.
- Means, A. R., J. R. Dedman, et al. (1980). "Regulation of the testis sertoli cell by follicle stimulating hormone." Annu Rev Physiol **42**: 59-70.
- Mese, G., G. Richard, et al. (2007). "Gap junctions: basic structure and function." J Invest Dermatol **127**(11): 2516-2524.
- Michelle W. M. Lia, D. D. M. (2009). "Connexin 43 and plakophilin-2 as a protein complex that regulates blood-testis barrier dynamics." PNAS **106**: 10213-10218.
- Moreno, R. D., C. Lizama, et al. (2006). "Caspase activation throughout the first wave of spermatogenesis in the rat." Cell Tissue Res **325**(3): 533-540.
- Morgado-Díaz, S. S. O. a. J. A. (2007). "Claudins: multifunctional players in epithelial tight junctions and their role in cancer." Cell. Mol. Life Sci. **64**: 17-28.
- Mruk, D. D., W. M. Lee, et al. (2004). "Sertoli-Sertoli and Sertoli-Germ Cell Interactions and Their Significance in Germ Cell Movement in the Seminiferous Epithelium during Spermatogenesis." Endocrinology Reviews **25**: 747 -806.
- Mruk, D. D., B. Silvestrini, et al. (2008). "Anchoring junctions as drug targets: role in contraceptive development." Pharmacol Rev **60**(2): 146-180.
- Nakamura, D., Y. Yanagiba, et al. (2010). "Bisphenol A may cause testosterone reduction by adversely affecting both testis and pituitary systems similar to estradiol." Toxicol Lett **194**(1-2): 16-25.
- Nikki P.Y. Lee, D. M., Will M. Lee, and C. Yan Cheng (2003). "Is the Cadherin/Catenin Complex a Functional Unit of Cell-Cell Actin-Based Adherens Junctions in the Rat Testis?" Biology of Reproduccion **68**: 489-508.

- Nunez, R. (2001). "DNA measurement and cell cycle analysis by flow cytometry." Curr Issues Mol Biol **3**(3): 67-70.
- Orth, J. M., C. A. Higginbotham, et al. (1984). "Hemicastration causes and testosterone prevents enhanced uptake of [3H] thymidine by Sertoli cells in testes of immature rats." Biol Reprod **30**(1): 263-270.
- Parish, C. R. (1999). "Fluorescent dyes for lymphocyte migration and proliferation studies." Immunol Cell Biol **77**(6): 499-508.
- Parreira, G. G., L. D. Russell, et al. (2002). "Relationship of sertoli-sertoli tight junctions to ectoplasmic specialization in conventional and en face views." Biol Reprod **67**(4): 1232-1241.
- Pearson, H. (2007). "The good, the bad and the ugly." Nature **447**(7141): 138-140.
- Primakoff, P. and D. G. Myles (2000). "The ADAM gene family: surface proteins with adhesion and protease activity." Trends Genet **16**(2): 83-87.
- Ramirez, O. A., R. L. Vidal, et al. (2009). "Dendritic assembly of heteromeric gamma-aminobutyric acid type B receptor subunits in hippocampal neurons." J Biol Chem **284**(19): 13077-13085.
- Reiss, K., T. Maretzky, et al. (2006). "Regulated ADAM10-dependent ectodomain shedding of gamma-protocadherin C3 modulates cell-cell adhesion." J Biol Chem **281**(31): 21735-21744.
- Reiss, K., T. Maretzky, et al. (2005). "ADAM10 cleavage of N-cadherin and regulation of cell-cell adhesion and beta-catenin nuclear signalling." EMBO J **24**(4): 742-752.
- Reneau, J., M. Reyland, et al. (2009). "Phorbol 12- Myristate 13-Acetate Potentiation of N-Methyl-D-aspartate-Induced Currents in Primary Cultured Cerebellar Granule Cells Is mediated by Protein Kinase C." Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics **330**: 641 - 649.
- Roscoe, W. A., K. J. Barr, et al. (2001). "Failure of spermatogenesis in mice lacking connexin43." Biol Reprod **65**(3): 829-838.
- Russell, L. (1977). "Movement of spermatocytes from the basal to the adluminal compartment of the rat testis." Am J Anat **148**(3): 313-328.
- Russell, L. D., Griswold M.D. (1993). "The Sertoli Cell." Reproductive Toxicology Center, Washington, DC, USA eds. Clearwater, Florida: Cache River Press: 801.
- Russell, L. D. and R. N. Peterson (1985). "Sertoli cell junctions: morphological and functional correlates." Int Rev Cytol **94**: 177-211.
- Russell, L. D. and A. Steinberger (1989). "Sertoli cells in culture: views from the perspectives of an in vivoist and an in vitroist." Biol Reprod **41**(4): 571-577.
- Sertoli E (1865). "Dell'esistenza di particolari cellule ramificate nei canalicoli seminiferi del testicolo umano." Morgagni **7**: 31-33.
- Sharpe, R. M., C. McKinnell, et al. (2003). "Proliferation and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood." Reproduction **125**(6): 769-784.
- Siu ER, W. E. (2009). "An occludin-focal adhesion kinase protein complex at the blood-testis barrier: a study using the cadmium model." Endocrinology **150**: 3336-3344.
- Siu, M. K. and C. Y. Cheng (2004). "Dynamic cross-talk between cells and the extracellular matrix in the testis." Bioessays **26**(9): 978-992.
- Sluka, P., L. O'Donnell, et al. (2006). "FSH regulates the formation of adherens junctions and ectoplasmic specialisations between rat Sertoli cells in vitro and in vivo." J Endocrinol **189**(2): 381-395.

- Steinberger, A. (1975). "In vitro techniques for the study of spermatogenesis." Methods Enzymol **39**: 283-296.
- Steinberger, A., J. J. Heindel, et al. (1975). "Isolation and culture of FSH responsive Sertoli cells." Endocr Res Commun **2**(3): 261-272.
- Steinberger, A. and E. Steinberger (1966). "In vitro culture of rat testicular cells." Exp Cell Res **44**(2): 443-452.
- Steinberger, A. and E. Steinberger (1970). "Tissue culture of male mammalian gonads." In Vitro **5**: 17-27.
- Steinberger, A. and E. Steinberger (1971). "Replication pattern of Sertoli cells in maturing rat testis in vivo and in organ culture." Biol Reprod **4**(1): 84-87.
- Stevenson, B. R., J. D. Siliciano, et al. (1986). "Identification of ZO-1: a high molecular weight polypeptide associated with the tight junction (zonula occludens) in a variety of epithelia." J Cell Biol **103**(3): 755-766.
- Sundberg, C. (2004). "Regulation of ADAM12 cell-surface expression by protein kinase C epsilon." J Biol Chem **279**: 51601-51611.
- TJ, K. u.-L. (2007). "Claudin-11 expression and localisation is regulated by androgens in rat Sertoli cells in vitro." Reproduction **133**: 1169-1179.
- Tsukita S, F. M. (1999). "Occludin and claudins in tight junction strands: leading or supporting players?" Trends Cell Biol. **9**(1): 268 - 273.
- Vilar, O., A. Steinberger, et al. (1966). "Electron microscopy of isolated rat testicular cells grown in vitro." Z Zellforsch Mikrosk Anat **74**(4): 529-538.
- Walker, W. H. (2009). "Molecular mechanisms of testosterone action in spermatogenesis." Steroids **74**(7): 602-607.
- Wessel, G. M. (2011). "Accessorizing the testis. Enrico Sertoli and the "mother cell" of the testis." Mol Reprod Dev **78**(3): Fmi.
- Wolfsberg, T. G., P. D. Straight, et al. (1995). "ADAM, a widely distributed and developmentally regulated gene family encoding membrane proteins with a disintegrin and metalloprotease domain." Dev Biol **169**(1): 378-383.
- Wong, E. W., D. D. Mruk, et al. (2008). "Biology and regulation of ectoplasmic specialization, an atypical adherens junction type, in the testis." Biochim Biophys Acta **1778**(3): 692-708.
- Xu, J. P., X. Li, et al. (1999). "Expression of Fas-Fas ligand in murine testis." Am J Reprod Immunol **42**(6): 381-388.
- Yamazaki, Y., R. Tokumasu, et al. (2011). "Role of claudin species-specific dynamics in reconstitution and remodeling of the zonula occludens." Mol Biol Cell **22**(9): 1495-1504.
- Yan, H. H., D. D. Mruk, et al. (2008). "Blood-testis barrier dynamics are regulated by testosterone and cytokines via their differential effects on the kinetics of protein endocytosis and recycling in Sertoli cells." FASEB J **22**(6): 1945-1959.
- Yan, H. H., D. D. Mruk, et al. (2008). "Cross-talk between tight and anchoring junctions-lesson from the testis." Adv Exp Med Biol **636**: 234-254.
- Yan, H. H. N. (2008). "An autocrine axis in the testis that coordinates spermiation and blood testis barrier restructuring during spermatogenesis." PNAS **105**: 8950 -8955.
- Yang, Y. and C. Han (2010). "GDNF stimulates the proliferation of cultured mouse immature Sertoli cells via its receptor subunit NCAM and ERK1/2 signaling pathway." BMC Cell Biol **11**: 78.
- Yates, A. (2007). "Reconstruction of cell population dynamics using CFSE." BMC Bioinformatics **8**(196).
- Yi Gong, X. D. H. (2006). "Nonylphenol-induced oxidative stress and cytotoxicity in testicular Sertoli cells." Reproductive Toxicology **22**: 623-630.

- Zachary, A., C. G. Kohutek, et al. (2009). "ADAM-10-Mediated N-Cadherin Cleavage Is Protein Kinase C- Dependent and Promotes Glioblastoma Cell Migration." *The Journal of Neuroscience* 29(14): 4605– 4615.
- Zhang, Y. H., L. Lin, et al. (2008). "Disruption effects of monophthalate exposures on inter-Sertoli tight junction in a two-compartment culture model." *Environ Toxicol* 23(3): 302-308.
- Zinchuk, V., O. Zinchuk, et al. (2007). "Quantitative colocalization analysis of multicolor confocal immunofluorescence microscopy images: pushing pixels to explore biological phenomena." *Acta Histochem Cytochem* 40(4): 101-111.