

UNIVERSIDAD DE ALCALÁ
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR



PAPEL DE LA LIPASA SENSIBLE A HORMONAS
EN EL TESTÍCULO DE RATÓN. IMPLICACIÓN DE
LOS LÍPIDOS Y LOS RECEPTORES “SCAVENGER”
CLASE B EN FERTILIDAD

Tesis doctoral
María Emilia Casado Cerdeño
Dirigida por: Dra. Antonia Martín-Hidalgo y Dra. Rebeca Busto

Esta tesis doctoral ha sido realizada gracias a la financiación obtenida de los proyectos, SAF 2008-01104 y SAF2009-08764 del Ministerio de Ciencia e Innovación, Fondo de Investigación Sanitaria (PI050403) y del CIBER de la Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (una iniciativa del ISCIII); y a las infraestructuras del Hospital Ramón y Cajal (IRYCIS).

*A mi padre, mi madre, mi hermana y mi hermano que siempre están ahí.
A Coral la alegría de la casa.
A Fran por quererme, respetarme y apoyarme.
A mi abuela y mi tío Paco que tanto me ayudaron al comienzo sin saberlo.
A todos los amantes de la ciencia.*

*La verdadera ciencia enseña, por encima de todo, a dudar y a ser ignorante.
Miguel de Unamuno (1864-1936) Filósofo y escritor español.*

*Estar preparado es importante, saber esperar lo es aún más, pero aprovechar el momento adecuado es
la clave de la vida. Arthur Schnitzler (1862-1931) Dramaturgo austríaco.*

Me gustaría mostrar mi profundo agradecimiento a:

Mis directoras de tesis la doctora Antonia Martín-Hidalgo y la doctora Rebeca Busto, todo lo que pueda decir no alcanzará lo que os debo, muchas gracias por darme la oportunidad de hacer este trabajo con vosotras, por haber ido guiándome, ayudándome y acompañándome tan bien en el camino, por todo lo que me habéis enseñado, por vuestra paciencia y el esfuerzo que me habéis dedicado.

Al director del departamento de Investigación Bioquímica y mi tutor durante la tesis el Doctor Miguel Ángel Lasunción gracias por permitirme la oportunidad de desarrollar este trabajo, por acogerme tan bien en el laboratorio, por todo lo que me has enseñado durante estos años y por dedicarme parte de tu tiempo.

Gracias a los tres por ayudarme y mostrarme cómo es dedicarme a la profesión que más me gusta, la ciencia.

Gracias al Doctor Diego Gómez-Coronado por hacer ameno el camino con tu compañía durante mi tiempo en el laboratorio, por tus chistes y por estar dispuesto a resolver dudas.

Gracias al doctor Javier Martínez-Botas por tu ayuda con los arrays y las PCRs, por resolver mis dudas y gracias también por tu compañía durante mis años en el laboratorio.

Gracias al doctor Alfonso Gutiérrez Adán y a la doctora Miriam Pérez Crespo del departamento de Reproducción Animal y Conservación de Recursos Zoo genéticos, INIA, Madrid, por vuestra contribución con el análisis del esperma de los ratones.

Gracias a la doctora Dolores Muñoz Araujo por su ayuda inestimable con los ratones, por su amabilidad y su comprensión.

Gracias al doctor Luis Orensaz por la buena música que me ha prestado que me ha acompañado tanto durante los últimos momentos y me acompañará siempre, gracias por tus conversaciones, consejos y por ofrecer tu ayuda.

Gracias al Doctor Carlos Correa Gospe por tu ayuda en el animalario.

A todos los compañeros que han contribuido con su gran ayuda a que este trabajo salga adelante. A los que ya no están en el laboratorio: Irene y Paloma gracias por vuestra ayuda con los ratones, los western, con las extracciones y mucho más, gracias Sergio, Sonia y Jana por enseñarme todo cuando llegué y por vuestra paciencia cuando os preguntaba donde está tal o cual cosa; se os echa mucho de menos a todos, me alegro mucho de haber coincidido con vosotros y haberos conocido, gracias por vuestra ayuda y contribución al trabajo y gracias por haberme acogido tan bien cuando llegué. Gracias Irene y Sergio por haberme ofrecido vuestra amistad que espero no perdamos nunca, y a Paloma por tu amistad y los ratos tan divertidos que nos has hecho y haces pasar, no cambies. Y a los que siguen en el laboratorio: muchas gracias Lydia por tu inestimable ayuda en la realización de este trabajo, por las inmunos, los ratones y todo lo demás, gracias Mila por tu gran ayuda y contribución en la realización de la tesis, por las extracciones de lípidos, los ratones y demás, y por cuidarme en los malos momentos, gracias por tus riquísimas infusiones de frambuesa que funcionan fenomenal y gracias Alberto por la ayuda que me has prestado durante la tesis, porque siempre estás ahí y dispuesto a todo, gracias por tus ánimos, por tu apoyo, por responder a mis dudas y por tu compañía.

Y siguiendo con el 2017, muchas gracias Paqui por tus buenos consejos, por estar siempre dispuesta a ayudar y por tener tanta paciencia escuchándome, me alegro mucho de haberte conocido. Y del 2014, Gracias Gely por tu ayuda, por tus buenos consejos cuando llegué al laboratorio y por tus comiditas riquísimas que traes de vez en cuando.

A las chicas del 2020, muchas gracias Gema por tu gran ayuda con las extracciones y el hplc y por estar ahí para resolver siempre cualquier duda, por conseguir siempre hacerme sonreír y reír a carcajadas y por tus ánimos. Gracias Cova por tu ayuda y por estar siempre dispuesta a enseñarme, con el hplc y con tantas otras cosas, gracias por tu apoyo moral durante este camino que estamos recorriendo juntas, gracias por la compañía y por escuchar.

Gracias a las chicas del array, a Lidia y María Eugenia por resolver todas mis dudas con las PCR_s y muchas otras. Y gracias a Lorena y a Vero porque además de resolver mis dudas y ayudarme, me habéis prestado vuestra amistad, me alegro de haber coincidido con vosotras. Gracias Vero por estar siempre dispuesta a ayudarme y por tu amistad y las risas que nos pasamos. Gracias Lorena por enseñarme las RTqPCR y ayudarme con ellas, pero sobre todo gracias por tu paciencia y tus ánimos, por escucharme, aguantarme y comprenderme, gracias por esa carta, la necesitaba, la leeré siempre que me sienta caer, y gracias por saber darme un par de “bofetadas” cuando me aturullo.

Gracias a todos los de proteínas por vuestra compañía y por prestarnos siempre cosillas cuando las necesitábamos.

Gracias a los del pasillo de neuro por vuestra ayuda prestándonos todo cuanto hemos necesitado, gracias al laboratorio de M^a Ángeles Mena por el sonicador y en su día el politron tan necesarios para esos gradientes. Gracias Silvi por estar siempre dispuesta ayudándome y resolviendo mis dudas con los ELISAS de testosterona. Gracias a todos los del pasillo por vuestra compañía. Gracias Izaskun por las risas que pasamos cuando estabas aquí, se te echa de menos.

Gracias a toda mi familia, los más cercanos y los más lejanos, a Fran, a su familia y los que le rodean, gracias a mis amigos, a todos vosotros por estar ahí. Gracias César por el diseño con la portada, por tu paciencia, por tus buenos consejos y por mantener siempre la calma.

A todos os quiero decir que sin vosotros este trabajo no sería posible. MUCHAS GRACIAS.

Índice

Abreviaturas	1
Summary	7
Resumen	9
Introducción.....	11
1. EL TESTÍCULO	11
1.1. Anatomía e histología.....	11
1.2. Hormonas esteroideas.....	12
1.2.1. Biosíntesis de las hormonas esteroideas	13
1.2.2. Regulación de la biosíntesis de las hormonas esteroideas.....	14
1.2.3. Eje hipotalámico-pituitario-gonadal.....	15
1.3. Espermatogénesis.....	17
1.3.1. Origen de las células madre de espermatogonias.....	17
1.3.2. Desarrollo del linaje espermatogénico	18
1.3.3. El nicho de las células madre de espermatogonias	19
1.3.4. Factores que modulan la espermatogénesis.....	21
1.3.5. Maduración del espermatozoide en el epidídimo.....	22
1.3.6. Capacitación de los espermatozoides.....	23
2. LIPASA SENSIBLE A LAS HORMONAS	23
2.1. Función, localización y expresión en diferentes tejidos.....	23
2.2. Estructura y características de la proteína y el gen	25
2.2.1. Estructura de la proteína	25
2.2.2. Estructura del gen.....	27
2.3. Regulación	28
2.3.1. Regulación aguda o a corto plazo	28
2.3.2. Regulación a largo plazo.....	31
2.4. La HSL en el testículo	32
3. COLESTEROL.....	34

3.1.	Biosíntesis de colesterol	34
3.2.	Mecanismos relacionados con la homeostasis de colesterol.....	37
3.3.	Lipoproteínas	38
3.3.1.	Receptores de lipoproteínas.....	39
3.3.1.1.	Vías de señalización dependientes de SR-BI	41
3.3.1.1.1.	Mediador de la captación de lípidos.....	42
3.3.1.1.2.	Regulador del colesterol de la membrana plasmática.....	43
1.1.1.1.1.	Procesos de señalización e interacción con proteínas	43
1.2.	El colesterol en el testículo.....	45
2.	ÁCIDOS GRASOS.....	47
2.1.	Clases de ácidos grasos y nomenclatura.....	47
2.2.	Síntesis de ácidos grasos	48
2.3.	Regulación de la síntesis de los ácidos grasos.....	50
2.4.	Plasmalógenos	51
2.5.	Los ácidos grasos en el testículo.....	51
3.	MICRODOMINIOS DE MEMBRANA <i>LIPID RAFT/CAVEOLAS</i>	54
3.1.	Caveolas.....	56
3.2.	Composición lipídica	56
3.3.	Composición proteica.....	56
3.4.	Cascadas de señalización	57
	Objetivos.....	61
	Materiales y métodos.....	65
1.	Mantenimiento de la colonia de ratones knockout de HSL (HSL -/-).....	65
2.	Genotipado de ratones HSL -/-.....	65
3.	Animales y condiciones ambientales	66
3.1.	Grupos experimentales	66
4.	Sacrificio de los animales y recogida de muestras	66
5.	Determinaciones en plasma	67

5.1.	Triglicéridos	67
5.2.	Colesterol.....	67
5.3.	Testosterona.....	67
6.	Análisis del esperma de los animales.....	68
6.1.	Aislamiento de los espermatozoides	68
6.2.	Determinación de las características del esperma.....	68
6.3.	Determinación de la viabilidad de los espermatozoides	68
7.	Estudio histológico del testículo de ratón	68
7.1.	Estudio inmunohistoquímico	68
7.2.	Estudio histológico de lípidos	70
7.2.1.	Tinción con filipina.....	70
7.2.2.	Tinción con <i>Oil-Red</i>	70
8.	Aislamiento de fracciones de membrana (<i>lipid rafts</i> y <i>no-rafts</i>) en gradiente de sacarosa	71
9.	Lisado de testículo.....	71
10.	Estudio de proteínas	72
10.1.	Precipitación de proteínas en fracciones de membrana del testículo	72
10.2.	Valoración de proteínas.....	72
10.3.	Estudio de expresión de proteínas mediante western blot	72
11.	Análisis de la composición en ácidos grasos y esteroides	73
11.1.	Extracción de lípidos totales	73
11.2.	Obtención de ácidos grasos	73
11.3.	Obtención de esteroides	74
11.4.	Análisis de los ácidos grasos mediante cromatografía de gases/espectrometría de masas (CG/EM).....	74
11.5.	Análisis de los esteroides mediante CG/EM	74
12.	Extracción de ARN.....	75
13.	Expresión diferencial de genes mediante matrices de ADNc (ADNc <i>microarray</i>)	75

14. RT-PCR en tiempo real (Q-PCR)	75
15. Análisis estadístico	77
Resultados.....	81
1. Efecto de la ausencia de HSL en el peso corporal y de los testículos	81
2. Efecto de la ausencia de HSL en el número y la movilidad de los espermatozoides en el esperma de ratón	82
3. Estudio de triglicéridos y colesterol en plasma de ratones HSL +/+ y HSL -/- ...	83
4. Análisis de la testosterona en plasma de ratones HSL +/+ y HSL -/-	83
5. Estudio histológico de los testículos de ratones HSL +/+ y HSL -/-	84
5.1. Inmunolocalización y expresión de HSL en testículo de ratones HSL +/+ y HSL -/-.....	85
5.2. Efecto de la ausencia de HSL en la inmunolocalización de los receptores scavenger clase B en los testículo de ratones	86
5.2.1. Inmunolocalización del receptor SR-BI en testículo de ratones HSL +/+ y HSL -/-87	
5.2.2. Inmunolocalización del receptor SR-BII en testículo de ratones HSL +/+ y HSL -/-.....	88
5.2.3. Inmunolocalización del receptor LIMPII en testículo de ratones HSL +/+ y HSL -/-.....	89
5.3. Estudio histológico de los lípidos en testículo de ratones HSL +/+ y HSL -/- 89	
5.3.1. Tinción de colesterol libre con filipina	89
5.3.2. Tinción de lípidos neutros con Oil-Red.....	90
6. Estudio de la expresión de SR-Bs en lisados celulares de testículo de ratones HSL +/+ y HSL -/-	91
6.1. Expresión de SR-BI en los testículos de los ratones HSL +/+ y HSL -/-.....	91
6.2. Expresión de SR-BII en el testículo de ratones HSL +/+ y HSL -/-	91
7. Efecto de la ausencia de HSL sobre la expresión de diferentes proteínas implicadas en rutas de señalización celular en los testículos de ratones	92
8. Análisis de la composición de esteroles totales en el testículo de ratones HSL +/+ y HSL -/-	93
9. Aislamiento de fracciones de membrana e identificación de los dominios <i>lipid rafts</i> en testículo de ratones HSL +/+ y HSL -/-.....	95

9.1. Distribución de caveolina-1 en los dominios de la membrana plasmática (lipid raft y no-raft) de testículos de ratones HSL +/+ y HSL -/-	95
9.2. Análisis de la distribución y expresión de los receptores scavenger clase B en los dominios de la membrana de los testículos de ratones HSL +/+ y HSL-/-....	96
9.3. Efecto de la ausencia de HSL sobre la composición de esteroides en los dominios de la membrana plasmática de los testículos de ratones	98
10. Estudio de la expresión diferencial de genes mediante la técnica de <i>microarray</i>	100
11. Estudio de la expresión génica de las enzimas implicadas en el metabolismo de los ácidos grasos en los testículos de los ratones HSL +/+ y HSL -/-	104
12. Estudio de la composición de ácidos grasos en el testículo ratones HSL +/+ y HSL -/-	105
13. Estudio de la composición de ácidos grasos en el plasma ratones HSL +/+ y HSL -/-	108
14. Estudio de la composición de plasmalógenos en el testículo de ratones HSL +/+ y HSL -/-	110
Discusión	113
Papel de la HSL en la fisiología testicular	116
Papel de la HSL en la composición en esteroides y ácidos grasos del testículo	119
Papel de la HSL en los microdominios de membrana plasmática	126
Conclusiones	131
Bibliografía	135

Abreviaturas

Abreviaturas

7DHC: 7-deshidrocolesterol

Aal: espermatogonia A alineada

ABCA1: *ATP-binding cassette transporter A1*

ACTH: hormona adenocorticotrópica

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADNc: ácido desoxirribonucleico copia

AG: ácidos grasos

AGCL: ácidos grasos de cadena muy larga

AGM: ácidos grasos monoinsaturados

AGP o PUFA: ácidos grasos poliinsaturados

AGS: ácidos grasos saturados

AMPc: adenosín monofosfato cíclico

Apr: espermatogonia A pareada

ARNm: ácido ribonucleico mensajero

As: espermatogonia A sencilla o sola

Asp: asparragina

ATGL: triglicérido lipasa de adipocitos

ATP: adenosil trifosfato

BCA: ácido bicinconínico

BCIP: *5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl Phosphate*, Bio-Rad

BHT: 2[6] di-tert-butil p-cresol [butilato hidroxitolueno

BTB: barrera protectora sangre-testículo

CD36: receptor de trombospondina y colágeno tipo I

CE: colesterol ester hidrolasa

CG/EM: cromatografía de gases/espectrofotometría de masas

CLA-1: análogo-1 de CD36 y LIMPII

CRE: elementos de respuesta a AMPc

CTTM: dominio transmembrana C-terminal

Cyp11a1: citocromo P450 11a1

Cyp17a1: citocromo P450 17a1

DMF: N, N-dimetilformamida

dpc: días post coito

DRM: membranas resistentes a detergentes

ELOVL: enzima elongasa de ácidos grasos

ERK: proteína quinasa de señalización extracelular (*extracellular signal-regulated kinase*)

FADS2: $\Delta 6$ desaturasa, ácido graso desaturasa 2.

FAMEs: ester metil ácidos grasos

FF-MAS: *follicular fluid meiosis activating sterol*

FSH: hormona estimulante del folículo

FXR: *farnesoid X receptor*

GDNF: *Glial-Derived Neurotrophic Factor*

GnRH: hormona liberadora de gonadotropinas

HDL: lipoproteínas de alta densidad (*high density lipoprotein*)

His: histidina

HMG-CoA: hidroximetilglutaril coenzima A

HRP: *HorseRadish Peroxidase*

HSL: lipasa sensible a las hormonas

IDL: lipoproteínas de densidad intermedia (*intermediate density lipoprotein*)

IUPAC: *the International Union of Pure and Applied Chemistry*

KO: *knockout*

LDL: lipoproteínas de baja densidad (*low density lipoprotein*)

LH: hormona luteneizante

LIMP2: proteína lisosomal integral de membrana II

LPL: lipoproteína lipasa

LXRs: Receptores X del hígado (*liver X receptors*)

MAG: monoacilglicerol hidrolasa

MAPK: proteína quinasa activada por mitógeno

MGL: monoglicérido lipasa

miARN: microARN

NBT: *NitroBlue Tetrazolium*

NEFAs: ácidos grasos no esterificados

PDE: enzima fosfodiesterasa

PDZ: *postsynaptic density protein*

PDZK1: *PDZ postsynaptic density protein (PSD-95)/Drosophila discs-large (dlg)/tight-junction protein ZO1.*

PFA: paraformaldehído

PGC: células germinales primordiales

PI3K/Akt: fosfoinositol 3 fosfato kinasa/proteína kinasa

PKA: proteína quinasa A dependiente de AMPc

PPAR: *peroxisome proliferator-activated receptor*

RE: retículo endoplásmico

- R-LDL:** receptor de lipoproteínas de baja densidad
- S1P:** precursor de la esfingosina
- SCAP:** *Sterol Response Elements Binding Proteins Cleavage Activating Protein*
- SCD-1 o Δ^5 D:** Δ^5 desaturasas
- SCD-2 o Δ^6 D:** Δ^6 desaturasas
- SCP3:** complejo de sinaptonema de la proteína 3
- Ser:** serina
- SIM:** monitorización selectiva de iones (*Selective Ion Monitoring*)
- SR:** receptores *scavenger*
- SR-BI:** receptor *scavenger* clase B tipo I
- SR-BII:** receptor *scavenger* clase B tipo II
- SRE:** *Sterol response element* (elemento de respuesta a esteroides)
- SREBPs:** *Sterol Response Elements Binding Proteins*
- SSCs:** células madre de las espermatogonias
- SSD:** *Sterol Sensing Domain*
- StAR, Star:** proteína reguladora aguda de la esteroidogénesis
- TA:** temperatura ambiente
- TBS:** *Tris buffer saline*
- T-MAS:** *testicle meiosis activating sterol*
- VLDL:** lipoproteínas de muy baja densidad (*very low density lipoprotein*)
- WT:** *Wildtype*
- Δ^9 D o SCD:** Δ^9 desaturasa o esteroil CoA desaturasa

Summary/Resumen

Summary

Spermatogenesis occurs in a series of proliferation and differentiation stages. There is a tight relationship between fertility and changes in cholesterol and lipids metabolism during spermatogenesis. Cholesterol is required for steroidogenesis and spermatogenesis, and is essential for germ cell development and fertility. Leydig cells require a continuous supply of cholesterol as a precursor for the synthesis of steroid hormones, while in the seminiferous tubules, cholesterol is involved in the proliferation and differentiation of germ cells to spermatozoa.

In testis, *scavenger* receptor class B (SR-B) mediates selective uptake of cholesterol esters from HDL, which are hydrolyzed to unesterified cholesterol by hormone sensitive lipase (HSL). HSL is an intracellular neutral lipase that hydrolyzes triacylglycerols, diacylglycerols, monoacylglycerols, cholesteryl esters and retinyl esters. In mice, HSL deficiency results in male sterility caused by a major defect in spermatogenesis. In the present study we found that HSL *knockout* (HSL *-/-*) mice testis presented altered spermatogenesis associated with decreased sperm counts, sperm motility and infertility. Defects included multinucleation of spermatides, abnormal shapes and reduced elongating spermatids. Many epithelial cells in the seminiferous tubules were vacuolated and the amount of Leydig cells was increased. In *Wildtype* (HSL *+/+*) testis, HSL is expressed in elongating spermatides; SR-BI in Leydig cells and spermatides; SR-BII is expressed in spermatocytes and spermatides but not in Leydig; and LIMPII is present in both Sertoli and Leydig cells. The lack of HSL induced augmented expression of SR-BI, SR-BII and LIMPII in mice testis, this allows an increased uptake of cholesterol esters from HDL mediated by these receptors, and prevents their hydrolysis to free cholesterol, which facilitates the accumulation of cholesterol esters in the epithelial cells of the testis and limits the availability of free cholesterol required for steroidogenesis and spermatogenesis in the mice testis. The lack of HSL also induces an activation of several intracellular signaling pathways mediated by class B *scavenger* receptor such as ERK, AKT and SRC, important in the processes of differentiation and cell proliferation during spermatogenesis.

HSL is a key enzyme in the mobilization of cholesterol esters and fatty acids from intracellular stores. In our study we found that the lack of HSL results in a change in the composition of sterols in the testis, an increase of total cholesterol and FF-MAS, a LXR (liver X receptor) ligands.

The testes contain high concentrations of polyunsaturated fatty acids (PUFAs) and specific PUFA are essential for spermatogenesis. We determined the fatty acid composition and the mRNA levels of key enzymes involved in fatty acid metabolism in testis of HSL *-/-* mice. HSL deficiency altered fatty acid composition in the testis but not in plasma; a decrease in the essential n-6 PUFA linoleic acid and the n-3 PUFA linolenic acid, and an increase in the corresponding synthesis intermediates C22:4n-6 and C22:5n-3 without changes in docosapentaenoic or docosahexaenoic acids. Mead acid, which has been associated with an essential fatty acid deficit leading to male infertility, was increased in the testis from HSL *-/-* mice. Moreover, the expression of SCD-1, FADS1, and

FADS2 was increased while expression of ELOVL2, an essential enzyme for the formation of very-long PUFAs in testis, was decreased. It is suggested that the changes in fatty acid metabolism observed in testes from HSL $-/-$ male mice contribute the infertility of these animals.

Lipid raft are cholesterol-rich membrane domains and constitute major platforms for initiation, propagation and maintenance of signal transduction events, and are involved in cholesterol traffic. Ours results show that the absence of HSL in the testes of mice alters the structure of plasma membrane microdomains, *lipid raft*. Caveolin-1, a *lipid raft* associated protein, was shifted to *non-raft* fractions in membranes from HSL $-/-$ testis. This redistribution of caveolin-1 from *lipid rafts* to denser membrane domains (*non-raft*) indicated a disruption of *lipid rafts*. Moreover, SR-BI and SR-BII are anchored to plasma membrane *lipid rafts*. The lack of HSL results in an increase of expression SR-BI in plasma membrane domains, *lipid raft* and *non-raft* in testis. The sterols membrane domains composition also is altered: desmosterol content decreases in the *lipid raft* domain, while in *non-raft*, cholesterol and T-MAS increase in testis of HSL $-/-$. These changes confirm the alteration of plasma membrane domains, *lipid raft* and *non-raft*.

Resumen

La espermatogénesis se desarrolla en una serie de etapas de proliferación y diferenciación celular. Existe una estrecha relación entre la fertilidad, los cambios en el colesterol y el metabolismo de los lípidos que ocurren durante la espermatogénesis. La esteroidogénesis y la espermatogénesis requieren un aporte de colesterol que es esencial para el correcto desarrollo de las células germinales. Las células de Leydig requieren un aporte continuo de colesterol que actúa como precursor de la síntesis de las hormonas esteroideas, mientras que, en los túbulos seminíferos, el colesterol está implicado en la diferenciación de las células germinales a espermatozoides.

En el testículo, los receptores *scavenger* de clase B (SR-B) median la captación selectiva de ésteres de colesterol de las HDL, las cuales son hidrolizadas a colesterol no esterificado por acción de la lipasa sensible a hormonas (HSL). La HSL es una lipasa neutra intracelular que hidroliza triacilgliceroles, diacilgliceroles, monoacilgliceroles, ésteres de colesterol y de retinol. En los ratones, la deficiencia en la HSL tiene como resultado la esterilidad masculina causada principalmente por una alteración de la espermatogénesis. En el presente trabajo hemos visto que los testículos de los ratones *knockout* (HSL -/-) tienen alteraciones en la espermatogénesis que van asociadas con un descenso en la cantidad de espermatozoides, un defecto en la motilidad de los mismos e infertilidad. Las alteraciones morfológicas incluyen espermátidas multinucleadas, y la disminución y formaciones anormales de las espermátidas elongadas. Además, en los túbulos seminíferos hay muchas células epiteliales que contienen numerosas vacuolas y la cantidad de células de Leydig está aumentada. En los testículos de los ratones *wildtype* (HSL +/+) la HSL se expresa en las espermátidas elongadas; SR-BI se expresa en las células de Leydig y en las espermátides, SR-BII se expresa en los espermatoцитos y en las espermátidas pero no en las células de Leydig; y LIMPII está presente en ambos tipos celulares, Sertoli y Leydig. La ausencia de la HSL induce a un aumento de la expresión de SR-BI, SR-BII y LIMPII en el testículo de ratón, lo que permite una mayor captación de ésteres de colesterol de las HDL mediada por estos receptores, éstos se acumulan en las células epiteliales del testículo, donde la disponibilidad de colesterol libre necesario para la esteroidogénesis y la espermatogénesis está limitada. La pérdida de la HSL también induce la activación de varias rutas de señalización intracelulares mediadas por los receptores *scavenger* de clase B tales como ERK, AKT y SRC, rutas importantes en el proceso de diferenciación y proliferación celular durante la espermatogénesis.

La HSL es una enzima clave en la movilización de ésteres de colesterol y ácidos grasos desde los depósitos intracelulares. En nuestro estudio hemos visto que la ausencia de la HSL provoca un cambio en la composición de esteroides del testículo y un aumento del colesterol total y del FF-MAS, un ligando de LXR.

Los testículos contienen elevadas concentraciones de ácidos grasos poliinsaturados (AGP) que son necesarios para la espermatogénesis. Nosotros hemos estudiado la composición de ácidos grasos y los niveles de ARNm de enzimas claves del metabolismo de los ácidos grasos en los testículos de ratones HSL -/-. La carencia de la HSL produce una alteración de la composición de los ácidos grasos en el testículo pero no en plasma; observándose un descenso en los ácidos grasos esenciales ácido linoleico, n-6

AGP, y ácido linolénico, n-3 AGP, y un aumento de sus correspondientes intermediarios C22:4n-6 y C22:5n-3, sin observarse cambios en los ácidos grasos finales, docosapentaenoico y docosahexaenoico. El *Mead acid* que está asociado con la deficiencia de ácidos grasos esenciales que conlleva infertilidad masculina, está aumentado en los testículos de los ratones HSL *-/-*. Además, la expresión de SCD-1, FADS1 y FADS2 estaba aumentada, mientras que, la expresión de ELOVL2, una enzima esencial para la formación de los AGP de cadena muy larga en el testículo, experimentó un descenso. Posiblemente los cambios del metabolismo de los ácidos grasos observados en el testículo de los ratones macho HSL *-/-* contribuya a la infertilidad de estos animales.

Los *lipid raft* son microdominios de membrana ricos en colesterol que constituyen una de las principales plataformas para la iniciación, propagación y mantenimiento de los mecanismos de transducción de señales, y están implicados en el tráfico de colesterol. Nuestros resultados ponen de manifiesto que la ausencia de la HSL en los testículos de los ratones altera la estructura de los microdominios de membrana *lipid raft*. La caveolina-1, una proteína asociada a los *lipid raft*, estaba desplazada hacia fracciones *non-raft* en las membranas de los testículos de los ratones HSL *-/-*. La redistribución de caveolina-1 desde los *lipid rafts* hacia dominios densos de membrana (*no-raft*) indica una alteración de los *lipid rafts*. Además la carencia de la HSL conlleva un aumento de la expresión de SR-BI en los microdominios de membrana plasmática tanto *lipid rafts* como *non-raft*, en el testículo. La composición de esteroides de los microdominios de membrana plasmática está alterada. Nosotros hemos hallado un descenso del desmosterol en los dominios *lipid raft*; mientras que, en los *no-raft*, el colesterol y el T-MAS están aumentados en los testículos de los ratones HSL *-/-*. Estos cambios confirman las alteraciones de los microdominios de membrana plasmática, *lipid raft* y *no-raft* en los testículos de los ratones carentes de HSL.

Introducción

Introducción

1. EL TESTÍCULO

1.1. Anatomía e histología

En el embrión los testículos se desarrollan a partir de las gónadas que están indiferenciadas en el abdomen, desde donde emigran, y durante la vida extrauterina se hallan contenidos en el escroto. La pared del escroto tiene una gran superficie que le permite que su contenido se mantenga a la temperatura adecuada, para que en los testículos se puedan producir las células germinales, proceso que se conoce como espermatogénesis y en el que entraremos en detalle más adelante.

Los testículos tienen doble función, por un lado la de producir células germinales, y por otro la de sintetizar y segregar hormonas sexuales masculinas. Las células germinales masculinas se denominan *espermatozoos* o espermatozoides y el nombre genérico para las hormonas masculinas es andrógenos.

Cada testículo es un cuerpo ovoide cubierto por una cápsula gruesa, denominada albugínea, muy rica en tejido fibroso blando. En el borde posterior de cada testículo, la cápsula está engrosada considerablemente y penetra en la sustancia de la glándula para formar un tabique vertical incompleto denominado mediastino. Éste está lleno de conductos revestidos de epitelio que constituyen el denominado *rete testis*. Todos los túbulos seminíferos del testículo vacían en los espacios del *rete* (Ham & Lesson 1963).

En los testículos podemos hablar de dos partes funcionales importantes, por un lado se encuentran los túbulos seminíferos (Ham & Lesson 1963) donde se localizan las **células germinales** que migrarán desde el lado adluminal del epitelio del túbulo hacia la luz del mismo, desarrollándose en espermatogonias, espermatocitos, espermátidas y espermatozoides; este proceso de desarrollo de los gametos masculinos es la espermatogénesis (Ross & Pawlina 2006), y las **células de Sertoli**, que se sitúan formando parte del epitelio del túbulo y aportan nutrientes y otras moléculas necesarias para la proliferación y diferenciación de las células germinales. Estas células secretan inhibina (Skinner *et al.* 1989), que es un péptido inhibidor de la síntesis y secreción de la hormona estimulante del folículo, FSH (Zonneveld *et al.* 2003), hormona que, como veremos más adelante (apartado 1.2.3.), participa en el proceso de la espermatogénesis. El segundo componente funcional de los testículos está formado por las células intersticiales que se hallan en el tejido conectivo que existe entre los túbulos seminíferos (Ham & Lesson 1963). Entre las células intersticiales encontramos **células de Leydig**, que sintetizan y secretan testosterona y otros andrógenos, necesarios para el correcto desarrollo sexual masculino, tanto para la espermatogénesis como para el desarrollo de los caracteres sexuales secundarios (pelo facial, conducta sexual y libido), células de Leydig inmaduras, macrófagos intersticiales y células epiteliales (ver figura1).

Es importante destacar que en los testículos se requiere un aporte constante de colesterol. Éste, en las células de Leydig, es el precursor para la síntesis de las hormonas esteroideas (esteroidogénesis); mientras que en los túbulos seminíferos, es necesario para

la proliferación y diferenciación de las células germinales a espermatozoides (espermatogénesis o gametogénesis) (Kabbaj *et al.* 2003).

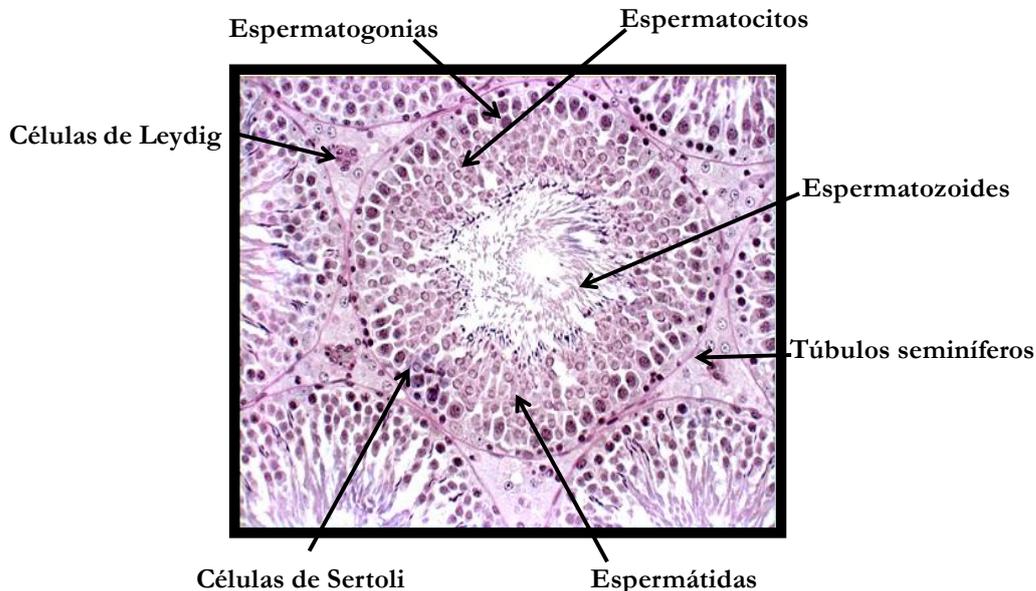


Figura 1. Corte histológico del testículo de ratón.

1.2. Hormonas esteroideas

Las hormonas esteroideas juegan un papel regulador crítico en algunos aspectos de la fisiología de los mamíferos entre los que se incluyen los mecanismos de respuesta al estrés, el desarrollo de caracteres sexuales secundarios, el control del ciclo menstrual y la espermatogénesis (Eacker *et al.* 2008). Existen cinco clases principales de hormonas esteroideas: testosterona (andrógenos), estradiol (estrógenos), progesterona (progestinas), cortisol/corticoesterona (glucocorticoides) y aldosterona (mineralocorticoides). La testosterona y su metabolito más potente la dihidrotestosterona, la progesterona y el estradiol se clasifican como esteroides sexuales, mientras que el cortisol/corticoesterona y la aldosterona pertenecen a los corticoesteroides (Payne & Hales 2004, Pikuleva 2006, Miller 2008). La glándula adrenal sintetiza tanto corticoesteroides como andrógenos (deshidroepiandrosterona y androstendiona); la aldosterona se genera principalmente en las células de la capa glomerulosa, mientras que el cortisol/corticoesterona se produce en las células adrenocorticales de la zona fasciculada y la deshidroepiandrosterona así como la androstendiona se sintetizan en las células de la capa reticular. En el ovario, las células de la granulosa sintetizan principalmente progesterona (y su metabolito 20α -hidroxiprogesterona) y estradiol; las células de la *theca* secretan principalmente andrógenos y las células luteales progesterona (y su metabolito 20α -hidroxiprogesterona), mientras en el testículo las células de Leydig son las encargadas de sintetizar testosterona (Holm *et al.* 1988, Stocco & Clark 1996, Azhar & Reaven 2002, Payne & Hales 2004) La progesterona se sintetiza también en el

cuerpo lúteo durante las primeras 6-8 semanas de gestación, pero durante el embarazo la principal fuente de progesterona es la placenta (Conley & Mason 1990, Strauss *et al.* 1996). En cerebro también sintetizan esteroides *de novo* a partir de colesterol a través de mecanismos que son, al menos en parte, independientes de las células esteroideogénicas periféricas, éstos se conocen como neuroesteroides (Mellon & Vaudry 2001, Tsutsui 2008, Do Rego *et al.* 2009).

1.2.1. Biosíntesis de las hormonas esteroideas

Todas las hormonas esteroideas derivan del colesterol, éste se modifica por la adición de diversos grupos funcionales, como carbonilos e hidroxilos o cadenas hidrocarbonadas. Las hormonas esteroideas utilizan la misma numeración atómica que el colesterol. La conversión del colesterol, C₂₇, a las hormonas esteroideas de 18-, 19- y 21-carbonos consiste en la degradación irreversible del residuo del carbono-6 del colesterol que además establece la velocidad de reacción para producir pregnenolona (C₂₁). Los esteroides C₂₁ se conocen como pregnanos, mientras que, los C₁₉ y C₁₈, se conocen como androstanos y estranos, respectivamente (Holm *et al.* 1988, Miller 2008).

Aunque el esteroide final sintetizado difiere según el tipo celular, el primer paso de la reacción de biosíntesis de hormonas esteroideas es el mismo y consiste en la conversión de colesterol a pregnenolona, un esteroide de 21 carbonos (ver figura 2). Este paso determina la velocidad de la biosíntesis de esteroides y está altamente regulado (Dorfman *et al.* 1957). El sistema enzimático que lo cataliza se conoce como la enzima de degradación con una cadena lateral ligada al P450 (P450_{ssc} [*P450 cholesterol side-chain cleavage*] ó CYP11A1) o también llamada desmolasa. P450 es un complejo enzimático compuesto por una flavoproteína (NADH [nicotinamida adenina dinucleótido]-adrenodoxina reductasa), una ferredoxina (adrenodoxina) y un citocromo P450 que se localiza en la membrana interna de la mitocondria (Holm *et al.* 1988, Miller 2008). P450 cataliza tres reacciones diferentes: 20 α -hidroxilación, 22-hidroxilación y la escisión de la cadena lateral de colesterol convirtiéndolo en pregnenolona (Holm *et al.* 1988, Miller 2008). La conversión del colesterol a pregnenolona es el paso limitante de la biosíntesis de esteroides. La naturaleza limitante de este paso no es debida a la actividad de la P450 en sí misma, sino a la limitación del acceso del colesterol al lugar de unión de dicha enzima, por ejemplo la liberación del sustrato colesterol desde la cara externa hacia la interna de la membrana mitocondrial, donde se localiza P450 (Davis *et al.* 1968, Simpson *et al.* 1978, Toaff 1979, Sheriff 1980, Mori & Marsh 1982, Privalle *et al.* 1983).

La pregnenolona formada en el paso limitante pasa después al retículo endoplásmico (RE) y a la mitocondria donde sufre posteriores modificaciones (Payne & Hales 2004, Pikuleva 2006, Sanderson 2006, Miller 2008). Primero es convertida a progesterona por mediación de la enzima isomerasa Δ^5 -3 β hidroxiesteroide deshidrogenasa (3- β HSD), la cual también participa en el mantenimiento de la producción de los principales esteroides de las células esteroideogénicas del ovario. En la zona fasciculada de las células del córtex adrenal, la progesterona es hidrolizada a 17 α -hidroxiprogesterona que después es metabolizada a 11-deoxicortisol (o

deoxicorticosterona) (Figura 2). Y por último, en la mitocondria, se produce la conversión del 11-deoxicortisol (deoxicorticosterona) a cortisol, o corticoesterona en roedores. Los dos pasos siguientes en la síntesis de aldosterona están catalizados por la aldosterona sintasa (CYP11B2), la cual convierte la 11-deoxicorticosterona en corticoesterona y, posteriormente, en aldosterona. En el testículo, concretamente en las células de Leydig, la pregnenolona es transformada a testosterona por dos rutas conocidas como las rutas Δ^4 y Δ^5 (Figura 2). La actividad relativa de estas dos rutas varía según la especie (Payne & Hales 2004). La Δ^4 implica la conversión secuencial de pregnenolona a progesterona, de ahí a 17α -hidroxiprogesterona, a androstendiona y finalmente testosterona, mientras en la ruta Δ^5 la pregnenolona es convertida a 17α -hidroxipregnenolona, a deshidroepiandrosterona y a testosterona ambas a través de androstendiol o androstendiona. En el ovario la testosterona es metabolizada a estradiol (ver figura 2) (Al-Jarallah & Trigatti 2010).

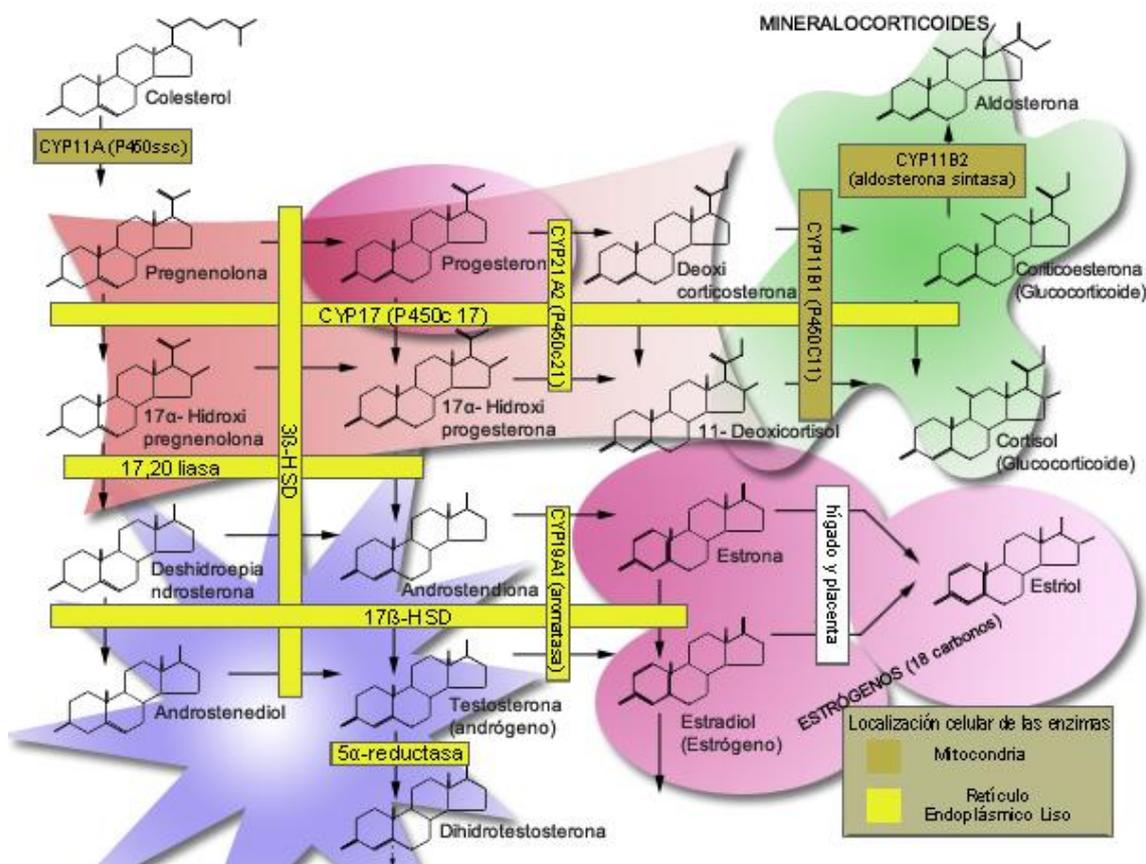


Figura 2. Esquema de la biosíntesis de hormonas esteroideas a partir de colesterol. Adaptado de (Al-Jarallah & Trigatti 2010).

1.2.2. Regulación de la biosíntesis de las hormonas esteroideas

La tasa de esteroidogénesis o producción de hormonas esteroideas está controlada por hormonas tróficas (hormona luteneizante [LH], FSH, hormona adenocorticotrópica [ACTH]) (Marsh 1976, Sanborn *et al.* 1980, Simpson & Waterman 1983, Strauss *et al.* 1988, Waterman & Keeney 1996, Kierszenbaum & Tres 2004). El tipo de hormona esteroidea

que se sintetiza en una clase particular de célula viene determinado por el complemento peptídico del receptor de la hormona, por la respuesta a la estimulación hormonal y por la expresión génica de las enzimas que intervienen en la esteroidogénesis. Así, la ACTH estimula el cortisol/corticoesterona en las células adrenocorticales, la angiotensina II y el potasio regulan la síntesis de aldosterona en las células adrenales, la FSH regula la síntesis de progesterona y estrógenos en las células del ovario, mientras que la LH regula la síntesis de progesterona en las células lúteas del ovario, la producción de andrógenos en las células theca-intersticiales del ovario y la síntesis de testosterona en las células de Leydig (Al-Jarallah & Trigatti 2010). Las glándulas adrenales son también las encargadas de sintetizar andrógenos adrenales (McKenna *et al.* 1997, Miller 2002). Las hormonas tróficas como la LH, la FSH o la ACTH inducen esteroidogénesis adrenocortical y gonadal mediante su unión a receptores acoplados a proteínas G, esta unión tiene como consecuencia la activación de la adenilato ciclase, la cual genera adenosín monofosfato cíclico (AMPc) que activa la proteína quinasa dependiente de AMPc (PKA) (Marsh 1976, Sanborn *et al.* 1980, Simpson & Waterman 1983, Strauss *et al.* 1988, Waterman & Keeney 1996). La estimulación de la cascada de señalización AMPc-PKA tiene un efecto tanto crónico como agudo en la regulación de la producción de hormonas esteroideas. La respuesta aguda de la esteroidogénesis, la cual transcurre en el orden de minutos, se caracteriza por la rápida movilización de gotas lipídicas que almacenan ésteres de colesterol y por el incremento de la liberación de colesterol mediante la enzima P450 mitocondrial seguida de una rápida síntesis de nuevos esteroides. La regulación crónica, o a largo plazo, de la esteroidogénesis consiste en la elevación de la transcripción de genes que codifican enzimas que participan en la esteroidogénesis, lo que resulta en un aumento de la capacidad de sintetizar de las células (Simpson & Waterman 1988, Moore & Miller 1991, Lauber *et al.* 1993, Parker & McConnell 1995, Payne & Youngblood 1995).

1.2.3. Eje hipotalámico-pituitario-gonadal

Es un sistema de regulación por retroalimentación, en el que la liberación de hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) del hipotálamo estimula a la glándula pituitaria para sintetizar y liberar LH (Figura 3) (Tilbrook & Clarke 2001). La LH, secretada por la glándula pituitaria, se une al receptor LH/gonadotropina coriónica (CG) acoplado a proteínas G, y que se localiza en la superficie de las células de Leydig (Dufau *et al.* 1997). La activación de éste receptor estimula la síntesis de testosterona en las células de Leydig, ya que se produce un aumento de la concentración de AMPc dando como resultado el aumento de la producción de las proteínas necesarias para la esteroidogénesis. La testosterona, a su vez, reduce la síntesis de LH en la glándula pituitaria por represión directa de la subunidad β de LH (Figura 3) (Jorgensen & Nilson 2001). Muchos estudios sugieren también que la testosterona puede regular la liberación de GnRH del hipotálamo, señal que, como dijimos anteriormente, estimula a la glándula pituitaria para sintetizar y liberar LH (Tilbrook & Clarke 2001).

La síntesis de FSH está estimulada también por la GnRH (Figura 3). La FSH actúa sobre las células de Sertoli aumentando la producción de proteínas que se unen a los

andrógenos, induce a las células de Sertoli para que secreten inhibina, y estimula la formación de uniones estrechas Sertoli-Sertoli.

La inhibina, sintetizada en las células de Sertoli, y la testosterona, en las de Leydig, regulan a su vez esta secreción de gonadotropinas; la inhibina disminuye la secreción de FSH y la testosterona controla la producción de LH (ver figura 3) (Tilbrook & Clarke 2001).

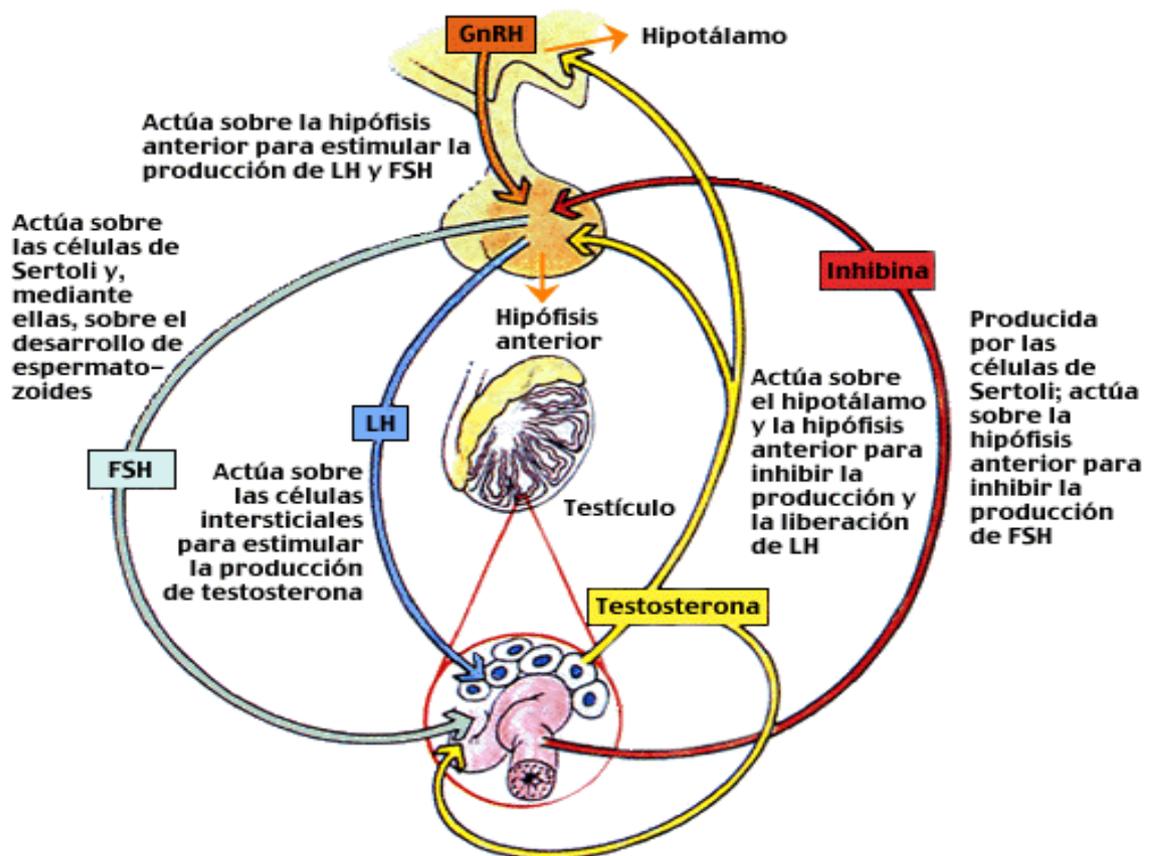


Figura 3. Diagrama del eje hipotálamo-pituitaria-gonadal en el ser humano. Abreviaturas, FSH: hormona estimulante del folículo, LH: hormona lutinizante, GNRH: hormona liberadora de gonadotropinas.

La transcripción de genes que codifican para proteínas como la proteína reguladora aguda de la esteroidogénesis (StAR), el citocromo P450 11a1 (Cyp11a1) y el citocromo P450 17a1 (Cyp17a1), que están implicadas en la esteroidogénesis, se estimula por acción del AMPc (Clark *et al.* 1994, Clark *et al.* 1996, Payne & Hales 2004); y la síntesis de testosterona, están regulados por este sistema de retroalimentación negativa, es decir, la testosterona misma es la que reprime la transcripción de estos genes implicados en la esteroidogénesis (Hales *et al.* 1987, Burgos-Trinidad *et al.* 1997).

1.3. Espermatogénesis

La espermatogénesis es el mecanismo encargado de la producción de espermatozoides o gametos masculinos. El desarrollo del linaje espermatogénico es un proceso complejo que se produce de una manera ordenada y se denomina el ciclo de espermatogénesis (Clermont 1972), el cual se divide en un número de fases, o asociaciones de células, específico de cada especie, es decir, 12 etapas en el ratón (Oakberg 1956), 14 etapas en la rata (Leblond *et al.* 1952) y 6 etapas en los monos (Clermont & Leblond 1959). La duración de cada etapa tiene un tiempo específico, y por lo tanto completar el ciclo espermatogénico requiere alrededor de 8.6 días en el ratón (Oakberg 1956), y 12.8 días en la rata (Hilscher *et al.* 1969).

Éste desarrollo espermatogénico sincronizado puede venir facilitado por una citocinesis incompleta durante las divisiones mitóticas que dan lugar al mantenimiento de los puentes de citoplasma entre las células germinales. Las proteínas y el ARNm (ácido ribonucleico mensajero) se intercambian a través de estos puentes citoplasmáticos ayudando a coordinar el desarrollo sincronizado de las copias de células germinales (Braun *et al.* 1989). Cada etapa se caracteriza por una combinación de los tipos de espermatogonias, espermaticitos y espermátidas que se producen de forma sincrónica en el proceso espermatogénico (Phillips *et al.* 2010).

La espermatogénesis se desarrolla en las gónadas, aunque la maduración final de los espermatozoides se produce en el epidídimo. Este proceso tiene una duración aproximada de 64 a 75 días en la especie humana y consta de 3 fases o etapas: fase proliferativa, meiosis o espermaticitogénesis y espermiogénesis (Herme *et al.*, 2010).

1.3.1. Origen de las células madre de espermatogonias

Las células madre de las espermatogonias (SSCs) son la base de la espermatogénesis y de la fertilidad masculina (Phillips *et al.* 2010). Como otras células madre específicas de otros tejidos, las células madre de espermatogonia son raras, y representan sólo un 0.03% de todas las células germinales en los testículos de roedores (Tegelenbosch & de Rooij 1993). Las SSCs aumentan en número gracias a la diferenciación de las espermatogonias a espermaticitos, estos a espermátidas y, por último, a espermatozoides; por lo tanto se caracterizan, como todas las otras células madre, por su capacidad de auto-renovación mediante divisiones y por su diferenciación a otras células (Phillips *et al.* 2010).

Las SSCs derivan de los gonocitos en los testículos después del parto, los cuales a su vez provienen de las células germinales primordiales (PGC) durante el desarrollo fetal. Las PGCs son una población transitoria de células que en ratones, durante la formación del alantoides (8.5 y 12.5 días post coito (dpc)) son arrastradas pasivamente fuera del embrión, antes de que inicien la migración a través del intestino posterior y lleguen a la gónada indiferenciada. Las PGCs se replican durante la fase migratoria y,

aproximadamente, unas 3000 colonizan las crestas genitales (Bendel-Stenzel *et al.* 1998). En la gónada masculina alrededor del día 13.5 dpc, las PGCs dan lugar a los gonocitos, que están cerca de los cordones testiculares formados por células precursoras de Sertoli y células mioides peritubulares.

El gonocito es un término general que se clasifica en tres categorías: proespermatogonia en mitosis, M-proespermatogonia y T1 y T2-proespermatogonias (McCarrey 1993). Las M-proespermatogonias se localizan en el centro de los cordones testiculares, lejos de la membrana basal, y siguen proliferando hasta aproximadamente el 16.5 dpc de desarrollo del ratón cuando son convertidas en T1-proespermatogonia y se detienen en la fase G0 de la mitosis (McCarrey 1993, Tohonon *et al.* 2003). Los gonocitos reanudan la proliferación durante la primera semana después del nacimiento (lo que marca su transición a T2-proespermatogonia) de forma concomitante con la migración hacia la membrana basal de los túbulos seminíferos (Clermont & Perey 1957). Las T2-proespermatogonias colonizan la membrana basal y dan lugar a la primera ronda de espermatogénesis; además, establecen el grupo inicial de SSCs que se mantienen a lo largo de las espermatogénesis postpuberales el resto de la vida (Kluin & de Rooij 1981, McCarrey 1993, Yoshida *et al.* 2006).

1.3.2. Desarrollo del linaje espermatogénico

Las espermatogonias son células germinales primordiales diploides que se sitúan en la membrana basal de los túbulos seminíferos. Hay tres tipos de espermatogonias que fueron descritas basándose en su morfología nuclear (Roosen-Runge & Giesel 1950, Clermont & Leblond 1953, Monesi 1962). Las **espermatogonias de tipo A**, se consideran el tipo más primitivo porque carecen de heterocromatina en el núcleo, una característica general de células indiferenciadas; las **espermatogonias intermedias**, cuyos núcleos contienen una pequeña cantidad de heterocromatina; y el último tipo son las **espermatogonias de tipo B**, que contienen una gran cantidad de heterocromatina, lo que indica un mayor estado de diferenciación. A su vez, las espermatogonias de tipo A se pueden subdividir en espermatogonias A sencilla o sola (As), A pareada (Apr) y A alineada (Aal), que difieren sólo en su disposición topográfica en la membrana basal del túbulo seminífero. Cuando una espermatogonia As se divide produce una Apr que completa la citocinesis para producir dos nuevas A (divisiones de auto-renovación); o bien, no completa la citocinesis y se mantienen conectadas por puentes citoplasmáticos intercelulares produciendo una cadena de cuatro espermatogonias Aal en la siguiente división (diferenciación de la división). Posteriores divisiones pueden conducir a la formación de cadenas de 8, 16 y 32 veces espermatogonias Aal. Cadenas de 4-16 Aal se consideran, en general, comprometidas con el proceso de diferenciación. Así, el grupo de células madre incluye por lo menos algunas espermatogonias Apr (Yoshida *et al.* 2007, Morimoto *et al.* 2009). Las espermatogonias As, Apr y cadenas pequeñas de cuatro espermatogonias Aal, se distribuyen uniformemente a lo largo del epitelio de los túbulos seminíferos (Huckins 1971, Tegelenbosch & de Rooij 1993). Grandes cadenas de Aal (8, 16 y 32) se diferencian a espermatogonias A1 en las fases IV y VIII del epitelio seminífero (no hay división celular en esta transición) y éstas dan lugar a espermatogonias A2 en la fase

IX. Así, al contrario que las espermatogonias indiferenciadas, las espermatogonias diferenciadas (A1, A2, A3, A4, intermedios y B) se dividen de forma sincronizada y se encuentran en fases específicas del epitelio (Oakberg 1971). Las espermatogonias B dan lugar a espermatocitos primarios, que progresan en la meiosis (ver figura 4). A continuación, dos divisiones meióticas dan lugar a la formación de los espermatocitos secundarios y espermátidas haploides respectivamente, los cuales se someten a 16 pasos de cambios morfológicos para finalmente convertirse en espermatozoides listos para ser liberados desde el epitelio (ver figura 4) (Oakberg 1956).

Un espermatozoide está compuesto de cabeza y cola. La cabeza está formada por el núcleo celular condensado revestido de una fina capa de citoplasma y de membrana celular. En la parte anterior externa hay una capa gruesa, el acrosoma, formado principalmente a partir del aparato de Golgi, éste contiene enzimas similares a las que se encuentran en los lisosomas de las células típicas entre las que se incluyen la hialuronidasa, que digieren filamentos del proteoglicano de los tejidos, y enzimas proteolíticas. La cola del espermatozoide se denomina flagelo y tienen tres componentes principales que son un esqueleto central constituido por 11 microtúbulos, denominados axonema, una fina membrana celular que reviste el axonema y un depósito de mitocondrias que rodea el axonema de la porción proximal de la cola, llamada cuerpo de la cola (Guyton & Hall 1996).

Una alternativa al modelo de de la renovación de las células madre *As* descrito anteriormente, es el modelo A0/A1 (Clermont & Bustos-Obregon 1968, Dym *et al.* 1970, Clermont & Hermo 1975). Brevemente, las espermatogonias A0 se observan como células solas o parejas que están presentes en todas las fases del epitelio seminífero. Las figuras mitóticas rara vez se observan en estas células, por lo que se consideran "las células madre de reserva" que no contribuyen al estado de equilibrio de la espermatogénesis. Estas células madre de reserva sólo se activan cuando la espermatogénesis es destruida por efecto de tóxicos. El pool de "células madre activas" está compuesto por espermatogonias A1-A4. Cuando las espermatogonias A4 se dividen, dan lugar o bien a las nuevas espermatogonias A1 (auto-renovación) o espermatogonias intermedias (diferenciación). Si bien sigue habiendo un vigoroso debate entre los modelos *As* y A0/A1, la mayoría de los investigadores en este campo están a favor del modelo *As* (Phillips *et al.* 2010).

1.3.3. El nicho de las células madre de espermatogonias

Las células SSCs residen en un microambiente especializado llamado "nicho" que regula la homeostasis testicular manteniendo el equilibrio entre la auto-renovación y la diferenciación de las células SSCs. Un nicho de células madre está compuesto de células, componentes de la matriz extracelular, y factores solubles locales presentes en la vecindad de las células madre que regula el destino celular. La base estructural para el nicho de la célula SSC en los testículos de mamíferos está en el compartimiento basal de los túbulos seminíferos que se compone de las células de Sertoli y las células mioideas peritubulares (Dadoune *et al.* 2007). En conjunto, las células de Sertoli y las mioideas peritubulares secretan los componentes a la membrana basal a la que están adheridas las SSCs mediante

las moléculas de adhesión (Tung *et al.* 1984). Las células de Sertoli se polarizan hacia las células epiteliales columnares y dan soporte a las células SSCs y también a las células germinales diferenciadas, proporcionando nutrientes y mediando la señalización externa a fin de apoyar la espermatogénesis (Griswold 1998). La importancia de las células de Sertoli en la diferenciación de las células germinales se demuestra mediante el trasplante de las células de Sertoli normales en los testículos de receptores mutantes infértiles, con un defecto de las células de Sertoli, y por el inicio con éxito de la espermatogénesis que se consigue con dicho trasplante (Kanatsu-Shinohara *et al.* 2003, Kanatsu-Shinohara *et al.* 2005). Además, las estrechas uniones entre las células de Sertoli adyacentes, constituyen una barrera protectora sangre-testículo (BTB), que divide el epitelio seminífero en compartimento basal y adluminal, y juega un papel importante en la regulación de la diferenciación de las células germinales (Cheng *et al.* 2002). La BTB mantiene un flujo selectivo de sustancias entre el fluido luminal, el plasma sanguíneo y el líquido intersticial. Todo ello crea un entorno privilegiado e inmune para las células germinales haploides en el compartimento adluminal de los túbulos seminíferos.

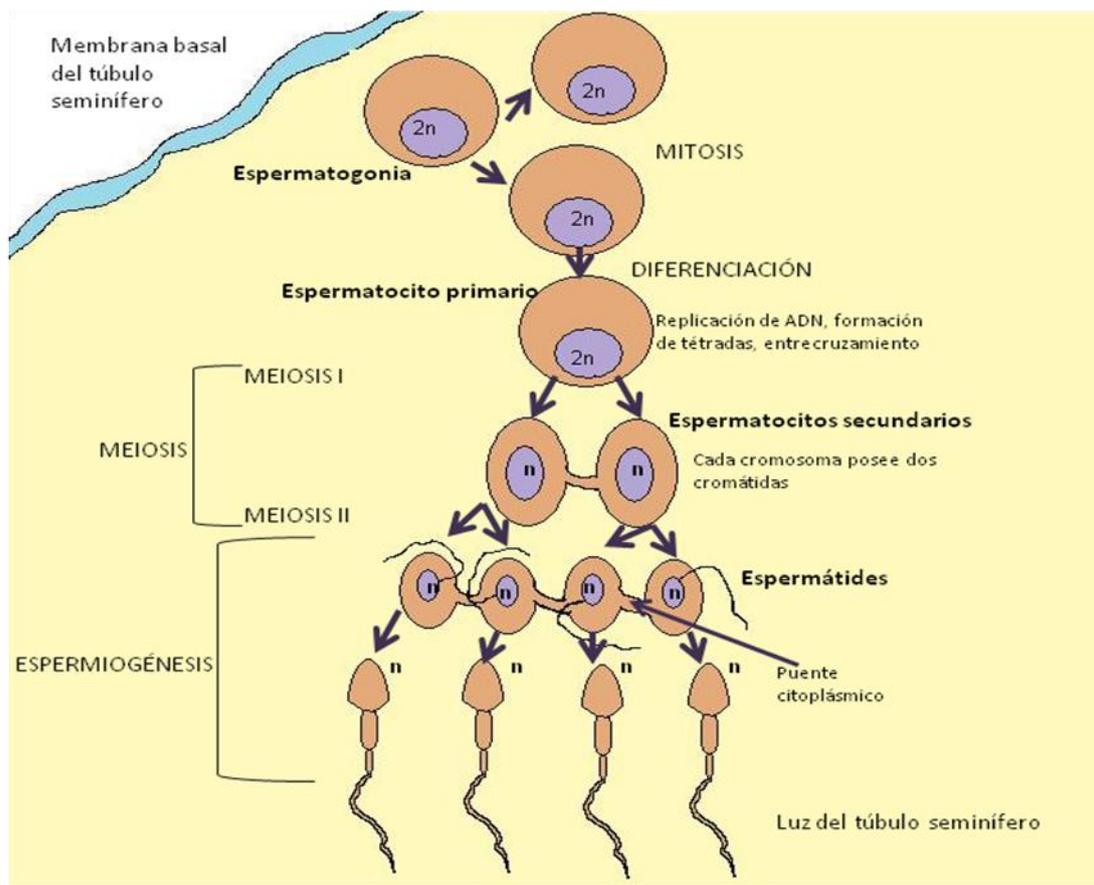


Figura 4. Diagrama esquemático de la espermatogénesis.

A lo largo de la longitud del túbulo, se cree que las SSCs están localizadas en las zonas adyacentes al espacio intersticial (Chiarini-Garcia *et al.* 2003). Las espermatogonias indiferenciadas se observan predominantemente en las áreas del túbulo adyacentes a la vasculatura (Yoshida *et al.* 2007).

El nicho de la SSC media en las señales endocrinas y paracrinas que regulan la auto-renovación y la diferenciación. Un regulador clave del nicho de SSC es GDNF (*Glial-Derived Neurotrophic Factor*), que es secretado por las células de Sertoli y actúa a través del receptor de la tirosina quinasa Ret y el co-receptor GDNF *family-receptor alpha*, que forman un complejo receptor en la superficie de As, Apr y Aal (Meng 2000). Más abajo, las vías de señalización que se activan por GDNF, en las espermatogonias indiferenciadas, son la vía fosfoinositol 3 fosfato kinasa/proteína kinasa B (PI3K/AKT), miembros de la familia SRC quinasa y vía de Ras/ERK_{1/2} (proteína quinasa de señalización extracelular) (Bieri & Prival 1965, Braydich-Stolle *et al.* 2007, Oatley *et al.* 2007). Se piensa que GDNF actúa a través de estas vías para regular la auto-renovación de SSC. La interrupción dirigida de la variante del gen 5 (*Etv5*) resulta en un defecto del mantenimiento del *pool* de SSC, mientras que, la diferenciación de las espermatogonias no aparece afectada por esta mutación (Baranova *et al.* 2005). El factor de transcripción *Etv5* se expresa en las células de Sertoli y la pérdida de *Etv5* parece poner en peligro la capacidad de las células de Sertoli para apoyar a las espermatogonias, posiblemente, por la interrupción de la función de BTB, lo que se indica por la disminución de los niveles de Claudina-5, que intervienen en las uniones celulares estrechas y que se expresa en células endoteliales en los ratones mutantes (Morita *et al.* 1999).

1.3.4. Factores que modulan la espermatogénesis

La espermatogénesis es por lo tanto un proceso de desarrollo en el que acontece la transformación de una célula diploide no diferenciada (célula madre), en una célula claramente diferenciada y haploide, el espermatozoide, todo este proceso está regulado por acción endocrina. Esta diferenciación de células germinales a espermatozoides, que como ya dijimos ocurre en el epitelio de los túbulos seminíferos, depende de un complejo diálogo paracrino entre las células de Sertoli (Skinner *et al.* 1991).

Como ya adelantamos en el capítulo de la esteroidogénesis, la testosterona es secretada en las células de Leydig bajo la influencia de las hormonas secretadas en la glándula pituitaria: las hormonas LH y FSH, que actúan sobre las células de Sertoli estimulando la activación de genes necesarios para que se produzca la secreción de péptidos que promueven la diferenciación de las células germinales. Se cree que la estimulación bioquímica de las células germinales ocurre a través de la secreción de moléculas encargadas de la regulación, como factores de crecimiento o proteasas, a partir de las células de Sertoli (Griswold 1998). FSH ejerce su efecto biológico a través de una proteína G acoplada al receptor de FSH localizado en la membrana plasmática de las células de Sertoli (Simoni *et al.* 1997, Heckert & Griswold 2002). Esta unión de FSH a sus receptores activa al menos cinco rutas de señalización: 1) AMPc y PKA, 2) proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK), 3) calcio, 4) PI3K y 5) fosfolipasa A2 (Walker &

Cheng 2005). Estas rutas activan a una proteína responsable de unión de elementos de respuesta a AMPc (CRE) y como resultado de esto se transcriben los genes necesarios para la espermatogénesis. En cuanto a la testosterona, que como dijimos se sintetiza en las células de Leydig, gracias a la estimulación de las mismas por acción de LH (De Kretser *et al.* 1971, Wahlstrom *et al.* 1983), ejerce sus acciones biológicas a través de los receptores de andrógenos que se localizan en las células de Sertoli (Ruwanpura *et al.* 2010).

La población estable de células germinales está determinada por el balance entre la muerte celular (apoptosis) y la división celular, ambos procesos están influidos por numerosos factores bioquímicos. La gran coordinación necesaria en la espermatogénesis requiere una íntima unión y comunicación funcional entre las células de Sertoli y las células germinales (Kierszenbaum & Tres 2004, Mruk & Cheng 2004, Sluka *et al.* 2006). Por tanto, para que la población de células germinales se mantenga estable, una subpoblación de las espermatogonias sufrirá apoptosis y, aproximadamente la mitad continuará dividiéndose (de Rooij *et al.* 2001).

En la espermatogénesis, las espermatogonias, como ya se ha mencionado, sufren un proceso de mitosis y dos divisiones meióticas, la segunda división meiótica, en la que los espermatocitos secundarios dan lugar a espermátidas haploides, coincide con una oleada de transcripción de genes, algunos de estos, esenciales para la meiosis de los mamíferos como por ejemplo el complejo de sinaptonema de la proteína 3 (SCP3), quinasa dependiente de ciclina, *b-transducin repeat containing protein*, *Moloney murine sarcoma viral oncogene homolog* (Rosenberg *et al.* 1995, Yuan *et al.* 2000, Guardavaccaro *et al.* 2003, Ortega *et al.* 2003).

Durante el desarrollo post-meiótico, las células sufren grandes transformaciones morfogénicas; en esta fase son necesarias proteínas específicas del núcleo de las células germinales y el reemplazo secuencial de histonas que permitan la compactación del ADN (ácido desoxirribonucleico) en el núcleo (Wouters-Tyrou *et al.* 1998). Todo este proceso secuencial y ordenado que es la producción de gametos masculinos, implica pasos precisos de control transcripcional que determinan los patrones de expresión de genes (Kimmins *et al.* 2004).

1.3.5. Maduración del espermatozoide en el epidídimo

Una vez formados en los túbulos seminíferos los espermatozoides tardan varios días en recorrer el epidídimo. Cuando se localizan en los túbulos seminíferos y al comienzo del epidídimo, estos espermatozoides son inmóviles. Una vez que permanecen entre 18 y 24 horas en el mismo y desarrollan la capacidad de moverse aunque proteínas inhibitoras del líquido del epidídimo, les impiden moverse realmente y no lo consiguen hasta que no se produce la eyaculación. Una vez que ésta se produce, los espermatozoides se vuelven móviles, y capaces de fecundar el óvulo, proceso que se denomina maduración. Durante este proceso las células de Sertoli y las células del epitelio del epidídimo secretan un líquido nutritivo especial que es eyaculado junto con los espermatozoides y que contiene hormonas (testosterona y estrógenos), enzimas, y nutrientes necesarios para la maduración de los espermatozoides (Guyton & Hall 1996).

1.3.6. Capacitación de los espermatozoides

La capacitación consiste en una serie de complejos eventos moleculares que tienen lugar tras la maduración de los espermatozoides en el epidídimo y confiere al espermatozoide la capacidad de fertilizar al óvulo. Durante este proceso el espermatozoide experimenta cambios fisiológicos que ocurren en el tracto femenino (Visconti *et al.* 2002).

Cuando los espermatozoides entran en contacto con los líquidos del aparato genital femenino se producen múltiples cambios que activan a los espermatozoides para los procesos finales de la fecundación (Guyton & Hall 1996). Los eventos moleculares implicados en el inicio de la capacitación incluyen el transporte de colesterol desde la membrana del espermatozoide, el flujo de iones resultante de la alteración del potencial de membrana del espermatozoide y el aumento de fosforilación de tirosinas implicadas en la inducción de la hiperactivación y en la reacción del acrosoma (Visconti *et al.* 2002).

2. LIPASA SENSIBLE A LAS HORMONAS

2.1. Función, localización y expresión en diferentes tejidos

La lipasa sensible a las hormonas (HSL) (EC 3.1.1.3) (Fredrikson *et al.* 1981) hasta la década de los 80, se consideraba la enzima clave de la lipólisis en el tejido adiposo (Yeaman 2004). Actualmente, se sabe que esta enzima es una lipasa neutra citosólica con una amplia especificidad de sustrato (Kraemer & Shen 2002, Kraemer & Shen 2006). A diferencia de otras lipasas neutras, como la lipoproteína lipasa (LPL) o la lipasa hepática (Behr *et al.* 1981), la HSL purificada de tejido adiposo presenta actividad triacilglicerol hidrolasa, diacilglicerol hidrolasa, monoacilglicerol hidrolasa, colesterol éster hidrolasa y retinol éster hidrolasa (Bickel *et al.* 1997); en un rango de 1:10:1:4:2 respectivamente (ver figura 5) (Al-Jarallah & Trigatti 2010). Por tanto, la HSL es clave en la lipólisis del tejido adiposo y en la esteroidogénesis en los tejidos esteroidogénicos (corteza de las cápsulas suprarrenales, ovarios, testículos y placenta) (Cook *et al.* 1982, Stralfors 1987, Lee *et al.* 1988, Yeaman 1990); en los que cataliza la hidrólisis de los ésteres de colesterol almacenados en los tejidos y facilita la disponibilidad de colesterol libre para la síntesis de las hormonas esteroideas. Además, actualmente se piensa que la HSL, por su actividad colesterol hidrolasa, podría facilitar el colesterol para la proliferación celular.

Recibe este nombre porque responde a hormonas como insulina, catecolaminas, ACTH y glucagón (Vaughan *et al.* 1964, Steinberg & Khoo 1977). La HSL se descubrió en la década de los 60 (Bjorntorp & Cramer 1961, Vaughan *et al.* 1964, Hollenberg *et al.* 1961) y fue purificada 15 años después (Belfrage *et al.* 1977, Fredrikson *et al.* 1981).

La lipólisis es un proceso esencial para la regulación de la homeostasis energética, se lleva a cabo por la acción de, al menos, tres enzimas específicas (Lampidonis *et al.* 2011) y se realiza en tres pasos formándose como productos intermedios 1,2-diacilglicéridos y

1(3)-monoacilglicéridos, y como producto final glicerol; en cada uno de los pasos se desprenden ácidos grasos no esterificados (NEFAs) que son liberados a la circulación para ser utilizados por los tejidos periféricos (ver figura 5). HSL cataliza las dos primeras etapas de la reacción, y la monoglicérido lipasa (MGL) cataliza la última etapa del proceso (Fredrikson & Belfrage 1983, Belfrage *et al.* 1984a, Yeaman 1990). Aunque HSL es capaz de hidrolizar los 1(3)-monoacilglicéridos, debido a su baja afinidad por los 1(3)-monoacilglicéridos (Fredrikson & Belfrage 1983), este proceso se lleva a cabo por acción de la MGL (Fredrikson *et al.* 1986, Tornqvist & Belfrage 1976). En los últimos 5 años se han identificado importantes enzimas y proteínas reguladoras de la lipólisis (Al-Jarallah & Trigatti 2010). Estos hallazgos incluyen una triacilglicerol hidrolasa aislada en los adipocitos llamada triglicérido lipasa de adipocitos (ATGL) (Zimmermann *et al.* 2004) que también cataliza la hidrólisis de triacilglicéridos a monoglicéridos (Lampidonis *et al.* 2011).

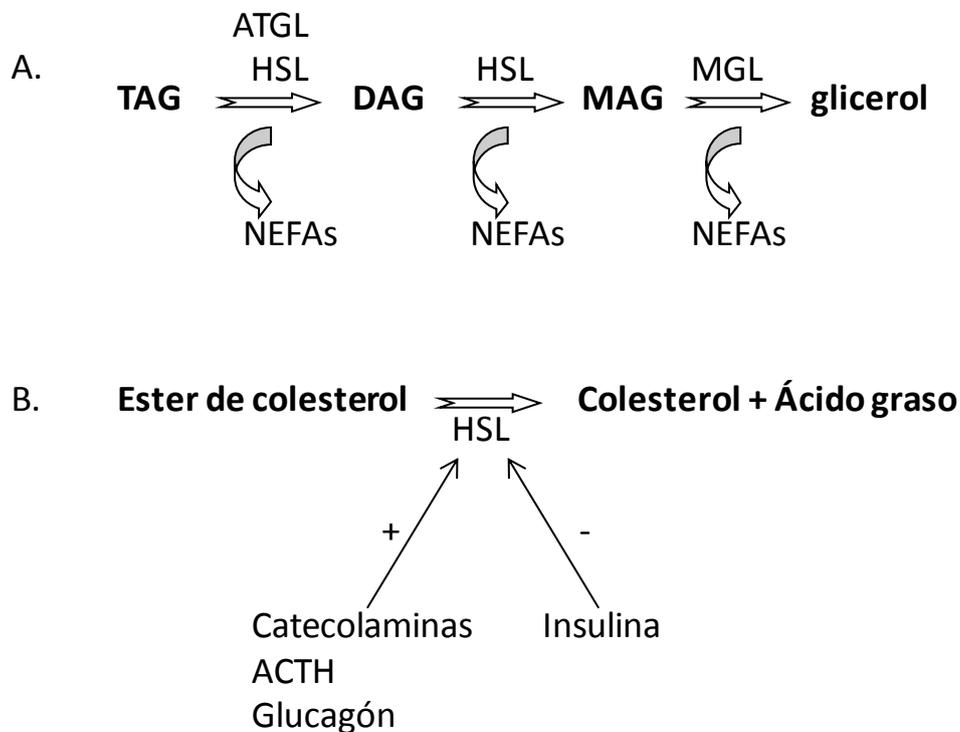


Figura 5. Diagrama esquemático del proceso de lipólisis de triglicéridos (A) y esteres de colesterol (B). Abreviaturas: ATGL; triglicérido lipasa de los adipocitos, DAG: diacilglicérido, HSL: lipasa sensible a hormona, MAG: monoacilglicérido, MGL: monoacilglicérido lipasa, NEFAs: ácidos grasos no esterificados, TAG: triacilglicérido.

La función y el sustrato de actuación de la HSL difieren según el tejido donde se halle. Esta enzima se detecta en tejido adiposo blanco y marrón (Cook *et al.* 1982, Holm *et al.* 1988, Kraemer *et al.* 1993), macrófagos, corazón, músculo esquelético (Holm *et al.* 1988, Kraemer *et al.* 1993), glándula mamaria, leche de rata (Martin-Hidalgo *et al.* 2005, Lobo *et al.* 2009), glándulas adrenales, ovario (Yeaman 1990, Kraemer *et al.* 1991, Hui 1996), testículo (Osuga *et al.* 2000), placenta, células β pancreáticas (Chung *et al.* 2001) y en

hígado de ratón (Sekiya *et al.* 2008). En el tejido adiposo marrón, la HSL interviene en la termogénesis, hidrolizando los triglicéridos endógenos y aportando ácidos grasos (AG) para la β -oxidación (Holm *et al.* 1987b). En músculo y corazón, también actúa como triglicérido lipasa dando como productos glicerol y AG siendo estos últimos oxidados para ser usados como fuente de energía para el mismo tejido (Holm *et al.* 1987ab). En los tejidos esteroideogénicos, la HSL, a pesar de que también actúa en la lipólisis, su papel más importante lo desempeña como colesterol éster hidrolasa neutra hidrolizando ésteres de colesterol (ver figura 5). Por tanto en estos tejidos aporta colesterol para la síntesis de hormonas esteroideas (Boyd *et al.* 1980, Beins *et al.* 1982, Cook *et al.* 1982), y también creemos que provee de colesterol libre para la espermatogénesis. Por lo que una función importante de la HSL en los tejidos esteroideogénicos es el mantenimiento de la homeostasis del colesterol en la célula y la movilización del colesterol almacenado para ser utilizado por la célula o para ser excretado (Kraemer *et al.* 1993). Las células necesitan colesterol para la formación de sus membranas celulares en los procesos de división celular (Fernandez *et al.* 2005, Suarez *et al.* 2005). En la espermatogénesis, como hemos mencionado anteriormente, hay una intensa proliferación y diferenciación celular (Griswold 1998, Eddy *et al.* 2002) que requiere un gran aporte de colesterol (Parks & Hammerstedt 1985, Rana *et al.* 1991, Sugkraroek *et al.* 1991, Haidl & Opper 1997), todo ello sugiere una participación importante de la HSL en estos procesos.

2.2. Estructura y características de la proteína y el gen

2.2.1. Estructura de la proteína

Las propiedades físico-químicas de la HSL han sido estudiadas por Fredrikson y cols. (Fredrikson *et al.* 1981, Fredrikson & Belfrage 1983). La enzima purificada en tejido adiposo de rata tiene un peso molecular aproximado de 84 kDa, un punto isoeléctrico de 6.7-6.8 y un pH óptimo de actividad de 7. No tiene péptido señal y no es una proteína glucosilada. Su localización es citosólica. Su actividad es inhibida por diisopropilfluorofosfato, fluoruro sódico, cloruro mercuríco y ácido fenilborónico (Fredrikson *et al.* 1981).

La HSL no presenta homología con otras lipasas de mamíferos (Contreras *et al.* 1996), sin embargo, sí presenta homología con varias enzimas procarióticas, incluyendo lipasas bacterianas (Langin *et al.* 1993).

Hasta la fecha no se dispone de la estructura tridimensional de la HSL. Según el modelo estructural propuesto ésta puede ser subdividida en cuatro regiones funcionales (Holm *et al.* 1994, Contreras *et al.* 1996, Osterlund *et al.* 1996, Osterlund *et al.* 1997, Osterlund *et al.* 1999):

- 1) **El dominio amino terminal o N-terminal** (1-300 aminoácidos), que se cree que media la unión a lípidos, la dimerización de la enzima (Shen *et al.* 2000) y la interacción con la proteína de unión de ácidos grasos 4 cuya unión aumenta la actividad enzimática de HSL (ver figura 6) (Smith *et al.* 2007).

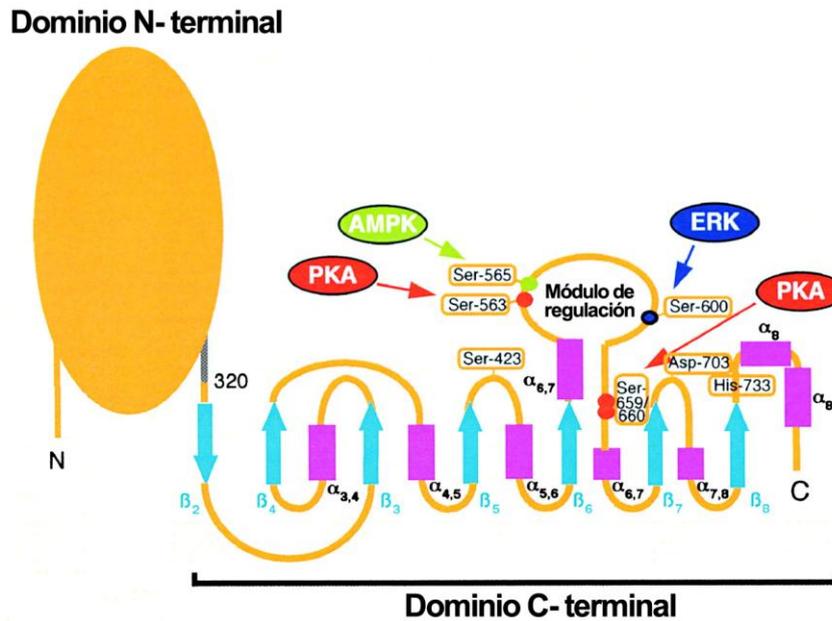


Figura 6. Estructura esquemática de HSL en ratón, adaptada de (Kraemer & Shen 2002). Abreviaturas: Ser, serina; His, histidina; Asp, asparragina; PKA, proteína quinasa dependiente de AMPc, AMPK, proteína quinasa activada por mitógeno; ERK, proteína quinasa de señalización extracelular; N, amino terminal y C, carbono terminal.

- 2) **El dominio carboxiterminal o C-terminal** (301-768 aminoácidos), que contiene la tríada catalítica compuesta por una serina (Ser-423), una asparragina (Asp-693) y una histidina (His-723) en humanos y la Ser-423, Asp-703 e His-733 en los murinos (ver figura 6).
- 3) **El dominio regulador de la enzima**, que contiene los sitios de fosforilación conocidos en la HSL.
- 4) **Un dominio de unión lipídica**, que puede estar posicionado en el último residuo desde el área 658 hasta el final de la proteína (ver figura 6) (Osterlund et al. 1996).

El peso molecular de la HSL varía en las diferentes especies. Se ha descrito una proteína de 88 kDa en tejido adiposo humano (Bjoerntorp 1964, Khoo *et al.* 1974), 84 kDa en rata (Nilsson *et al.* 1989), 82 kDa en ratón y en cerdo de guinea (Holm et al. 1994), y 76 kDa en oveja (Lampidonis *et al.* 2008). Esto indica la existencia de varias isoformas de HSL. Sin embargo, la regulación de la HSL en humano parece ser análoga a la de la rata, lo que sugiere que se mantiene la función y la estructura general (Khoo et al. 1974).

2.2.2. Estructura del gen

El gen de HSL ha sido clonado en varias especies, en la rata consta de 768 aminoácidos (Arner 1988, Holm et al. 1988, Langin et al. 1993, Warden *et al.* 1993, Li *et al.* 1994) y en humano de 786 (Holm et al. 1994). La secuencia completa del gen de HSL ha sido traducida en humano (Holm et al. 1988, Langin et al. 1993, Holst *et al.* 1996), ratón (Li et al. 1994, Sztrlovics *et al.* 1997), rata (Fredrikson et al. 1981, Osterlund et al. 1996), cerdo (Harbitz *et al.* 1999) y en la especie bovina (Cordle *et al.* 1986, Garton *et al.* 1988).

El gen de HSL humano, denominado LIPE, ha sido mapeado en el cromosoma 19q13.2 (Holm et al. 1988) y su homólogo en ratón en el cromosoma 7 (Warden et al. 1993), en el cerdo en el cromosoma 6 (Gu *et al.* 1992), y en la especie bovina en el cromosoma 18 (Cordle et al. 1986, Yonezawa *et al.* 2008). El gen en humanos (LIPE), abarca una región de 25.9 Kb y el de ratón 10.4 Kb; y en humanos contiene 10 exones interrumpidos por 8 intrones. La proteína HSL en humanos es ligeramente más larga que su homóloga en rata ya que ésta última tiene una delección de 12 aminoácidos (Arner 1988, Langin et al. 1993). El exón 6 contiene la serina catalítica identificada en la mayoría de las lipasas (secuencia patrón consenso: G-X-S-X-G). Se cree que esta serina forma parte de la tríada catalítica observada en numerosas lipasas, junto con los residuos Asp-703 e His-733 (Contreras *et al.* 1996). El exón 8 alberga las dos serinas que se corresponden con los sitios de fosforilación, mientras que el exón 9 lleva la región de unión lipídica (Holm et al. 1994).

Además de los 10 exones que transcribe el ARNm en todos los tejidos de humano y de ratón, el uso del exón alternativo da como resultado una variación significativa en la región 5' de los transcritos de HSL (Langin et al. 1993, Grober *et al.* 1997, Blaise *et al.* 1999, Blaise *et al.* 2001). En el testículo hay dos exones específicos que tienen dos sitios de comienzo trascipcionales T1 y T2. El exón T1 codifica una región adicional de 300 aminoácidos, mientras que T2 es una secuencia no codificable. Esta gran variabilidad de exones da lugar a la formación de varios ARNm de HSL y proteínas de distintos tamaños que se encuentran en tejido adiposo, células β pancreáticas, ovario y testículos. En el tejido adiposo, las glándulas adrenales y en el ovario, la transcripción de HSL comienza desde múltiples exones, que pueden ser exón A, B, C y D o exón 1 que ocupan una región de 13 Kb. Los exones B, C y D no son codificantes, por lo tanto el utilizar uno u otro no modifica la composición de aminoácidos de la enzima. En cambio, el exón A contiene información codificante para 43 aminoácidos adicionales, dando lugar a una isoforma alternativa de la enzima (ver figura 7) (Lampidonis et al. 2011).

Mediante la técnica de *Northern blot* han sido caracterizadas varias especies de ARNm de HSL (3.3, 3.5 y 3.9 kb) que se expresan en tejido adiposo, tejidos esteroideogénicos (adrenales, placenta, ovario y testículos), bazo, pulmón, corazón y músculo esquelético (Cook et al. 1982, Cook *et al.* 1983, Fredrikson *et al.* 1987, Holm et al. 1987a, Holm et al. 1987b, Holm et al. 1988, Arner 1988, Small *et al.* 1989, Yeaman 1990). También se ha encontrado expresión en glándula mamaria, en hígado (Liu & Severson 1995) y en macrófagos de ratón (Khoo *et al.* 1993, Contreras & Lasuncion 1994, Martín-Hidalgo *et al.*

1996). Las diferentes especies de ARNm en los diferentes tejidos podrían estar implicadas en la regulación específica de cada tejido.

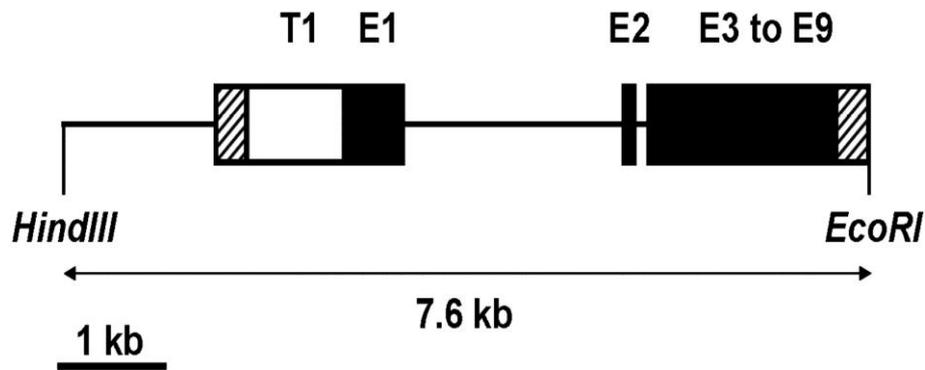


Figura 7. Representación esquemática del gen de HSL en humano, adaptada de Vallet-Erdtmann et. Al 2004. Abreviaturas, E1: exón 1, E2: exón 2, E3: exón 3, E9: exón 9.

2.3. Regulación

Esta enzima tiene dos formas de regulación, una que podríamos denominar aguda o a corto plazo y otra a largo plazo.

2.3.1. Regulación aguda o a corto plazo

El sistema mejor estudiado es el de la regulación de la HSL en los adipocitos. La actividad de la HSL a corto plazo, en tejido adiposo, se regula de forma post-traducciona por un mecanismo de fosforilación-desfosforilación (Belfrage *et al.* 1984b, Stralfors 1987, Yeaman 1990). La forma activa de la enzima es la fosforilada. Este mecanismo de fosforilación es dependiente de la activación de la PKA, que a su vez depende de un sistema en cascada, en respuesta a la estimulación β -adrenérgica, iniciado por distintas hormonas (Burns *et al.* 1980, Davies & Souness 1981, Fain 1982, Belfrage *et al.* 1985, Arner 1988). La desfosforilación no parece estar regulada hormonalmente.

Hormonas tales como las catecolaminas, la ACTH, el glucagón, y otras hormonas lipolíticas, fosforilan la enzima mediante PKA dependiente de AMPc y estimulan la actividad de esta lipasa intracelular (Vaughan *et al.* 1964). Estas hormonas se unen a un receptor acoplado a una proteína G y vía PKA (Shepherd *et al.* 1981, Yip & Goodman 1999), inducen la fosforilación de HSL en la Ser-659 y en la Ser-660 en rata y la Ser-650 en humano, activando la enzima (Londos *et al.* 1999, Holm *et al.* 2000). La actividad hidrolítica de la HSL también se incrementa mediante la fosforilación de un sitio, identificado en rata, en la Ser-653 (ver figura 8) (Yeaman 1990). Todo ello a expensas de la hidrólisis del adenosil trifosfato (ATP), que proporciona la energía para estas reacciones. Pero además, las hormonas lipolíticas pueden ejercer su acción sobre la MAPK, activando

esta ruta y a su vez activando a ERK. La activación de la ruta de ERK parece capaz de regular la lipólisis en los adipocitos, mediante la fosforilación de la Ser-600 de la HSL, aumentando la actividad dicha enzima (Greenberg *et al.* 2001). En cambio, otras quinasas como la glicógeno sintasa quinasa-4, la proteína quinasa II dependiente de calcio y calmodulina y la PKA, fosforilan la HSL en un sitio basal secundario, la serina-565 en la HSL de rata (Yeaman 1990). La fosforilación de Ser-565 desfavorece la fosforilación de la Ser-563 por PKA (Yeaman 1990). Aunque son varias las quinasas que pueden fosforilar la HSL, sólo las serinas que se encuentran en el módulo de regulación son las que modulan la actividad de la HSL (Figura 8) (Kraemer & Shen 2002).

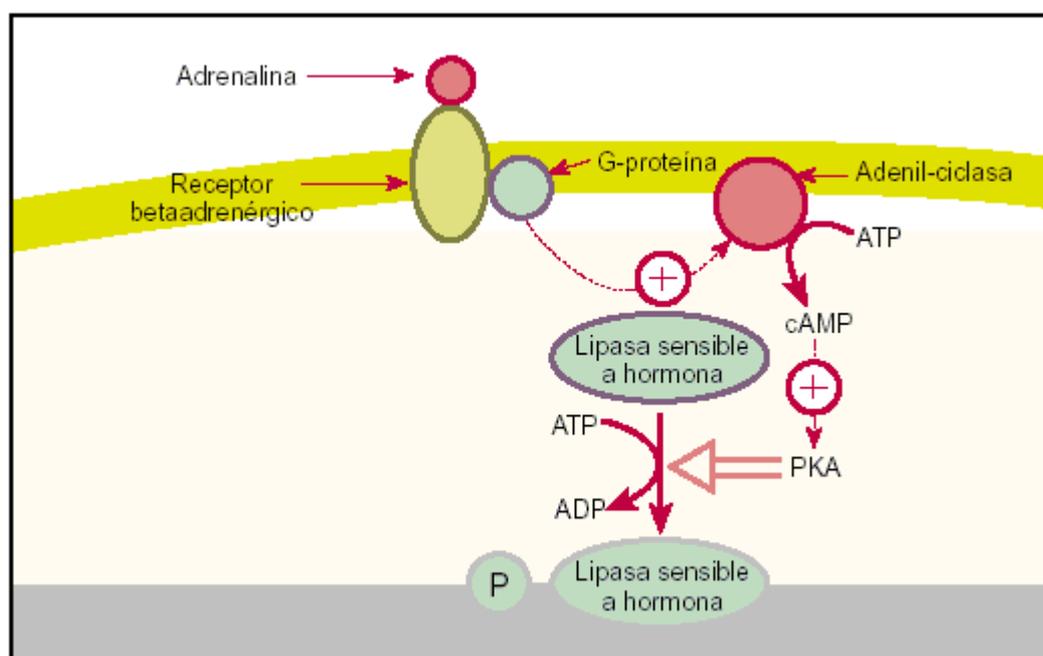


Figura 8. Ejemplo esquemático de activación, mediante fosforilación, de HSL por acción de la adrenalina. Abreviaturas: ATP: adenosiltrifosfato; cAMP: adenosilmonofosfato cíclico; PKA: proteína quinasa A; P: fosfato.

Perilipina y HSL. Es importante destacar que la fosforilación de la HSL dependiente de PKA también promueve la translocación de la HSL desde el citosol hasta la gota lipídica. Estudios recientes sugieren que la translocación de la HSL también requiere la fosforilación por PKA de la perilipina, una proteína esencial asociada a las gotas lipídicas (Kraemer & Shen 2006). Por tanto, perilipina regularía así la activación de la HSL. La capacidad de la perilipina de funcionar como represor de la lipólisis basal y como activador de la lipólisis estimulada por PKA, se ha tratado de explicar mediante dos modelos. Según el modelo 1, en ausencia de fosforilación dependiente de PKA, la función de perilipina sería actuar de barrera entre los lípidos neutros acumulados y las lipasas como la HSL, manteniendo así un nivel bajo de lipólisis basal (Brasaemle *et al.* 2000, Souza *et al.* 2002, Zhang *et al.* 2003). El mecanismo por el que la perilipina funcionaría como una barrera es desconocido. El modelo 2 permite explicar que la fosforilación de perilipina por PKA en los seis residuos de serina (sitios consenso de PKA) es necesaria

para la activación de la lipólisis (Souza et al. 2002, Holm 2003, Tansey *et al.* 2003), presumiblemente porque esta fosforilación induce cambios conformacionales de la perilipina que permiten exponer los lípidos neutros almacenados y facilitan la translocación de la HSL a las gotas lipídicas (Figura 9) (Souza et al. 2002, Abifadel *et al.* 2003, Su *et al.* 2003). En las células no adiposas que carecen de perilipina-1 el papel de la HSL está menos caracterizado. Generalmente, la expresión de la HSL en estas células y tejidos es baja. Sin embargo, en algunos de ellos la función fisiológica de la HSL ha sido descrita, por ejemplo en músculo y macrófagos (Holm et al. 1988, Kraemer et al. 1993).

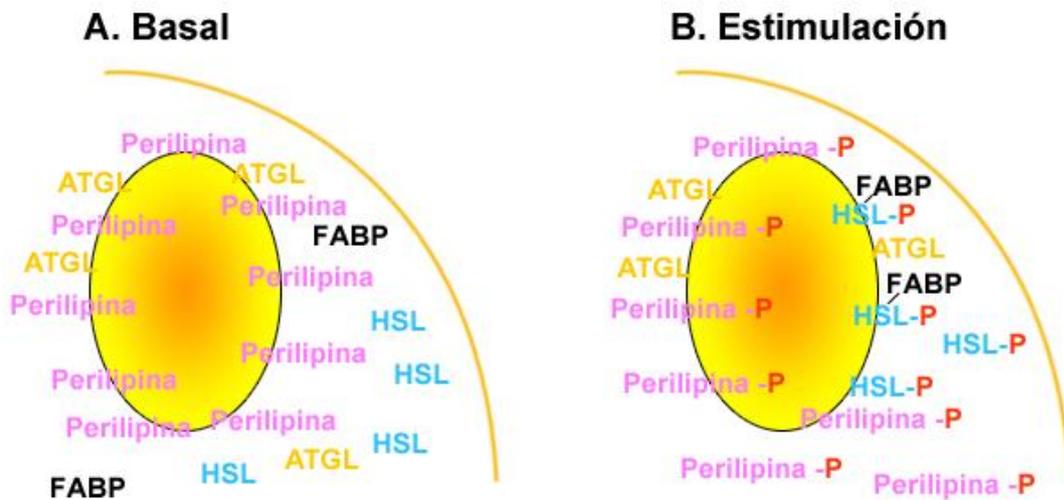


Figura 9. Modelo 2 de activación de HSL en la gota lipídica, adaptado de (Kraemer & Shen 2006). Abreviaturas, FABP: Proteína de unión a ácidos grasos, ATGL: triglicérido lipasa, HSL: lipasa sensible a hormona, HSL-P: lipasa sensible a hormona fosforilada.

Por otro lado, la HSL puede ser inactivada por acción de proteínas fosfatasas. Las fosfatasas que actúan sobre la Ser-563, son sobre todo la fosfatasa 2A y la 2C, mientras que la Ser-565 es desfosforilada, preferentemente, por la fosfatasa 2A (Kraemer et al. 1991). También, la HSL puede ser inactivada por hormonas y agentes antilipolíticos (Burns *et al.* 1978, Coppack *et al.* 1989, Wahrenberg *et al.* 1989, Coppack *et al.* 1990), tales como: adenosina, fenil-adenosina, prostaglandina E1, insulina, AG libres, cuerpos cetónicos y ácido nicotínico, que ejercen su acción desfosforilando parcialmente la forma activa de la HSL, eliminando los fosfatos que están incorporados en los sitios reguladores de la misma y convirtiéndola así en la forma inactiva.

El proceso de acción antilipolítica es muy complejo y no se conoce aún en su totalidad. La insulina ha sido estudiada con especial atención, debido a las implicaciones fisiológicas y patológicas que tiene esta hormona (Coppack et al. 1989, Coppack et al. 1990). La insulina disminuye la velocidad de fosforilación de los sitios reguladores de la HSL al inhibir la actividad de la PKA, lo que a su vez es consecuencia de la disminución de los niveles intracelulares de AMPc. Este efecto se produce porque la insulina activa la fosforilación de la enzima fosfodiesterasa (PDE) que cataliza la transformación de AMPc en 5'-AMP, e inhibe a la adenilato ciclasa, que cataliza la síntesis de este nucleótido cíclico, la PDE se inhibe por guanósín monofosfato cíclico (Illiano & Cuatrecasas 1972, Londos *et*

al. 1985, Shibata *et al.* 1991, Smith *et al.* 1991). Sin embargo, también existen evidencias experimentales que apoyan que la insulina puede ejercer su acción antilipolítica por un mecanismo independiente de AMPc, que estaría mediado por la activación de proteínas fosfatasas (Stralfors *et al.* 1984, Olsson & Belfrage 1987, Wood *et al.* 1993), que catalizan la desfosforilación parcial de la HSL.

Todo esto puede realizarse o bien de forma directa sobre esta enzima, o de manera indirecta por la disminución de las concentraciones intracelulares de AMPc que tiene como consecuencia la inactivación de PKA. Esta reducción en la actividad de la enzima impide que se fosforile un factor inhibidor de la fosfatasa conocido como factor inhibidor-1. Así, al disminuir la acción inhibidora de dicho factor sobre la proteína fosfatasa, ésta última queda activada y facilita la desfosforilación, por tanto la inactivación de la HSL (Stralfors *et al.* 1984, Olsson & Belfrage 1987, Wood *et al.* 1993). El papel de la insulina como inhibidor de la lipólisis además de cursar mediante una disminución de la fosforilación de la HSL (Stralfors *et al.* 1984, Stralfors & Honnor 1989), también lo hace estimulando la desfosforilación de la perilipina (Stralfors & Honnor 1989, Egan *et al.* 1990) y de proteínas reguladoras de la lipólisis localizadas en la periferia de la gota lipídica (Egan *et al.* 1990).

Los AG libres pueden constituir un mecanismo de regulación de la enzima. La HSL es inhibida, de manera no competitiva por oleoil CoA, ácido oleico (C18:1n9) y 2-monopalmitoilglicerol (Jepson & Yeaman 1992). Ha sido demostrado que los AG libres inhiben la adenilato ciclasa, y por lo tanto, inhiben también la acumulación de AMPc en el adipocito (Fain & Shepherd 1975) y la activación de la HSL por fosforilación. Por otro lado, los AG libres también pueden activar a PKA, que fosforilaría la HSL en un lugar distinto del módulo regulador, impidiendo así la fosforilación de éste, y por tanto, impidiendo la activación de la enzima y la liberación de AG libres (Garton *et al.* 1989, Grahame *et al.* 1989).

La regulación hormonal de la HSL depende de cada tejido. Así por ejemplo, la insulina y las catecolaminas participan en la regulación de la enzima en el tejido adiposo, corazón y músculo; la ACTH estimula la actividad colesterol ester hidrolasa en la corteza adrenal (Gorban & Boyd 1977); la LH y la FSH en los ovarios y los testículos, y por último la gonadotropina coriónica en la placenta y el ovario durante la gestación (Holm 1989).

Por último destacar, que la HSL responde al frío de forma aguda, a través de la liberación de catecolaminas, mediante un aumento en la fosforilación y activación de la enzima (Blanco Dolado 1997).

2.3.2. Regulación a largo plazo

Este tipo de regulación es específica de cada tejido y varía en relación a la situación hormonal y nutricional. Esta regulación puede ser ejercida de distintas maneras: transcripcional, post-transcripcional y post-traducional. Los primeros estudios son del grupo Wilson y cols. (Wilson *et al.* 1992) que encontraron que en el tejido adiposo de las marmotas, durante el periodo de hibernación, es decir, en invierno y hasta principios de primavera, la actividad y los niveles de ARNm de la HSL aumentan y disminuyen en verano

y otoño (Wilson et al. 1992). Estos cambios pueden estar regulados por la insulina, que aumenta durante la fase postprandial e induce la desfosforilación de HSL (Vernon & Clegg 1985).

Durante la gestación, ocurren importantes cambios en el metabolismo de lípidos. Durante el primer tercio de la gestación se produce un aumento de los acúmulos de grasa en el tejido adiposo, que disminuyen durante las últimas fases de la gestación (Herrera *et al.* 1988). Estos cambios en el catabolismo neto del tejido adiposo durante la última fase de la gestación se acompañan de un aumento en la actividad y el ARNm de la HSL y una disminución de la LPL (Martin-Hidalgo *et al.* 1994).

Otras situaciones en las que aparece este tipo de regulación son, por ejemplo, el ayuno y el ejercicio, donde la actividad de la HSL aumenta (Hollenberg et al. 1961, Patten 1970) paralelamente a un aumento en la transcripción y traducción enzimáticas (Holm 1989), lo que posibilita la movilización de la grasa almacenada para la obtención de energía. No obstante, hay autores que no han encontrado cambios en la actividad de HSL durante el ayuno (Huttunen *et al.* 1970). El ejercicio, de la misma forma que en el ayuno prolongado, son situaciones que requieren un elevado aporte energético (Havel *et al.* 1963, Ahlborg *et al.* 1974, Bjorkman 1986). El estrés también incrementa la lipólisis a pesar de la hiperinsulinemia (Wolfe *et al.* 1990, Klein *et al.* 1991); y por último el desarrollo, especialmente en los tejidos esteroideogénicos, los niveles de ARN de HSL cambian de forma brusca con el desarrollo (Kraemer et al. 1991). Se ha estudiado que la inyección de gonadotropina coriónica humana en testículos de ratas sexualmente inmaduras aumenta la actividad de la HSL, al aumentar la expresión tanto a nivel de ARNm como de proteína (Kraemer et al. 1993).

Por tanto, la regulación de esta enzima no sólo se lleva a cabo por mecanismos post-traduccionales de fosforilación y desfosforilación, sino que también en la transcripción, que es específica de cada tejido.

2.4. La HSL en el testículo

Han sido descritas múltiples isoformas de HSL en los distintos tejidos. En el caso del testículo, en ratón y humano, se ha visto que se expresa una isoforma llamada HSL testicular (Osuga et al. 2000, Chung et al. 2001). El ARNm de la HSL testicular se encuentra en las espermátidas tempranas y la proteína en las espermátidas elongadas. Otras isoformas de la HSL se expresan en las células germinales diploides y en las células intersticiales del testículo. La HSL testicular contiene un único dominio N-terminal además de los 775 aminoácidos que tiene en común con todas las formas de la HSL (Langin et al. 1993, Grober et al. 1997). Este dominio adicional está codificado por un exón específico de testículo localizado 15 kb hacia arriba del primero de los nueve exones comunes con las isoformas conocidas de la HSL. La región 5' del ARNm de la HSL testicular difiere de la del ARNm de la HSL humana expresada en células testiculares diploides. La organización genómica de la HSL testicular propuesta es aquella que utiliza distintos promotores que gobiernan la expresión específica de tejidos (Tabla 1) (Blaise et al. 1999, Blaise et al. 2001).

En los testículos, se ha propuesto que la HSL interacciona directamente con la proteína StAR (Harada *et al.* 2003), dicha interacción que ocurre en el citoplasma aumenta la actividad de la HSL y facilita el movimiento del colesterol desde los depósitos de gotas de lípidos hacia la mitocondria para la esteroidogénesis (Kraemer *et al.* 2004).

Localización de la HSL	Especie
Espermátidas elongadas y de las células de Sertoli (lisosomas)	Cerdo de Guinea, visón (Kabbaj <i>et al.</i> 2001, Kabbaj <i>et al.</i> 2003)
Células de Sertoli y espermátidas	Rata (Blaise <i>et al.</i> 2001, Mairal <i>et al.</i> 2002)
Espermatogonias tipo B y espermatocitos primarios	Ratón (Blaise <i>et al.</i> 2001, Mairal <i>et al.</i> 2002)
Espermatogonias tipo B, espermatocitos primarios y células de Sertoli	Humano (Blaise <i>et al.</i> 2001, Mairal <i>et al.</i> 2002)

Tabla 1. Localización de HSL en el testículo según la especie.

La importancia del papel de HSL en el metabolismo del colesterol en el testículo, ha sido desvelada gracias al estudio de los ratones deficientes en HSL (Osuga *et al.* 2000, Chung *et al.* 2001). Los ratones HSL *KO* (HSL^{-/-}) en un principio, fueron creados para esclarecer el papel de HSL en la obesidad. Sin embargo, al contrario de lo que se pensaba, estos estudios han demostrado que los ratones HSL^{-/-} no son obesos pero sí estériles (Osuga *et al.* 2000). A pesar de que estos ratones tienen disminuida la capacidad para liberar AG de los adipocitos, no sólo no son obesos, sino que, manifiestan una notable resistencia a desarrollar obesidad, incluso siendo sometidos a una dieta rica en grasas (Harada *et al.* 2003, Strom *et al.* 2008). Los ratones machos HSL^{-/-} son estériles, tienen oligospermia y anormalidades en la morfología del testículo (Osuga *et al.* 2000). Todo ello asociado a una reducción del tamaño de los testículos, con grandes anormalidades morfológicas en el epitelio de los túbulos seminíferos incluyendo la ruptura de puentes intercelulares en las espermátidas, dando como resultado células multinucleadas, formas anormales en la cabeza y el acrosoma de espermátidas alargadas y una aparente reducción de las mismas (Chung *et al.* 2001). Este fenotipo sugiere un papel esencial de esta enzima en el testículo y en la espermatogénesis (Osuga *et al.* 2000).

Hay varios estudios que han descrito que en los testículos de los ratones HSL^{-/-} se da un aumento significativo del nivel de colesterol paralelo a la ausencia de la actividad colesterol hidrolasa (Osuga *et al.* 2000). Estos estudios atestiguan la suma importancia de esta enzima en el mantenimiento de la homeostasis de colesterol en las células del testículo (Kabbaj *et al.* 2001). Es interesante resaltar aquí que el contenido de colesterol en el esperma se ve significativamente alterado durante la maduración de los epidídimos (Rana *et al.* 1991) y que la deficiencia de los AG esenciales conduce a una degeneración testicular (MacDonald *et al.* 1984). Se ha demostrado que esta infertilidad se revierte en

ratones transgénicos que expresan la forma testicular de HSL en células germinales postmeiosis (Wang *et al.* 2004, Kraemer 2007).

Por otro lado, la HSL también tiene actividad retinil éster hidrolasa, y la ausencia de esta actividad en los ratones HSL *-/-* podría causar un descenso en los niveles de ácido retinoico y ello podría estar asociado a la infertilidad observada en estos ratones. Diversos estudios han permitido observar que la deficiencia de ácido retinoico (Livera *et al.* 2000), o de receptores α (Lufkin *et al.* 1993) y β (Kastner *et al.* 1996) de ácido retinoico se traduce en defectos en la espermatogénesis e infertilidad (Haemmerle *et al.* 2002).

3. COLESTEROL

El colesterol es un lípido indispensable para las células animales. Por si mismo, es precursor de moléculas tan importantes como las hormonas esteroideas, los ácidos biliares, los oxisteroles bioactivos (Chang *et al.* 2006) y de la vitamina D (van der Velde 2010). Su papel en el desarrollo y la diferenciación celular durante la embriogénesis es especialmente importante, puesto que actúa como modulador de la señalización mediada por proteínas Hedgehog (Farese *et al.* 1998, Ingham 2001). En el sistema nervioso es necesario para la diferenciación neuronal y la correcta transmisión en las sinapsis (Mauch *et al.* 2001, Pfrieger 2003). En las células de los mamíferos, el colesterol es, por lo tanto, esencial para el mantenimiento de la permeabilidad y la función de la membrana, para la regulación de la función de proteínas integrales de membrana así como para la transcripción y la formación de los denominados *lipid rafts* de los que hablaremos en detalle más adelante (Tabas 2002). Además, el colesterol está implicado en la proliferación celular (Brown & Goldstein 1974, Chen *et al.* 1974), no sólo para generar nuevas membranas, sino como regulador del ciclo celular. A este respecto, nuestro grupo ha demostrado que el colesterol controla la progresión de la fase G2 a la fase de mitosis (Martinez-Botas *et al.* 1999, Fernandez *et al.* 2005).

La homeostasis del colesterol celular es un sistema estrechamente regulado; la cantidad de colesterol no esterificado en las células está controlado por la relación entre la captación de colesterol y la síntesis, la esterificación y la hidrólisis de los ésteres de colesterol resultantes (Gwynne & Strauss 1982, Goldstein & Brown 1990). Las células obtienen el colesterol bien a partir de la síntesis *de novo*, o bien captándolo de las lipoproteínas del plasma (Ory *et al.* 2004).

3.1. Biosíntesis de colesterol

La biosíntesis de colesterol conlleva sucesivas reacciones enzimáticas en las que el precursor, acetil coenzima A, de tan sólo dos carbonos, es convertido a escualeno, una molécula de 30 carbonos acíclica y apolar. A continuación, el escualeno sufre una oxidación y una ciclación y da lugar al primer esteroide de la ruta de biosíntesis, el lanosterol de 30 carbonos (C30). La conversión de lanosterol (C30) a colesterol (C27) se realiza a

través de 18 reacciones enzimáticas de reducción, desmetilación y cambios de posición de dobles enlaces (Gurr & Harwood 1991). Las reacciones que se suceden a partir del lanosterol pueden tener lugar a través de dos vías diferentes: vía de Kandutsch-Russell o saturada, donde el precursor inmediato del colesterol es el 7-deshidrocolesterol (7DHC) y vía de Bloch o insaturada, donde el último precursor, antes del colesterol, es el desmosterol (ver figura 10) (Clayton 1998). En la ruta de biosíntesis las enzimas responsables de los pasos de conversión de escualeno a colesterol se localizan en las membranas del RE (Gurr & Harwood 1991). La enzima limitante de la ruta es la hidroximetilglutaril CoA (HMG-CoA) reductasa, que cataliza la producción de mevalonato, esta enzima está sujeta a regulación por esteroides y responde a muchos otros estímulos (Ikonen 2006).

Hay varios estudios que muestran que en las células de los mamíferos, además de colesterol, se sintetizan cantidades importantes de esteroides precursores que tienen funciones biológicas específicas que no pueden ser reemplazadas por colesterol. Por ejemplo, el lanosterol y el dihidrolanosterol promueven la ubiquitinación de la HMG-CoA reductasa, que como dijimos anteriormente, es la enzima limitante de la biosíntesis de colesterol, la ubiquitinación da como resultado una reducción de la actividad de dicha enzima (Song *et al.* 2005). El desmosterol y el 4,4-dimetilesterol, actúan como ligandos de los receptores X (LXRs) del hígado (Janowski *et al.* 1996, Yang *et al.* 2006), que regulan la transcripción de muchos genes implicados en el metabolismo de lípidos, promoviendo (Yamauchi *et al.* 2007). O como el 7DHC que es un precursor de la vitamina D (Herman 2003). Otros intermediarios que son importantes en la biología celular son los isoprenoides no esteroídicos, generados en reacciones anteriores a la producción de escualeno, de los cuales derivan moléculas implicadas en la transcripción (isopentenil tARNs), la N-glicosilación (dolicol) y prenilación (farnesil y geranylgeraniol) de proteínas, y en el transporte mitocondrial de electrones (ubiquinona) (Ikonen 2006).

Hay determinados intermediarios del colesterol que juegan papeles importantes en la fisiología celular. Así, el FF-MAS (*follicular fluid meiosis activating sterol*) y el T-MAS (*testicle meiosis activating sterol*) estimulan la meiosis en las gónadas. FF-MAS promueve la transición de metafase I a metafase II en oocitos *in vitro*, facilitando la maduración de los mismos (Marin Bivens *et al.* 2004). Por otro lado, la actividad de la lanosterol 14 α -desmetilasa, que permite la síntesis de estos compuestos, varía a lo largo de la gametogénesis (Rozman *et al.* 2005). Así mismo, los progestágenos inhiben las enzimas Δ^{24} reductasa y lanosterol 14 α -desmetilasa, causando la acumulación de dichos esteroides (Lindenthal *et al.* 2001).

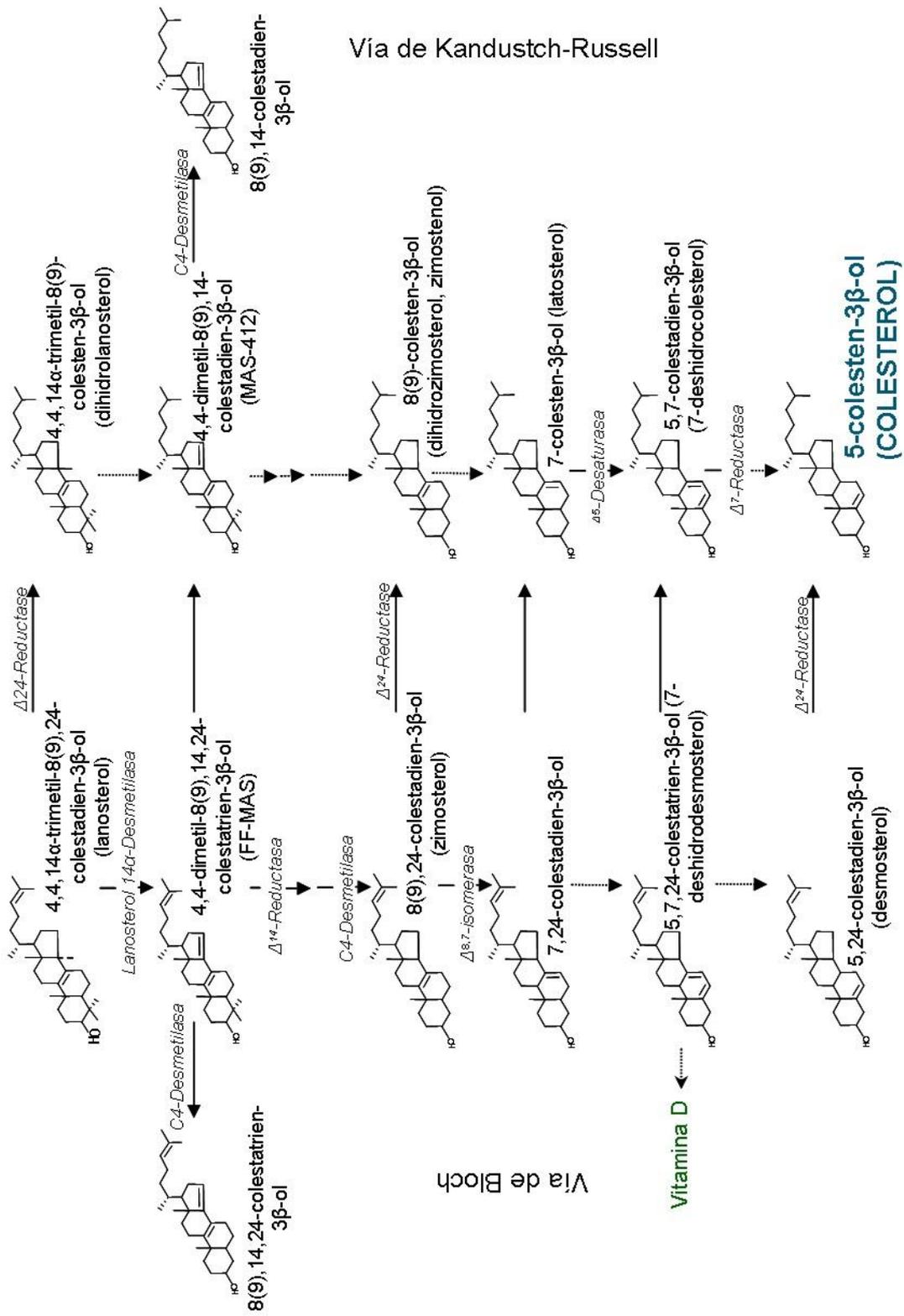


Figura 10. Ruta de biosíntesis de colesterol a partir de lanosterol. Se indican la bifurcación de la ruta en la vía de Bloch y Kandustch-Russell, los intermediarios sintetizados en las reacciones y las enzimas que catalizan dichas reacciones.

3.2. Mecanismos relacionados con la homeostasis de colesterol

La homeostasis del colesterol se mantiene a través de una red de programas de transcripción. En las células la síntesis *de novo* de colesterol y la captación de las lipoproteínas del colesterol está regulada por un sistema de retroalimentación negativa que responde a la elevación de los niveles intracelulares de colesterol (Ory 2004).

El metabolismo del colesterol está regulado básicamente por los factores de transcripción SREBPs (*Sterol Response Elements Binding Proteins*), aunque también contribuyen receptores nucleares como LXR, FXR (*farnesoid X receptor*), PPAR (*peroxisome proliferator-activated receptor*) y también microARN (miARN). Todos ellos también participan en la regulación del metabolismo de los AG y de múltiples procesos fisiológicos.

La regulación del colesterol se lleva a cabo, principalmente, a través de los factores de transcripción SREBPs (Ikonen 2006). Han sido identificados tres miembros en la familia de SREBPs: SREBP-1a, SREBP-1c y SREBP-2 (Hua *et al.* 1995) que se sintetizan como precursores inactivos localizados en la membrana del RE. Aquí se encuentran formando un complejo con la proteína SCAP (*SREBP Cleavage Activating Protein*) (Sakai *et al.* 1997) que actúa como un sensor de colesterol a través de su SSD (*Sterol Sensing Domain*). El SSD de SCAP cambia su conformación cuando se une a colesterol u otros esteroides (Radhakrishnan *et al.* 2004). Este cambio conformacional le permite interactuar con proteínas Insig integrales del RE que retienen el complejo SCAP-SREBP en dicha localización (Espenshade *et al.* 2002, Yang *et al.* 2002). Cuando el contenido de colesterol disminuye, la interacción SCAP-Insig se debilita y el complejo SCAP-SREBP se libera y se dirige al Golgi (Espenshade *et al.* 2002). En este nuevo emplazamiento, SREBP sufre una proteólisis secuencial efectuada por dos proteínas del Golgi, S1P y S2P (*Site-1 protease* y *Site-2 protease*). De esta forma queda liberado el extremo aminoterminal de SREBP, que es su forma activa. Este fragmento viaja al núcleo donde se une a elementos SRE (elemento de respuesta a esteroides) (Horton *et al.* 2002) o E-box (Zeng *et al.* 2004) de las regiones promotoras regulando la expresión de algunos genes, entre los cuales se encuentran el receptor de lipoproteínas de baja densidad (R-LDL), enzimas de la síntesis de colesterol como la HMG-Coa sintasa, la HMG-CoA reductasa, la mevalonato quinasa, la escualeno sintasa, la lanosterol 14 α -desmetilasa, etc (Levine 2004). Es también capaz de regular la expresión del transportador de colesterol ABCA1 (*ATP-binding cassette transporter A1*), aunque, en este caso lo que hace es reprimirlo (Zeng *et al.* 2004). La retención de SREBP en el RE vuelve a tener lugar cuando se alcanza una concentración suficiente de colesterol en la célula (Horton *et al.* 2003).

Los LXRs juegan un papel importante en la regulación del metabolismo del colesterol (Peet *et al.* 1998, Tontonoz & Mangelsdorf 2003). Los receptores nucleares LXR forman heterodímeros con receptores X retinoides y se activan por una gran variedad de esteroides entre los que se incluyen oxisteroides intermediarios; que se forman durante la biosíntesis de colesterol. Los LXRs activan genes de transcripción implicados en la salida de colesterol de la célula, como son ABCA1 y *ATP-binding cassette transporter G1* (Tontonoz & Mangelsdorf 2003, Fernandez-Hernando *et al.* 2011).

Los PPARs, mediante la unión de su ligando, activan factores de transcripción que regulan la expresión de un amplio rango de genes cuyos productos están implicados en el metabolismo lipídico (Majdalawieh & Ro 2010). Han sido identificadas varias isoformas de los PPARs (α , β , δ y γ) que tienen un patrón tisular de expresión diferente (Majdalawieh & Ro 2010).

Por otro lado, el producto final del catabolismo del colesterol, los ácidos biliares, son ligandos del FXR y actúan activando la expresión de genes dependientes del FXR implicados en la producción de ácidos biliares, triglicéridos y colesterol, controlando con esto el mantenimiento de la homeostasis lipídica (Lee *et al.* 2006).

Los miARNs son cadenas pequeñas (alrededor de 22 nucleótidos) de ARN no codificante que fueron descubiertas por primera vez en el nematodo *Caenorhabditis elegans* (Lee *et al.* 1993, Wightman *et al.* 1993); y se encuentran en el genoma de la mayoría de las células eucarióticas y de algunos virus. Los miARNs maduros derivan de un precursor llamado pri-miARN compuesto de cientos o miles de nucleótidos que constituyen unidades transcripcionales mono o policistrónicas (Ambros 2003, Ambros 2004, Filipowicz *et al.* 2008, Bartel 2009). La sobreexpresión de miR-122 provoca el aumento en la expresión de genes implicados en la síntesis del colesterol (HMGCoA sintasa 1, escualeno epoxidasa y Δ^7 reductasa) en el hígado, y en consecuencia tiene lugar una activación de su biosíntesis (Krutzfeldt *et al.* 2005).

Otro miARN que resulta relevante en el metabolismo lipídico es el miR-33, está localizado en el intrón 16 del gen *sterol regulatory element-binding protein gen* en humano, y controla genes implicados en la síntesis y captación de colesterol (Fernandez-Hernando *et al.* 2011). miR-33 ha sido identificado como un regulador post-transcripcional de la homeostasis del colesterol (Marquart *et al.* 2010, Najafi-Shoushtari *et al.* 2010, Rayner *et al.* 2010).

3.3. Lipoproteínas

Las lipoproteínas son complejos macromoleculares compuestos por proteínas y lípidos. Los lípidos son insolubles en la sangre (medio acuoso) y para ser transportados se asocian entre ellos y con las apolipoproteínas, excepto los AGs que se unen a la albúmina, formando así las lipoproteínas plasmáticas. Las lipoproteínas tienen una estructura semiesférica (pseudomicela) y albergan en su interior los lípidos más apolares (hidrofóbicos) como triglicéridos y ésteres de colesterol, mientras que los fosfolípidos, el colesterol y las apolipoproteínas ocupan la superficie (hidrofílica), la cual facilita la estabilidad en el medio acuoso. Las lipoproteínas transportan triglicéridos y colesterol de unos tejidos a otros y también transportan otros lípidos como las vitaminas liposolubles (acetato de retinol, tocoferol y carotenoides) (Fernandez *et al.* 2005).

En el plasma se pueden encontrar cuatro grandes clases de lipoproteínas según su densidad. Los quilomicrones (plasma postprandial), con una densidad inferior a 0,95 kg/L, VLDL (lipoproteínas de muy baja densidad, $d= 0.95-1.006$ kg/L,) IDL (lipoproteínas de densidad intermedia, $d= 1.006-1.019$ kg/L), LDL (lipoproteínas de baja densidad, $d=$

1.019-1.063 kg/L) y las HDL (lipoproteínas de alta densidad, $d = 1.063-1.21$ kg/L). El peso específico de las distintas lipoproteínas viene determinado por la proporción de lípidos frente a proteínas que poseen y es decreciente, desde los quilomicrones hasta las HDL. En general, en los quilomicrones y las VLDLs, los lípidos más abundantes son los triglicéridos, mientras que el colesterol es más abundante en las LDLs, en los humanos estas lipoproteínas transportan alrededor del 70% del colesterol plasmático. En las HDLs el componente mayoritario es la proteína, seguida de los fosfolípidos (Fernandez et al. 2005).

Las apolipoproteínas son las proteínas que forman parte de las lipoproteínas, son esenciales ya que estabilizan su estructura y determinan el destino metabólico de los componentes lipídicos y del conjunto de la partícula. Han sido identificadas numerosas proteínas y su nomenclatura hace uso de las letras del abecedario precedido del afijo apo (Fernandez et al. 2005).

3.3.1. Receptores de lipoproteínas

El **receptor de lipoproteínas de baja densidad (R-LDL)** es una glicoproteína de 839 aminoácidos presente en la membrana celular de la mayoría de los tejidos, que permite la captación y posterior degradación de las LDL. El R-LDL reconoce tanto la apo B-100 como la apo E, apolipoproteínas que están presentes, bien una o ambas, en las LDL, VLDL, IDL y una subpoblación de HDL (Fernandez et al. 2005).

Los **receptores scavenger (SR)** o receptores basureros son una superfamilia de glicoproteínas integrales de membrana implicadas en el reconocimiento de estructuras polianiónicas ya sean endógenas (por ejemplo LDL oxidadas) o bien exógenas (por ejemplo lipopolisacárido bacteriano). La familia de los SR tiene una gran diversidad estructural y puede clasificarse en ocho clases diferentes (A-H) basándose en su estructura multidominio (van Berkel 2005). En nuestro caso nos centraremos en los SR de clase B.

La **familia de los SRs clase B (SR-B)** que incluye a las proteínas: receptor de trombospondina y colágeno tipo I (CD-36), receptor *scavenger* clase B tipo I (SR-BI), receptor *scavenger* clase B tipo II (SR-BII), proteína lisosomal integral de membrana II (LIMP2) y análogo-1 de CD36 y LIMP2 (CLA-1) (Fernandez et al. 2005). Todas las proteínas SR clase B tienen una estructura similar, fuertemente unida a la membrana a través del extremo N-terminal que está acilado y glicosilado, y que consta de un bucle extracelular largo, dos dominios transmembrana y dos dominios citoplasmáticos o intracelulares cortos N-terminal y C-terminal (ver figura 11) (Hoekstra et al. 2010).

CD36 y SR-BI representan dos proteínas distintas que derivan de dos genes diferentes localizados en el cromosoma 5 en el ratón, y 7 y 12, respectivamente, en humanos (Webb et al. 1998). Por otro lado, el clonaje en rata de la secuencia del ADNc de LIMP2 reveló que comparte una secuencia estructural de aminoácidos con CD36, lo que indica que ambas proteínas pertenecen a la misma familia de genes (Vega et al. 1991). Además se identificó y aisló una secuencia de ADN en humanos que también correspondía a esta familia de proteínas, conocido como CLA-1 (Calvo & Vega 1995).

CD36 es una glicoproteína de 88 kDa participa en numerosos procesos biológicos relacionados con la aterosclerosis y la trombosis. Pertenece a una familia de genes que se han conservado durante la evolución de los vertebrados (Calvo & Vega 1995).

CD36 se expresa en la membrana celular de plaquetas, adipocitos, músculo esquelético y cardiaco, células endoteliales de los capilares, fagocitos, células epiteliales del intestino, riñones y mamas (Febbraio *et al.* 2001). El amplio rango de expresión de esta proteína refleja su multifuncionalidad. CD36 fue identificada primeramente como una proteína receptora de la glicoproteína de matriz trombospondina-1 (Asch *et al.* 1987), y después se demostró que se unía a otras proteínas que contienen la llamada región estructural homóloga a trombospondina-1, entre las que se incluyen la trombospondina-2 y el inhibidor-1 de la angiogénesis cerebral (Kaur *et al.* 2009). También se conoce a CD36 como translocasa de ácidos grasos porque une AG libres de cadena larga (AGCL) y facilita su transporte a las células (Abumrad *et al.* 1993).

LIMPII es una glicoproteína de 72 kDa que se expresa en la membrana de los lisosomas sin un patrón limitado a un determinado tipo celular (Barriocanal *et al.* 1986, Vega *et al.* 1991). La unión de los lisosomas a LIMPII depende de la secuencia de aminoácidos de la cola citoplásmica (Vega *et al.* 1991).

En cuanto al receptor **CLA-1**, se clonó en humanos (Calvo & Vega 1993) y comparte una secuencia de 509 aminoácidos con la proteína SR-BI (Muraio *et al.* 1997). Mediante el análisis realizado con la técnica *Northern blot*, se demostró que, en humanos, el mensajero de 2.9 kb de CLA-1 se expresa en glándulas adrenales, hígado y testículos; esto sugiere que CLA-1, al igual que SR-BI, juega un papel en el metabolismo de las HDLs. CLA-1 se expresa también en monocitos donde reconoce LDLs modificadas y nativas y fosfolípidos aniónicos. Muraio y cols., demostraron que CLA-1 se une de forma selectiva a los timocitos, lo que sugiere que CLA-1 tiene un doble papel, por un lado actúa como mediador en la captación de HDLs en el hígado y en tejidos esteroideogénicos, y por otro lado, en leucocitos tendrá un papel alternativo (Muraio *et al.* 1997).

SR-BI es una proteína de 509 aminoácidos, glicosilada de 82-85 KDa (Acton *et al.* 1994) con una estructura similar al resto de su familia (Al-Jarallah & Trigatti 2010). Ha sido clonado en varias especies como son hámster (Acton *et al.* 1994), y murinos (Acton *et al.* 1996).

SR-BI se une a una gran variedad de ligandos, entre los que se incluyen lipoproteínas nativas y modificadas, proteínas modificadas del suero como la albúmina del suero glicosilada y maleilada, vesículas lipídicas que contienen fosfolípidos aniónicos, células apoptóticas y componentes de la superficie de las bacterias como lipopolisacáridos (Ohgami *et al.* 2001, Rigotti *et al.* 2003, Rhainds *et al.* 2004). A parte de unir todos estos ligandos, el grupo de Krieger en 1997, utilizando ratones *KO* para SR-BI, esclareció que dicha proteína tiene un papel múltiple en el metabolismo del colesterol y los esteroides (Babitt *et al.* 1997), y un papel crítico en el metabolismo de HDL (Acton *et al.* 1996, Rigotti *et al.* 2003, Rhainds *et al.* 2004). Las partículas grandes de α -HDL, ricas en colesterol esterificado se unen a SR-BI con más afinidad que las pequeñas y que las pobres en lípidos

pre- β HDL o lípidos libres de apo-AI (Liadaki *et al.* 2000, Lund-Katz *et al.* 2003). El contenido relativo de apo-AI frente apo-AII en las α -HDL afecta a la interacción de la partícula de HDL con SR-BI. Así, SR-BI une con gran afinidad partículas de HDL enriquecidas en apo-AII (Pilon *et al.* 2000). Por lo tanto, el SR-BI media la captación selectiva de ésteres de colesterol, fosfolípidos, triglicéridos y vitaminas lipolíticas solubles como el α -tocoferol a partir de las partículas de HDL (Rigotti *et al.* 2003). SR-BI también media la salida de colesterol no esterificado intracelular a las lipoproteínas de forma pasiva en un proceso independiente de energía (Ji *et al.* 1997, Jian *et al.* 1998, Yancey *et al.* 2000, de la Llera-Moya *et al.* 2001, Thuahnai *et al.* 2004, Pownall 2006). En resumen, SR-BI media el movimiento bidireccional de lípidos entre células y lipoproteínas, la dirección que tome depende del gradiente de concentración (Ji *et al.* 1997, Jian *et al.* 1998, Yancey *et al.* 2000, von Eckardstein *et al.* 2001, de la Llera-Moya *et al.* 2001, Thuahnai *et al.* 2004, Pownall 2006).

En las células en cultivo, SR-BI y SR-BII se localizan en los dominios de la membrana celular ricos en colesterol y esfingolípidos, los *lipid rafts* (Babitt *et al.* 1997, Webb *et al.* 1998, Uittenbogaard *et al.* 2000, Mineo & Shaul 2003).

SR-BI se expresa en tejidos donde hay una gran demanda de colesterol, como son los tejidos esteroideogénicos; en éstos su regulación está coordinada con la producción de hormonas esteroideas; y en el hígado donde su expresión, en ratas, se inhibe por estrógenos (Acton *et al.* 1996, Landschulz *et al.* 1996, Rigotti *et al.* 1996).

En ratones se ha visto que, un incremento en la expresión de SR-BI en el tejido hepático se relaciona con un descenso en plasma de las HDLs y un aumento del colesterol biliar (Kozarsky *et al.* 1997). Por otro lado, la alteración del gen de SR-BI conlleva un aumento de la concentración de colesterol en plasma de ratones (Rigotti *et al.* 1997). Además, estudios experimentales han demostrado que la deficiencia de SR-BI está asociada con la alteración de la composición, la estructura y la abundancia de las lipoproteínas. Se ha visto también, que los ratones hembra *KO* para SR-BI tienen una alteración del desarrollo de sus gametos y una muerte de los oocitos antes de la ovulación y, por este motivo, son estériles (Webb *et al.* 1997).

El **SR-BII** es una isoforma del gen de SR-BI, que se origina por un ajuste alternativo del ARNm de SR-BI y representa un 40% del total de ARNm de SR-BI y SR-BII. La proteína SR-BII difiere de SR-BI únicamente en que tiene una cadena C-terminal citoplásmica más corta que SR-BI (Webb *et al.* 1998). SR-BII también une HDLs con alta afinidad (Webb *et al.* 1997). Pero SR-BII no moviliza los depósitos intracelulares de ésteres de colesterol, al ser menos eficiente promoviendo el flujo de salida de colesterol de la célula (Webb *et al.* 1997).

3.3.1.1. Vías de señalización dependientes de SR-BI

El comienzo de la señal por la unión a SR-BI requiere varios mecanismos:

- El flujo de colesterol, es necesario para la iniciación de la señal (Saddar *et al.* 2010).

- El dominio C-terminal de interacción de SR-BI con PDZ (*postsynaptic density protein*) (incluyendo K509), que media la interacción directa con la proteína adaptadora PDZK1 (*PDZ postsynaptic density protein (PSD-95)/Drosophila discs-large (dlg)/tight-junction protein ZO1*) (ver figura 11) (Saddar *et al.* 2010).
- El dominio transmembrana C-terminal (CTTM) de SR-BI, que es requerido para la señalización. CTTM une colesterol celular y es importante en la señalización desencadenada gracias a este receptor (Saddar *et al.* 2010).

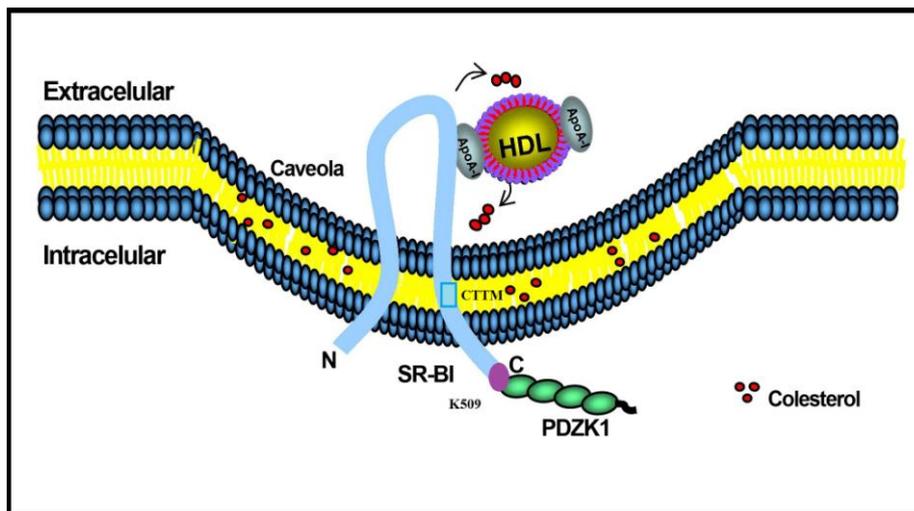


Figura 11. Esquema de la membrana celular y una caveola en la que se representa la ubicación de SR-BI, se distinguen los dominios transmembrana, las dos colas citoplásmicas y el bucle extracelular. Abreviaturas: HDL: lipoproteína de alta densidad, ApoA-1: apolipoproteína A 1, SR-BI: receptor *scavenger* clase B tipo I, PDZK: *PDZ postsynaptic density protein (PSD-95)/Drosophila discs-large (dlg)/tight-junction protein ZO1*, N: dominio amino terminal, C: dominio carboxilo terminal. Adaptado de (Al-Jarallah & Trigatti 2010).

3.3.1.1.1. Mediador de la captación de lípidos

Entre los diversos lípidos bioactivos que transporta HDL se encuentra el S1P (precursor de la esfingosina) (Rodríguez *et al.* 2009, Sattler & Levkau 2009). SR-BI podría mediar la transferencia de HDL asociada a S1P a través de la membrana, permitiendo el acceso de S1P a través de su receptor a una proteína G, iniciaría una cascada de señalización. Los receptores de S1P se han asociado con receptores de factores de crecimiento, esto aumenta la probabilidad de que SR-BI esté, además, asociado directa o indirectamente vía proteínas de adaptación, con uno o varios receptores de S1P participando en el engranaje de la cascada de señalización (ver figura 12) (Al-Jarallah & Trigatti 2010).

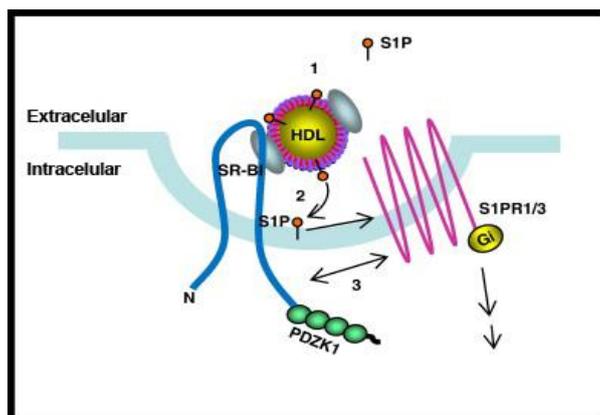


Figura 12. Esquema en el que se representa a SR-BI como mediador de la captación de lípidos en la membrana celular. Abreviaturas: HDL: lipoproteína de alta densidad, SR-BI: receptor *scavenger* clase B tipo I, PDZK: *PDZ postsynaptic density protein (PSD-95)/Drosophila discs-large (dlg)/tight-junction protein ZO1*, N: dominio amino terminal, C: dominio carboxilo terminal, S1P: precursor de esfingosina, S1PR: receptor de S1P, Gi: proteína G inhibidora. Adaptado de (Al-Jarallah & Trigatti 2010).

3.3.1.1.2. Regulador del colesterol de la membrana plasmática

El colesterol de las caveolas depende de rutas que están reguladas por la actividad de un complejo fosfatasa de alto peso molecular. Este complejo fosfatasa PPA2A/HePTP tiene una doble actividad serina/treonina y tirosina fosfatasa. El ensamblaje y la activación de este complejo depende del colesterol de las caveolas y la extracción del colesterol de dichas caveolas inhibe la formación de dicho complejo. Esto disminuye la desfosforilación de las proteínas quinasa dianas como ERK1/2, prolongándose así la activación de las rutas en las que están implicadas estas quinazas (Harada et al. 2003). Se sabe que ERK1/2 es diana de activación de SR-BI (Mineo et al. 2003, Baranova et al. 2005, Zhang et al. 2007, Osada et al. 2009). De este modo, el que HDL y SR-BI medien las alteraciones en la distribución/contenido del colesterol de la membrana plasmática podría deberse, en parte, a la activación de ERK1/2 por acción de SR-BI (ver figura 13) (Al-Jarallah & Trigatti 2010).

1.1.1.1.1. Procesos de señalización e interacción con proteínas

La proteína PDZK1 (también llamada CLAMP) es una proteína del citosol de 70 kDa que se une al dominio C-terminal de SR-BI (ver figura 11) y, en hepatocitos, se ha visto que esta unión es importante para la estabilidad de SR-BI (Ikemoto et al. 2000). Además, en células endoteliales se ha comprobado que es importante en la cascada de señalización que surge a partir de SR-BI (Kimura et al. 2006, Yesilaltay et al. 2006). PDZK1 contiene cuatro dominios PDZ, el dominio N-terminal de PDZ es el que interacciona con el extremo C-terminal de SR-BI (Ikemoto et al. 2000, Silver et al. 2002). Esta proteína, en humanos, se expresa mayoritariamente en las glándulas adrenales y en los ovarios y testículos; sin embargo, en ratón la expresión de PDZK1 en estos tejidos es mínima, expresándose en mayor cantidad en el hígado, riñón y los intestinos (Acton et al. 1996, Ikemoto et al. 2000, Kocher et al. 2003, Yesilaltay et al. 2006, Komori et al. 2008).

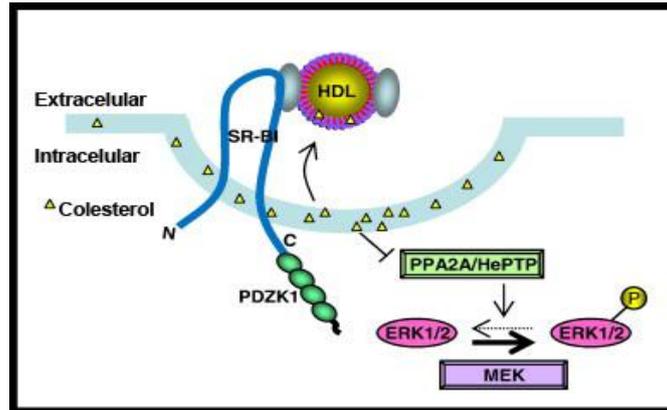


Figura 13. Esquema en el que se representa a SR-BI como regulador del colesterol de la membrana celular. Abreviaturas: HDL: lipoproteína de alta densidad, SR-BI: receptor *scavenger* clase B tipo I, PDZK: *PDZ postsynaptic density protein (PSD-95)/Drosophila discs-large (dlg)/tight-junction protein ZO1*, N: dominio amino terminal, C: dominio carboxilo terminal, PPA2A/HePTP: complejo fosfatasa, ERK: quinasas regulada extracelularmente, MEK: quinasa MAPK/ERK. Adaptado de (Al-Jarallah & Trigatti 2010).

Estudios realizados en endotelio de aorta bovina han revelado que la familia de las quinasas SRC participa en procesos de señalización que son activados por HDL-SR-BI (Zhu *et al.* 2008). Además, experimentos de coimmunoprecipitación revelan que c-SRC interacciona con SR-BI. Aunque la activación de c-SRC y de la señalización es dependiente de PDZK-1, la interacción entre c-SRC y SR-BI no es dependiente de PDZK1. Estos hallazgos sugieren que PDZK-1 modifica la localización o la función de las quinasas que son requeridas para la fosforilación de c-SRC que es inducida por HDL-SR-BI y, o bien es otra molécula adaptadora la que media la unión de c-SRC a SR-BI, o es una interacción proteína-proteína directa entre c-SRC y el receptor (Saddar *et al.* 2010). La activación de SRC conlleva la activación de la PI3K, y ésta induce la activación de las rutas de MAPK y Akt (ver figura 14) (Saddar *et al.* 2010).

La interacción de HDL con SR-BI y la consecuente activación de moléculas de señalización ha sido demostrada en muchas de las acciones ateroprotectoras de HDL, como por ejemplo, la activación de la óxido nítrico sintasa endotelial (Li *et al.* 2002, Seetharam *et al.* 2006), la regulación de la migración endotelial de células (Seetharam *et al.* 2006) y la inhibición de moléculas de adhesión (Kimura *et al.* 2006, Mineo & Shaul 2007, Okajima *et al.* 2009).

Estudios realizados en células de ovario de hámster evidencian que la actividad selectiva de SR-BI está regulada por las vías de señalización de la proteína quinasa C (PKC) y por PI3K. La activación de PKC por un lado, y la inhibición de PI3K por el otro, aumentan la eficiencia de la mediación de SR-BI en la captación selectiva de lípidos, mientras que, la inhibición de PKC y la activación de PI3K disminuye dicha eficiencia (Zhang *et al.* 2007).

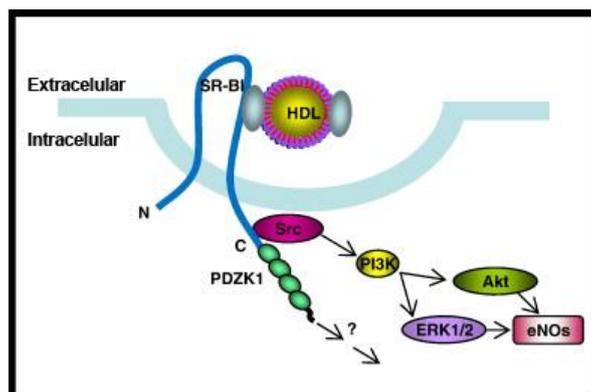


Figura 14. Esquema en el que se representa a SR-BI interaccionando con moléculas de señalización en la membrana celular. Abreviaturas: HDL: lipoproteína de alta densidad, SR-BI: receptor *scavenger* clase B tipo I, PDZK: *PDZ postsynaptic density protein (PSD-95)/Drosophila disc-large (dlg)/tight-junction protein ZO1*, N: dominio amino terminal, C: dominio carboxilo terminal, ERK: quinasas regulada extracelularmente, PI3K: fosfatidilinositol-3 quinasa, eNOS: óxido nítrico sintasa endotelial, AKT: proteína quinasa B. Adaptado de (Al-Jarallah & Trigatti 2010).

1.2. El colesterol en el testículo

La esteroidogénesis y la gametogénesis o espermatogénesis en los testículos son procesos íntimamente ligados al metabolismo del colesterol. El papel del colesterol difiere en los dos compartimientos de los testículos. En el tejido intersticial o células de Leydig, el colesterol es necesario para la síntesis de testosterona y otras hormonas esteroideas (esteroidogénesis), mientras que en los túbulos seminíferos, el colesterol y alguno de sus precursores son necesarios para la gametogénesis. El contenido de colesterol en la membrana celular de las células germinales puede influir en la fertilidad de los gametos (Kabbaj et al. 2003). En el testículo durante la maduración de los espermatozoides, que tiene lugar en el epidídimo, hay un aumento de los niveles de colesterol (Parks & Hammerstedt 1985, Rana et al. 1991), mientras que éstos niveles descienden durante la capacitación (Go & Wolf 1983). Estas oscilaciones de los niveles de colesterol se asocian con la inducción de la fertilidad y la motilidad en los gametos masculinos (Haidl & Opper 1997). Es más, la alteración en la proporción del colesterol de membrana en los espermatozoides se identifica como una causa de infertilidad en el humano (Sugkraroek et al. 1991).

La homeostasis del colesterol celular es un sistema estrechamente regulado, en el que la cantidad de colesterol no esterificado, que se encuentra en las células, está controlada por la relación entre la captación de colesterol y la síntesis, esterificación e hidrólisis de los ésteres de colesterol resultantes (Gwynne & Strauss 1982, Goldstein & Brown 1990). Una de las vías para la obtención de colesterol necesario para la esteroidogénesis y la espermatogénesis es la captación selectiva de los ésteres de colesterol mediada por los SR-B. El colesterol, captado a través de estos receptores en las células de los testículos, además de ser utilizado para la síntesis de testosterona y otras hormonas esteroideas, es un metabolito necesario en la gametogénesis.

El colesterol utilizado para la esteroidogénesis y espermatogénesis procede de diferentes fuentes (Gwynne & Strauss 1982): i/ síntesis de colesterol de novo, ii/ movilización de los ésteres de colesterol almacenados por acción de las enzimas con actividad colesterol éster hidrolasa o HSL, iii/colesterol de las lipoproteínas captadas por endocitosis a través del R-LDL y los SR-B mediante una vía de captación selectiva de los ésteres de colesterol que no implica la degradación lisosomal de la lipoproteína (Rigotti et al. 2003).

En los túbulos seminíferos hay una cantidad considerable de colesterol (Bartke 1971), la membrana basal del túbulo bloquea la entrada de las LDL desde los capilares sanguíneos, mientras que permite la entrada de las HDL (Fofana *et al.* 1996). Las HDL son la fuente principal de colesterol para las células de Sertoli (Fofana *et al.* 2000). La concentración de colesterol libre en el tejido intersticial es igual a la del interior de los túbulos (Kabbaj et al. 2001, Kabbaj et al. 2003, Akpovi *et al.* 2006), ello sugiere la existencia de mecanismos capaces de mantener el equilibrio entre la entrada y salida de colesterol (Kabbaj et al. 2003). Aunque algunos investigadores sostienen que las células de Sertoli poseen la capacidad de sintetizar colesterol *in vitro* (Wiebe & Tilbe 1979), esto no se ha podido confirmar en estudios *in vivo*; por ello parece que estas células dependen del colesterol extracelular. Una de las fuentes principales de colesterol para las células de Sertoli es la fagocitosis de las células apoptóticas que se producen durante la espermatogénesis. Así, son internalizadas las gotas de lípidos ricas en colesterol esterificado contenido en los cuerpos residuales de las espermátidas (Hermo *et al.* 2010), y se mantiene la homeostasis de colesterol en los túbulos seminíferos.

Sin embargo, la mayor parte del colesterol utilizado para la esteroidogénesis y gametogénesis en los murinos, se obtiene de la captación selectiva de los ésteres de colesterol de las lipoproteínas HDL vía SR-Bs. Los ésteres de colesterol son hidrolizados a colesterol libre por la acción de las enzimas con actividad colesterol éster hidrolasa. Entre ellas, la enzima principal en los testículos, es la HSL. Por ello, la HSL es un regulador clave del metabolismo del colesterol en los tejidos esteroidogénicos (glándulas adrenales, ovarios y testículos) (Arenas *et al.* 2004, Kraemer *et al.* 2004, Vallet-Erdtmann *et al.* 2004, Lobo et al. 2009), donde se encuentra muy expresada y es responsable de la hidrólisis de los ésteres de colesterol almacenados en el tejido, así como de los ésteres de colesterol captados selectivamente de las lipoproteínas a través de los SR-B(Kabbaj et al. 2003).

La dislipemia producida bien por la obesidad o bien por el síndrome metabólico está asociada a infertilidad, además, hay una estrecha relación entre la fertilidad y los cambios en el metabolismo del colesterol (Gorbachinsky *et al.* 2010, Saez Lancellotti *et al.* 2010).

Como dijimos en el apartado correspondiente a la regulación del metabolismo del colesterol, los receptores nucleares LXRs son importantes en la regulación del metabolismo del colesterol (Peet *et al.* 1998, Tontonoz & Mangelsdorf 2003). En estudios realizados con ratones *KO* para LXR α y LXR β se han encontrado afectadas varias funciones

del testículo como la esteroidogénesis, el metabolismo lipídico y el balance de proliferación-apoptosis de las células germinales (El-Hajjaji *et al.* 2011).

Los esteroides mediadores de la meiosis son intermediarios activos en la biosíntesis de colesterol y se acumulan fundamentalmente en las gónadas (Byskov *et al.* 1995, Rozman *et al.* 2005). La enzima lanosterol 14 α -desmetilasa es la primera enzima, post-lanosterol, en la ruta de biosíntesis de colesterol, y en los ovarios convierte el lanosterol en FF-MAS. Éste es metabolizado por acción de la enzima Δ^{14} reductasa a T-MAS que se acumula en los testículos (Green *et al.* 2010). En ratas jóvenes y adultas ha sido demostrado que las células germinales post-meióticas expresan ARNm de la lanosterol 14 α -desmetilasa y tienen una elevada actividad de dicha enzima (Stromstedt *et al.* 1998).

2. ÁCIDOS GRASOS

Los ácidos grasos (AG) son esenciales para la vida ya que son la principal fuente de energía y el componente mayoritario de las membranas. Forman parte de una gran variedad de moléculas entre las que se incluyen ceras, esteroides, glicerofosfolípidos, esfingolípidos y triacilgliceroles. Algunos AG son claves en funciones biológicas tales como la regulación del metabolismo de lípidos, la división celular y la inflamación, y actúan como moléculas de señalización (Duplus & Forest 2002, Cao *et al.* 2008, Zhu *et al.* 2009).

2.1. Clases de ácidos grasos y nomenclatura

Los AG y los aceites forman parte de la dieta de los seres humanos, entre estos se incluyen los AG saturados (AGS) y los AG mono- y poliinsaturados (AGM y AGP o PUFA, respectivamente).

Los AGS carecen de dobles enlaces, mientras que los AGM presentan un doble enlace y los AGP presentan más de uno. Estos últimos se clasifican en tres grupos basados en su estructura química: omega-3 (ω -3), omega-6 (ω -6) y omega-9 (ω -9); en los cuales el primer doble enlace se sitúa en el carbono 3, 6 y 9, respectivamente, contando desde el grupo metil al final de la molécula. También se denominan como n-3, n-6 y n-9.

Los animales no pueden sintetizar *de novo* los AGP n-3 ni n-6 puesto que no poseen la enzima AG desaturasa apropiada, por lo que se consideran esenciales. La ruta de síntesis de los AGP se origina con el ácido linoleico (LA, C18:2, n-6) en el caso de la serie n-6 y el ácido α -linolénico (ALA, C18:3, n-3) para la serie n-3 (ver figura 15). Ambos son aportados por la dieta y son necesarios para numerosos procesos entre los que se encuentran el crecimiento, la reproducción, la visión y el desarrollo del cerebro (Lazar *et al.* 2004, Wathes *et al.* 2007).

Existen numerosos **sistemas de nomenclatura para los AG**, sin embargo algunos de estos sistemas no proveen de la suficiente información sobre la estructura de los mismos. Uno de los sistemas de nomenclatura usados es “*the International Union of Pure*

and Applied Chemistry" [IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature, 1978]. El sistema IUPAC nombra a los AG basándose en el número de átomos de carbono, y el número y la posición de las insaturaciones a partir del grupo carboxilo. El carbón del grupo carboxilo se considera el primero (1) y los carbonos de la cadena del AG se numeran consecutivamente desde éste.

Por convenio, una unión específica a la cadena es identificada por el carbono de menor número al que está unido. Las dobles uniones se denominan como Z o E, según sean el mismo o distinto lado, aunque es más común el uso de *cis* o *trans*, respectivamente. Aunque la nomenclatura de la IUPAC es precisa y técnicamente clara, los nombres de los AG son demasiado largos y, por convenio, se han adoptado nombres y anotaciones más cortas usadas frecuentemente en los escritos científicos. Hay varias anotaciones cortas para los AG pero todas adoptan la forma C:D, donde C es el número de átomos de carbono y D es el número de dobles enlaces de la cadena de carbonos. Los bioquímicos y los nutricionistas utilizan habitualmente el sistema "n-número" referente a la posición del doble enlace más próximo al grupo metilo final de la molécula de AG. La posición de otros dobles enlaces, si los hubiera, no se especifica. Así por ejemplo, el LA sería C18:2 (n-6) (Figura 15) porque el doble enlace está en el carbono 6 desde el carbono metilo. Esta nomenclatura no es aplicable para los AG *trans* (Ratnayake & Galli 2009).

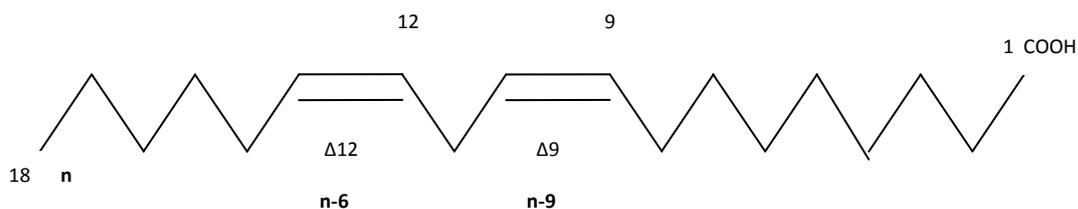
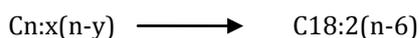


Figura 15. Nomenclatura de los ácidos grasos con el ejemplo del ácido linoleico.



n = longitud de la cadena = 18 carbonos

x = 2 dobles enlaces

n-y = n-6 posición del primer doble enlace desde el grupo metilo final

2.2. Síntesis de ácidos grasos

Un elevado catabolismo de la glucosa da lugar a un exceso del producto final de la glicólisis, el piruvato. La mayoría del piruvato es convertido a lactato pero otra parte se transforma en acetil-CoA; el cual es utilizado para la síntesis *de novo* de los AG (Mashima *et al.* 2009). Así pues, el acetil-CoA se combina con series de malonil-CoA para formar AGS de diferente longitud de carbonos, dando como producto final ácido palmítico (C16:0). Éste puede ser elongado a ácido esteárico (C18:0) e incluso a mayores AGS mediante más adiciones de grupos acetilos, gracias a la acción de las enzimas elongasas de AG (ELOVL) (ver figura 16).

Los **AGM de la serie n-9** se originan por la acción de la Δ^9 desaturasa o esteroil CoA desaturasa (Δ^9 D o SCD); la cual es una enzima de RE muy activa en mamíferos que se encarga de introducir dobles enlaces en la posición 9-10 de la cadena de AG. El principal producto de la Δ^9 desaturación es el ácido oleico (C18:1, n-9), también se forman pequeñas cantidades de ácido hipogeico (C16:1, n-9). Los AGM de mayor número de carbonos de la serie n-7 y n-9 como el ácido palmitoleico (C16:1, n-7) pueden ser sustratos de la enzima ELOVL produciendo ácido cis-vacénico (C18:1, n-7); o a partir del ácido oleico (C18:1, n-9), el ácido eicosenoico (C20:1, n-9), erúcico (C22:1, n-9) y nervónico (C24:1, n-9) (ver figura 16) (Ratnayake & Galli 2009).

Centrándonos en la **enzima SCD**, la alteración en su actividad tiene como consecuencia la afectación de algunas variables fisiológicas como son la diferenciación celular, la resistencia a insulina, la tasa metabólica, la adiposidad, la aterosclerosis, el cáncer y la obesidad (Paton & Ntambi 2009). Ha sido clonada en diversas especies de levaduras (*Drosophila* o *Caenorhabditis elegans*), en oveja, hámster, rata, ratón y humano. En ratón se han identificado cuatro isoformas distintas de la enzima: SCD-1, SCD-2, SCD-3 y SCD-4. Mientras que en humanos solo se expresan dos isoformas: SCD-1 y SCD-5 (Paton & Ntambi 2009). En el testículo, la SCD-2 es la enzima predominante; expresándose principalmente en las células de Sertoli. Mientras que en el epidídimo de ratas sexualmente maduras se expresan con altos niveles las enzimas SCD-1 y SCD-2, así como las Δ^5 y Δ^6 desaturasas (FADS1 y FADS2) (Saether *et al.* 2003).

En cuanto a la **síntesis de los AGP o PUFA**, esta se origina con el LA(C18:2, n-6) en el caso de la serie n-6 y el ALA (C18:3, n-3) para la serie n-3; ambos son AG esenciales obtenidos de la dieta (ver figura 16) (Ratnayake & Galli 2009). En los mamíferos, los ácidos LA (C18:2, n-6) y ALA (C18:3, n-3) son transformados en los ácidos araquidónico (C20:4, n-6) y docosapentaenoico (DPA, C22:5, n-6) (Mohammed *et al.* 1995), y en el ácido docohexaenoico (DHA, C22:6, n-3), respectivamente; (Voss *et al.* 1991) mediante pasos alternativos de elongaciones y desaturaciones (ver figura 16). Estas modificaciones incluyen las desaturaciones en Δ^5 y en Δ^6 , donde la enzima FADS2 cataliza el paso inicial y limitante en esta conversión (ver figura 16) (Brenner *et al.* 1977). Las enzimas FADS1 y FADS2 se expresan en mayor nivel en las glándulas adrenales, el hígado, el cerebro y los testículos y en menor medida en el tejido adiposo blanco y en los riñones (Matsuzaka *et al.* 2002).

El LA (C18:2, n-6) abunda en aceites vegetales como el de maíz, de girasol y el de colza (Lazar 2004). Mientras que los AGP n-3 se encuentran principalmente en los cloroplastos de los vegetales verdes (Mashima *et al.* 2009).

Por otro lado, la síntesis de AG también se puede utilizar para la producción de energía a través de la β -oxidación y la modificación lipídica de las proteínas (Mashima *et al.* 2009).

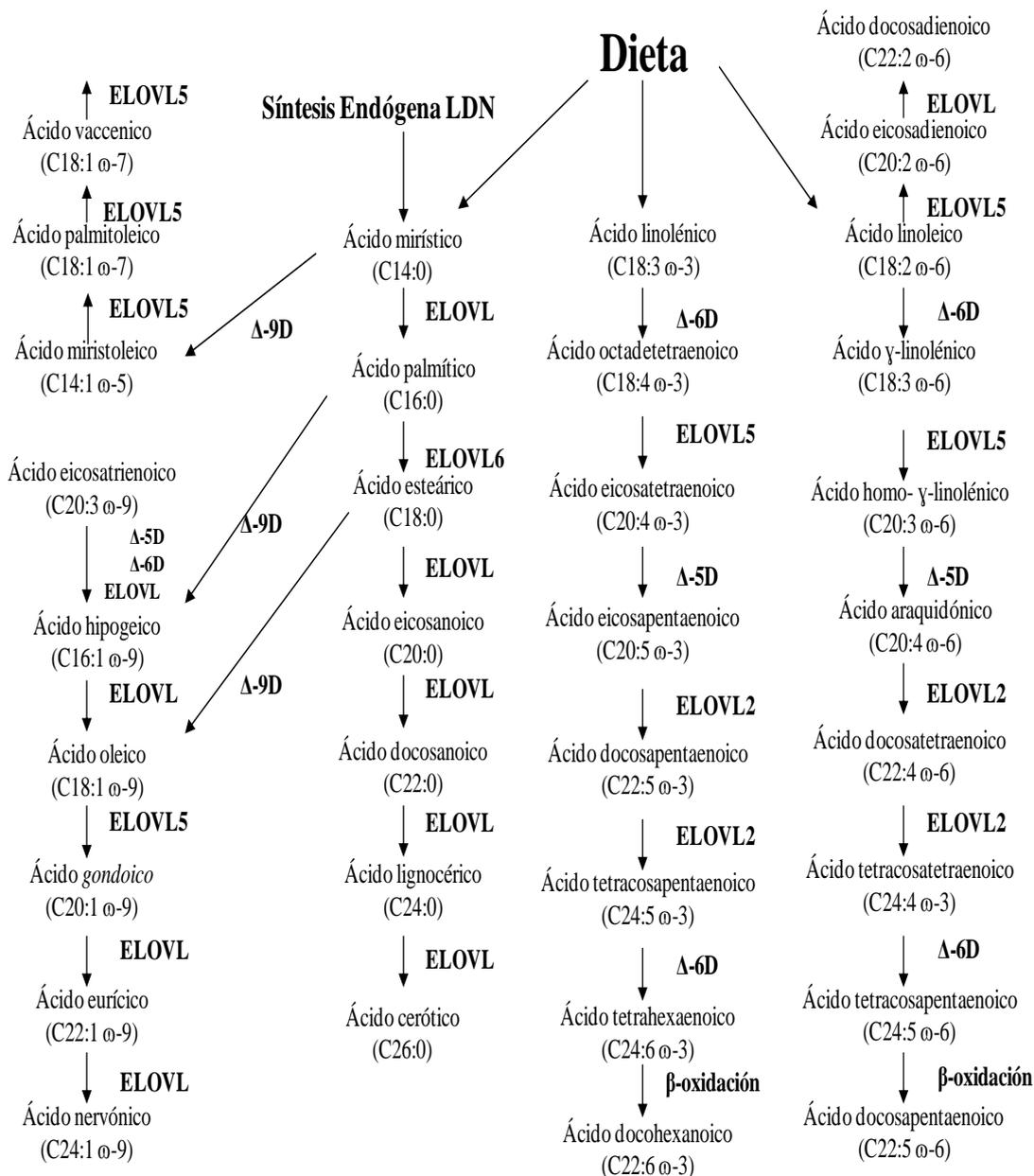


Figura 16. Esquema de la ruta de síntesis de ácidos grasos. Abreviaturas: LND: lipogénesis de novo. Las enzimas de la ruta son: ELOVL: elongasa de cadena larga, Δ-6D: Δ⁶ desaturasa o FADS2, Δ-5D: Δ⁵ desaturasa o FADS1, Δ-9D: Δ⁹ desaturasa o SCD.

2.3. Regulación de la síntesis de los ácidos grasos

Los activadores de la síntesis de AG, denominada lipogénesis *de novo*, son la insulina, la 3,5,3'-triyodotironina, los glucocorticoides y la glucosa; mientras el glucagón y la epinefrina, en el caso de los AGP, son supresores de esta lipogénesis de novo (Hillgartner *et al.* 1995, Jump & Clarke 1999, Jump 2004). Muchas células poseen la capacidad de modificar la estructura de los AG a través de rutas metabólicas de

desaturación, elongación, mono-oxidación y β -oxidación (que tiene lugar en el peroxisoma). Estas modificaciones las sufren tanto los AG procedentes de la síntesis *de novo* como los procedentes de la dieta. Estas rutas metabólicas juegan un papel importante en el mantenimiento de la composición lipídica de la membrana y la producción de precursores de ciertas moléculas de señalización, como los eicosanoides. Además, pueden contribuir al control de los AG que afectan a receptores nucleares (como por ejemplo el PPAR α) (Pawar *et al.* 2002, Pawar & Jump 2003, Jump 2004).

2.4. Plasmalógenos

Los peroxisomas son orgánulos encargados de muchas rutas metabólicas entre las que se incluyen la biosíntesis de plasmalógenos, un tipo de fosfolípidos, y la β -oxidación de AGCL (Brites *et al.* 2009). Los éteres-fosfolípidos o plasmalógenos son una clase de fosfolípidos caracterizados por la presencia de un enlace éter en la posición 1 (sn-1) del glicerol, en lugar del enlace éster presente en un diacilglicerolfosfolípido. En éstos la cadena alifática de la posición 1 está constituida por las cadenas de carbono del ácido palmítico (C16:0) o del oleico (C18:1), mientras que la posición 2 (sn-2) la ocupan un AGP y el grupo polar es comúnmente una etanolamina o una colina (ver figura 17) (Brites *et al.* 2004).

En los mamíferos, la distribución de los plasmalógenos varía entre los diferentes tejidos, los niveles mayores se encuentran en el tejido nervioso, los riñones y los testículos, mientras que en el hígado los niveles son más bajos. En el testículo, los plasmalógenos protegen a los espermatoцитos de la degeneración inducida por AGCL y de la apoptosis (Brites *et al.* 2009). Los plasmalógenos están implicados en varios procesos biológicos entre los cuales se encuentra la fluidez de la membrana, así como mediar en rutas de transducción de señales y proteger ante el estrés oxidativo (Wanders & Waterham 2006).

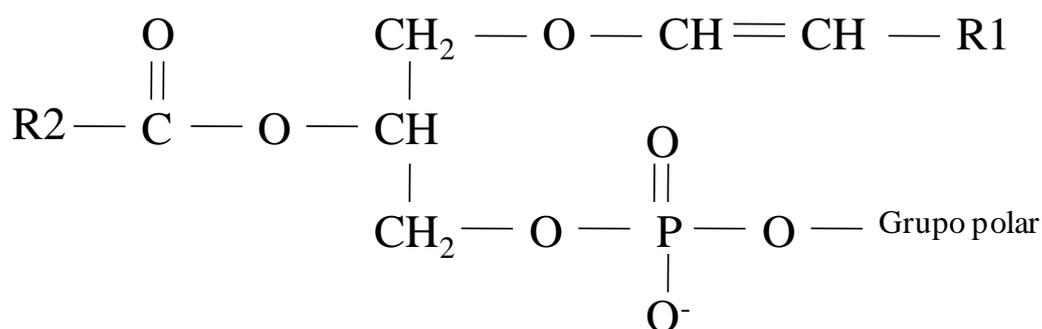


Figura 17. Esquema de un plasmalógeno. Abreviaturas: R: cadena carbonada, C: carbono, P: fósforo. H: hidrógeno. O: oxígeno.

2.5. Los ácidos grasos en el testículo

Los AG son tanto elementos estructurales como componentes bioactivos de las membranas celulares. Se sabe que los AGP de la serie n-6 o n-3 son esenciales para el desarrollo de los testículos y la fertilidad y que los testículos tienen un alto contenido en AGP de 20 a 22 carbonos que se acumulan en el esperma, su proporción depende de la especie (Burr & Burr 1973). En el caso de la rata (Chanmugam *et al.* 1991), conejos y otros

roedores (Ahluwalia *et al.* 1969) predominan los AGP n-6, y entre estos el DPA (C22:5, n-6). En cambio en humanos, el AGP mayoritario es el DHA (C22:6, n-3), siendo el mayoritario en las membranas de las células espermáticas (Lenzi *et al.* 2000). Mientras que los ratones poseen gran cantidad de DHA (C22:6, n-3) y DPA (C22:5, n-6) (Bieri & Prival 1965). Estos dos AG forman parte de los fosfolípidos de las membranas; además, son precursores de los AGCL que contienen entre 26 y 32 carbonos y que son componentes de los esfingolípidos presentes en las células espermáticas (Sandhoff *et al.* 2005).

Se especula que la función de los AGP en el testículo está relacionada con un posible efecto en la fluidez de la membrana y con el acoplamiento de los receptores a la misma, ya que el DHA (C22:6, n-3) incrementa la fluidez de la membrana y puede que también contribuya a la movilidad de los espermatozoides (Connor *et al.* 1998). Así pues, cambios en la fluidez de la membrana plasmática podrían impedir el ensamblaje y la activación de rutas de transcripción críticas para el proceso de fertilización (Wathes *et al.* 2007). Además, hay evidencias que muestran que las dietas suplementadas con AGP pueden influir en las rutas implicadas en la síntesis de prostaglandinas y en la esteroidogénesis, las cuales tienen múltiples papeles en la regulación de la función reproductiva. Es más, la composición de AGP en la membrana plasmática de las células del esperma y de los oocitos es importante durante la fertilización (Aitken & Baker 1995).

La delección del gen de la Δ^6 desaturasa (FADS2, ácido graso desaturasa 2) que anula el paso inicial y limitante de la cascada enzimática de la síntesis de AGP n-6 y n-3; provoca la falta de AGP y eicosanoides lo cual tiene como resultado la esterilidad de los ratones. Además, como consecuencia de esta baja disponibilidad de AGP, se suprime la síntesis de prostaglandinas, tromboxano, prostaciclina y leucotrienos (Stoffel *et al.* 2008). Por lo tanto respecto a la fertilidad masculina, los AGP son fundamentales por su capacidad para conferir a la membrana de las células espermáticas la fluidez necesaria para alcanzar la fertilización. Por otra parte, son componentes de una clase particular de glicosfingolípidos fucosilados que son necesarios para la fertilidad masculina (Wathes *et al.* 2007).

Estudios nutricionales han demostrado que las ratas con dietas deficientes en AG esenciales tienen atrofia testicular, la cual no es prevenida por la inclusión de LA (C18:2, n-6) en la dieta. Es más, las ratas criadas con dietas deficientes en LA (C18:2, n-6) son fértiles (Leat *et al.* 1983). Cuando las células tienen poca cantidad de AG esenciales sintetizan mayores cantidades de AGP n-9, lo cual da como resultado la aparición del AG C20:3 n-9 (*mead acid*) (Saether *et al.* 2007). Por tanto, los AG esenciales son necesarios para las funciones del testículo en ratas, incluida la espermatogénesis. Las células de Sertoli están provistas de un microambiente adecuado para el normal desarrollo y diferenciación de las células germinales, donde juega un importante papel el metabolismo de los AG esenciales (Griswold 1998, Retterstol *et al.* 2001).

La expresión de las desaturasas: SCD1, SCD2, FADS1 y FADS2, en las células de Sertoli está regulada de manera hormonal, estas cuatro desaturasas se inducen por acción

de la insulina, la dexametasona, y la FSH (Saether et al. 2003). Sin embargo, la regulación de estas desaturasas, SCD1, SCD2, FADS1 y FADS2, a través de la dieta en el testículo y en el aparato reproductor masculino todavía tiene que ser estudiado en profundidad (Saether et al. 2003).

El ácido araquidónico (C20:4, n-6) y sus metabolitos están implicados en la esteroidogénesis, a través de efectos directos sobre su maquinaria como es el caso de la proteína StAR, y el citocromo P450 (CYP11A1); o de forma indirecta, vía prostaglandinas. STAR juega un papel crítico en la regulación de la síntesis de esteroides (Stocco *et al.* 2005).

La implicación de la testosterona en la regulación del metabolismo de los AGP y de los lípidos que contienen ácidos polienoicos ha sido recogida en numerosos estudios. En ratas adultas, el suministro de testosterona induce un marcado incremento en la síntesis de los fosfolípidos del testículo y un significativo descenso de los triglicéridos (Sheriff 1980).

3. MICRODOMINIOS DE MEMBRANA *LIPID RAFT*/CAVEOLAS

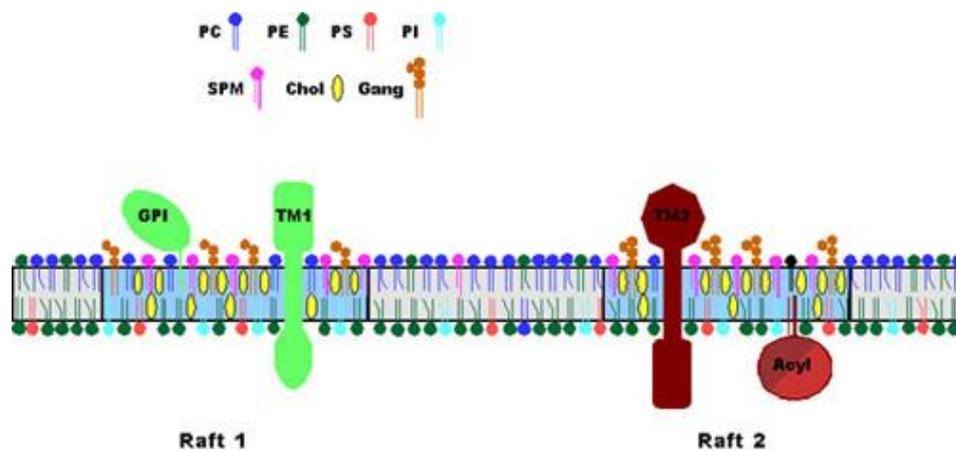
El modelo clásico de Singer-Nicolson de mosaico fluido de la membrana de las células consistía en una bicapa lipídica definida como un solvente bidimensional en el cual las proteínas difunden libremente (Singer & Nicolson 1972). Este concepto de modelo de membrana ha sido modificado sustancialmente. La membrana plasmática es una estructura celular estabilizada mediante la interacción espontánea entre moléculas lipídicas (Barenholz 2002). Los componentes principales de las membranas celulares son los glicerofosfolípidos y, aunque son suficientes para formar bicapas, las membranas de células eucariotas contienen además esfingolípidos y esteroides (Barenholz 2002, Mouritsen & Zuckermann 2004). El colesterol es el principal esteroide de las membranas de las células de los mamíferos, además del más estudiado (ver figura 18) (Barenholz 2002, Mouritsen & Zuckermann 2004).

El análisis por espectrometría ha revelado una diferencia importante en la composición lipídica en las diferentes regiones de la membrana plasmática. La cara extracelular está enriquecida en colesterol, esfingolípidos y glicoesfingolípidos, mientras que los glicerofosfolípidos que contienen etanolamina se hallan predominantemente en la cara citoplásmica de la membrana (Pike 2003). La presencia de esteroides en la membrana, tales como el colesterol, minimiza el volumen libre, reduciendo de ese modo la permeabilidad de la membrana (Mouritsen & Jorgensen 1994, Mouritsen & Jorgensen 1998). Éste se localiza en ambos lados interactuando preferentemente con esfingolípidos con cadenas laterales saturadas (Ohvo-Rekila *et al.* 2002, Munro 2003).

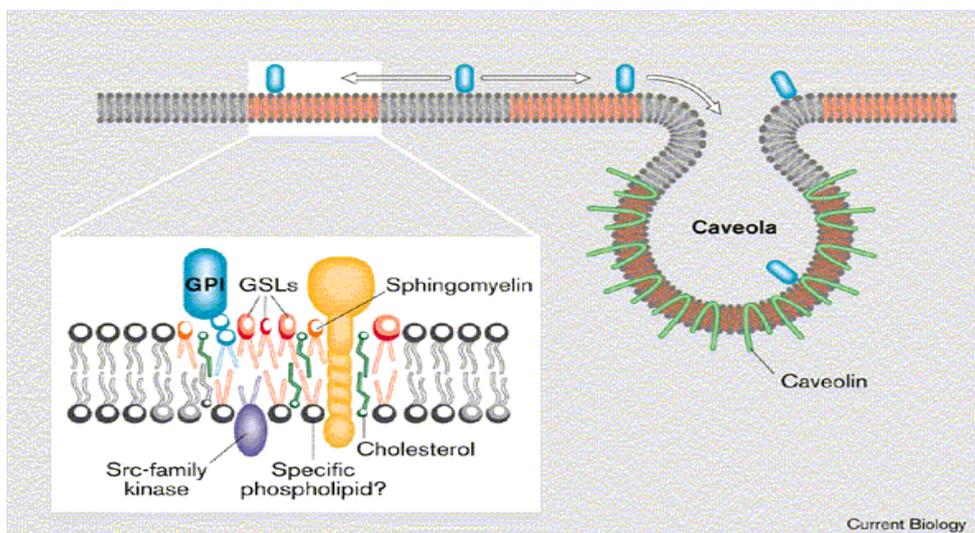
Las membranas sintéticas compuestas únicamente por glicerofosfolípidos (sin esteroides) pueden estar tanto en fase líquido cristalina (fluida) como en fase *liquid-disorder*, o fase en gel (sólida), conocida también como *solid ordered* (Ipsen *et al.* 1990, Mouritsen & Jorgensen 1994, Mouritsen & Jorgensen 1998, Barenholz 2000). El colesterol altera profundamente la estructura de la fase fluida (Yeagle 1985, Ohvo-Rekila *et al.* 2002,). En zonas de la membrana con alto contenido en colesterol y esfingolípidos, el colesterol se dispone entre las cabezas hidrofílicas de los esfingolípidos con cadenas laterales saturadas, permitiendo un mayor empaquetamiento de estas cadenas y engrosando la membrana. Estas zonas forman una fase ordenada entre las regiones de la fase fluida (Ipsen *et al.* 1987, Ipsen *et al.* 1989). A pesar de que el colesterol aumenta el orden y reduce la permeabilidad de las membranas, en estos dominios se permite un alto grado de movilidad lateral de los componentes en el plano de la bicapa (Owicki & McConnell 1980, Smith *et al.* 1980).

Estas regiones, ricas en colesterol y esfingolípidos que aportan orden a ciertas regiones de membrana se denominan *lipid raft* o balsas lipídicas (Pike 2003).

En el Keystone Symposium 2006 se llegó a un consenso para la definición de los *lipid rafts* que fue la siguiente: Los *lipid rafts* son pequeños dominios (10-200 nm), heterogéneos, altamente dinámicos ricos en colesterol y esfingolípidos, que compartimentan procesos celulares (Pike 2006).



A



B

Figura 18. Esquema de los *lipid rafts* (A) y las *caveolas* (B) donde se indica de manera sencilla la composición lipídica y proteica de estos microdominios de membrana. Abreviaturas: PS: fosfatidilserina, PI: fosfatidilinositol, SPM: esfingomielina, Gang: gangliósido, GPI; proteína unida a glicofosfatidilinositol, GSLs; glicoesfingolípidos, PC; fosfatidilcolina, PE: fosfatidiletanolamina,

Los *lipid raft* o balsas lipídicas reciben otros nombres tales como membranas enriquecidas en colesterol, membranas enriquecidas en glicoesfingolípidos, membranas enriquecidas en glicoesfingolípidos no solubles en detergentes (DIGs), y membranas resistentes a detergentes (DRM). Los términos DIG y DRM; reflejan el hecho de que estos dominios no se solubilizan fácilmente en detergentes no iónicos, esta propiedad resulta del fuerte empaquetado de los acilos de los lípidos que conforman el *lipid raft*. El nombre fracción flotante insoluble en Tritón X-100 hace referencia a la baja densidad de flotación de los dominios insolubles en detergentes (Pike 2004).

3.1. Caveolas

Las caveolas son un tipo de lipid raft que contiene la proteína denominada caveolina. Las caveolas se pueden identificar morfológicamente como pequeñas invaginaciones de la membrana plasmática con un diámetro aproximado de 150 nm (Thorn *et al.* 2003). La estructura invaginada de las caveolas parece estar estabilizada por la caveolina-1 (Fra *et al.* 1995, Le *et al.* 2002).

Los *lipid rafts* y las caveolas son DRMs, que se aíslan en las mismas fracciones de membrana y son prácticamente indistinguibles experimentalmente (Pike 2004); por lo tanto de aquí en adelante, haremos referencia a ambos con el nombre de *lipid raft* indistintamente.

3.2. Composición lipídica

En los *lipid rafts* existe una mayor concentración de colesterol, glico- y fosfoesfingolípidos que en el resto de la membrana plasmática pero sus proporciones en los *rafts* respecto del total de la membrana plasmática varía según el tipo celular y el método utilizado en su aislamiento.

El contenido en colesterol de estos dominios representa una tercera parte del total de lípidos de la membrana, siendo de 3 a 5 veces mayor que en el resto de la membrana plasmática (Brown & Rose 1992, Prinetti *et al.* 2000, Pike *et al.* 2002). Los fosfoesfingolípidos (concretamente, la esfingomielina) representan del 10 al 15% del total de lípidos de la membrana (Brown & Rose 1992, Prinetti *et al.* 2000, Pike *et al.* 2002), los glicoesfingolípidos, tales como los cerebrósidos y los gangliosidos, son entre un 10-20% de los lípidos del *raft*, siendo esta proporción 5 veces mayor que la que existe considerando la membrana completa (Brown & Rose 1992, Prinetti *et al.* 2000). Los glicerofosfolípidos como la fosfatidilcolina y la fosfatidiletanolamina, representan menos de un 30% (Brown & Rose 1992, Pike *et al.* 2002).

3.3. Composición proteica

En *lipid rafts* se localizan ciertas proteínas de membrana que podrían, por ejemplo, potenciar las cascadas de señalización o interferir de forma crucial en muchas otras funciones (Simons & Ikonen 1997). Existe una gran variedad de proteínas que han sido halladas en estos microdominios, entre estas se encuentran: caveolinas, flotilinas, proteínas unidas a glicofosfatidilinositol (*GPI anchored proteins*), proteínas G, proteínas transmembrana (como los receptores de factores de crecimiento) o la familia de quinasas SRC (Brown & Rose 1992, Sargiacomo *et al.* 1993, Lisanti *et al.* 1994, Liu *et al.* 1996, Mineo *et al.* 1996, Song *et al.* 1996, Bickel *et al.* 1997, Smart *et al.* 1999); así como numerosas proteínas implicadas en la señalización celular (von Haller *et al.* 2001, Foster *et al.* 2003).

Las **caveolinas** son proteínas integrales de membrana de 20-24 kDa (He *et al.* 2008). Existen 3 isoformas, de las cuales la caveolina-1 y 2 se expresan en la mayoría de tipos celulares, mientras que la caveolina-3 se encuentra principalmente en células musculares (Schwencke *et al.* 2006). Tienen una topología poco común puesto que los dominios N-citosólico y C-terminal están conectados por una secuencia hidrofóbica que se

encuentra embebida en la membrana, pero no cruza toda la bicapa (Monier *et al.* 1995). Las caveolinas están palmitoiladas en la región C-terminal y pueden ser fosforiladas en residuos de tirosina, unir colesterol, y formar dímeros y oligómeros (Glenney 1989, Monier *et al.* 1995, Murata *et al.* 1995). La caveolina-1 es esencial para la formación de caveolas y se caracterizó como el primer marcador molecular de estos dominios (Rothberg *et al.* 1992). Se ha visto que en ausencia de caveolinas no se forman caveolas, y por otro lado, cuando las caveolinas se expresan en células que no tienen caveolas, éstas inducen la formación de caveolas (Eriksson *et al.* 1995).

3.4. Cascadas de señalización

La membrana plasmática de las células tiene dos funciones claves: por un lado, la de separar el medio intracelular y extracelular por medio de una barrera lípido/proteína; y por otro, la de servir como dominio celular que puede sentir los cambios que ocurren en el exterior de la célula e iniciar eventos que alteran la fisiología de la célula (como son el transporte celular, la comunicación célula-célula y la transducción de señales). Un aspecto esencial de las repuestas funcionales que aporta la membrana celular, es la presencia de moléculas en la membrana que reconocen estímulos externos y luego envían la información a otras moléculas de la membrana o a otros compartimentos celulares (Patel & Insel 2009).

Los *lipid rafts* sirven como plataformas para el inicio de las cascadas de señalización. La unión de los ligandos a los receptores, localizados en estos microdominios, inicia el proceso de señalización activando la cascada. La especificidad en la activación de la cascada de señalización podría estar amplificada por las limitaciones de localización de los receptores restringidos a una clase particular de *lipid raft* que, a su vez contiene un conjunto específico de moléculas para la señalización. Además, la localización de los *lipid rafts* en sí misma, podría servir como apoyo para la activación focalizada de la ruta, lo que resultaría en una especificidad adicional de la respuesta (Pike 2003).

De manera más compleja puede ocurrir que moléculas complementarias de las rutas de señalización se segreguen en los diferentes *lipid rafts* en estado basal. La estimulación de la célula por acción de una hormona o un factor de crecimiento, podría conllevar la fusión transitoria de los *lipid rafts*. O bien, los *rafts* pueden contener una ruta de señalización casi al completo que sería activada cuando el receptor u otra molécula, que normalmente se localice en porciones de membrana *no-raft*, fueran reclutadas por los *lipid rafts*. Esto pondría a varios componentes que promuevan la interacción y lleven a la activación de la ruta de señalización correspondiente en el mismo lugar. El flujo, a través del que se activa la cascada de señalización, estaría restringido, debido a la colocación de las moléculas que interactúan en los diferentes compartimentos físicos de la membrana. En este estado, la situación de proteínas específicas en el *raft* no es requerida para el funcionamiento de la ruta. Son más bien los *rafts* los que proporcionan una separación física a proteínas que, de otra manera, interactuarían entre sí (Pike 2003).

Los *lipid rafts* pueden controlar la señalización celular modulando la actividad de las proteínas que se localizan en ellos. Esto puede ser debido al ambiente específico, rico

en lípidos, que presentan los *rafts* o bien puede ser el resultado de la proximidad de proteínas de señalización a otras moléculas de la cascada que se da en los *rafts*. Por ejemplo, se ha observado que el receptor tirosina quinasa se comporta de forma distinta según esté en un microdominio de membrana *raft* o *no-raft* (Pike 2003).

Los *rafts* pueden además participar en la finalización de la señalización. Se sabe que estos están implicados en la endocitosis (Anderson 1998, Le et al. 2002), y limitan la señalización de la célula mediante el secuestro de moléculas específicas, impidiendo así que participen una determinada ruta (Pike 2003).

Los *lipid rafts* no están solo presentes en la membrana plasmática sino también en otras membranas intracelulares como por ejemplo del aparato de Golgi. Por último, no todos los *rafts* son idénticos en cuanto a su composición lipídica y proteica, es más, puede que estas diferencias se deban a la segregación espacial que se da en las células para llevar a cabo su función específica. Estas diferencias en cuanto a composición y situación probablemente sean importantes para la función de los *rafts* en la señalización celular (Pike 2003).

Objetivos

Objetivos

La finalidad de este trabajo ha sido profundizar en el estudio del papel de la lipasa sensible a hormonas (HSL) en la fisiología del testículo. En la Introducción se ha expuesto el papel que juega HSL en la regulación/control de la homeostasis del colesterol. Se ha visto que los ratones HSL (-/-) son estériles, tienen oligospermia y anomalías en la morfología del testículo. La ausencia de actividad colesterol éster hidrolasa en el testículo provoca una alteración de la homeostasis del colesterol disminuyendo el colesterol disponible en el mismo. Por lo que nos planteamos que se podrían producir cambios importantes en la captación de los ésteres de colesterol por parte de los receptores scavenger clase B. La disminución de colesterol disponible en estos ratones HSL (-/-) podría alterar la composición de los lípidos de membrana, y por tanto, en los dominios ricos en colesterol lipid rafts. Estos cambios podrían conllevar cambios en la estructura e integridad de la membrana lo que repercutiría en la localización y expresión de proteínas localizadas en la misma, pudiéndose alterar por tanto la captación de ésteres de colesterol como la señalización celular. Estas alteraciones en la membrana plasmática pueden afectar a la fertilidad y la maduración de los gametos ya que la composición de la membrana plasmática es un factor crítico y determinante en la espermatogénesis.

La HSL también participa en la disponibilidad de los AG libres. Como ya hemos comentado los AG son la principal fuente de energía y son elementos estructurales y componentes bioactivos de las membranas celulares. Se sabe que los AGP de la serie n-6 o n-3 son esenciales para el desarrollo de los testículos. Por tanto, nos planteamos analizar si la ausencia de HSL en el testículo podría alterar la disponibilidad de los AGs y esto, en última instancia podría estar afectando la fisiología del testículo.

En resumen, los objetivos concretos fueron:

1. Estudiar el efecto de la ausencia de HSL en el testículo sobre la espermatogénesis.
2. Determinar los efectos de la ausencia de la HSL sobre los receptores *scavenger* clase B encargados de captar ésteres de colesterol de las lipoproteínas
3. Analizar si la ausencia de HSL en el testículo altera la estructura y composición de los distintos dominios de las membranas plasmáticas, *lipid rafts* y *no-rafts*.
4. Estudiar el efecto de la ausencia de HSL en el testículo sobre la composición en esteroides y ácidos grasos del mismo.
5. Analizar de la expresión diferencial de genes en testículos de los ratones HSL -/-

Materiales y métodos

Materiales y métodos

1. Mantenimiento de la colonia de ratones knockout de HSL (HSL -/-)

La generación de los ratones *knockout* (KO) para HSL (HSL -/-), carentes de dicha enzima por ruptura del gen LIPE que codifica para la proteína HSL, ha sido descrita por Osuga y col. (Osuga et al. 2000). Esta colonia de ratones HSL -/- se inició con ratones cedidos por F.B. Kraemer y J.I. Osuga, y se mantiene mediante el cruce de hembras heterocigotas (HSL +/-) con machos heterocigotos (HSL +/-), ya que los machos HSL -/- son estériles. Las hembras preñadas se separan y paren tras 19-20 días de gestación. Las crías permanecen con la madre durante la lactancia (20-21 días), a continuación se destetan y se separan por sexos. A las dos semanas se anillan para identificarlas y se extrae ADN genómico de la cola para realizar el genotipado siguiendo el protocolo de (Osuga et al. 2000).

La experimentación animal ha sido realizada en la Unidad de Cirugía Experimental y Animalario del Hospital Universitario Ramón y Cajal con número de registro EX027 UC, siguiendo las recomendaciones del Comité Ético y de Bienestar Animal, de dicho hospital para Animales, del RD 1210/2005.

2. Genotipado de ratones HSL -/-

- **Soluciones de trabajo:**
 - o Tampón de lisis (esterilizar por filtración):

Reactivo
Tris 1 M, pH 7.5
NaCl 5 M (Merk)
EDTA 0.5 M (Sigma)
20% SDS (Sigma)
H ₂ O estéril hasta 300 ml

- o Proteinasa K (GIBCO-BRL): 1 µg/100 µL.

Los ratones se anestesiaron con 2% de isofluorano/aire. Se les cortó un trozo de la cola con tijera estéril que se hizo rebanadas y se incubó en tampón de lisis con proteínasa K toda la noche a 50°C en agitación. Posteriormente se extrajo el ADN genómico con acetato potásico 8 M (75 µL) /cloroformo puro (500 µL) agitando los tubos y dejándolos durante una hora a -20°C. A continuación las muestras se centrifugaron a 1400 rpm durante 10 minutos y se recolectó la fase superior, acuosa, que contiene el ADN; éste se precipitó añadiéndole 1 mL de etanol 100% y después lavando con 0.5 mL de etanol 70%. El pellet obtenido se dejó secar y se resuspendió en 100-200 µL de H₂O. A continuación se

midió la concentración de ADN en un espectrofotómetro nanodrop. El ADN genómico se analizó mediante PCR partiendo de 50 ng, para ello se utilizaron los siguientes *primers*:

HSL-A: 5'-AGA-GAG-ACC-AAC-TCA-GCC-TCC-CAC-3' (2.5 μ M)

HSL-B: 5'-CAA-GGT-GTC-TGT-CTG-TGC-TGT-CTT-3' (2.5 μ M)

SI166: 5'-AGG-ATT-GGG-AAG-ACA-ATA-GCA-GGC-AT-3' (5 μ M)

Siguiendo las especificaciones del kit Taq Master Mix (Quiagen).

La reacción de PCR se realizó en el termociclador (*MJResearch PTC-200 Peltier Thermal Cycler*) siguiendo el protocolo:

- | | | | |
|---|--------------------|---------------------|-------------|
| ❖ | 3 minutos a 94°C | (desnaturalización) | } 30 ciclos |
| ❖ | 45 segundos a 94°C | (desnaturalización) | |
| ❖ | 45 segundos a 60°C | (anillado) | |
| ❖ | 1 minuto a 72°C | (extensión) | |
| ❖ | 10 minutos a 72°C | (extensión final) | |

Los productos de la reacción de PCR se corrieron en un gel de agarosa al 2%. El alelo WT o control se corresponde con la banda de 269 pb y el alelo mutante o KO con la banda de 320 pb. Los heterocigotos tienen las dos bandas.

3. Animales y condiciones ambientales

Los animales utilizados en el presente trabajo fueron ratones (*Mus musculus*) macho controles (HSL +/+) y KO para la HSL (HSL -/-), de 4-5 meses de edad, de la colonia que mantenemos en nuestro animalario.

Los animales estuvieron sometidos a ciclos constantes de 12 horas de luz/oscuridad, y a una temperatura constante en el animalario de 22-24°C y con ventilación continua.

Los ratones fueron alimentados *ad libitum* con pienso granulado (dieta de mantenimiento para roedores, SAFE-A04, y dieta de animales gestantes y reproductores, 2019 Teklad Global 19% *Protein Extruded Rodent Diet* Harlan™ adquiridos de PanLab) y agua corriente en la bebida.

3.1. Grupos experimentales

Para este estudio hemos utilizado dos grupos experimentales:

- Ratones controles WTo HSL (+/+).
- Ratones KO para la HSL (HSL -/-).

4. Sacrificio de los animales y recogida de muestras

Los ratones fueron anestesiados mediante inyección intraperitoneal de 100 μ l por 25 g de peso corporal de una mezcla de Ketamina (50 mg/ml) (Ketolar de Pfizer) y

Xilacina (2%) (Rompún de Bayer), en una proporción 3:1. La sangre se extrajo mediante punción intracardiaca con jeringas de insulina con anticoagulante 5% EDTA. La sangre se recogió en tubos eppendorf con 25 μ l de anticoagulante 5% EDTA por tubo y se centrifugó a 1500 rpm, 30 minutos a 4°C para obtener el plasma que se guardó a -20°C.

El sacrificio de los ratones se realizó por dislocación cervical. A continuación se extrajeron el resto de los tejidos en el siguiente orden: corazón, hígado, adiposo lumbar, testículos y cerebro; pesándose y congelándose inmediatamente tras su extracción. Los testículos una vez extraídos se congelaron en nitrógeno líquido y se guardaron a -80°C para su posterior procesamiento, o bien, se fijaron en paraformaldehído (PFA) y fueron embebidos en parafina, o en sacarosa para su posterior estudio inmunohistoquímico.

5. Determinaciones en plasma

5.1. Triglicéridos

La determinación plasmática de triglicéridos se realizó según las instrucciones del kit de triglicéridos GPO-PAP líquido Bradford Diagnostics (Kemia Científica S.A.). Este método se basa en la hidrólisis de los triglicéridos por una lipasa. El kit lleva como indicador la quinoneimina que se forma a partir de peróxido de hidrógeno, 4-aminoantipirina y 4-clorofenol en una reacción catalizada por la peroxidasa. La determinación se llevó a cabo utilizando 10 μ L de muestra y los datos de concentración (mg/dL) de dichos triglicéridos se obtuvieron a partir del cálculo con la concentración conocida de los estándares utilizados que fueron NORTROL y ABTROL Konelab™/ T Serie *ThermoScientific*. Las muestras se midieron en el *Specific Selective Chemistry Analyzer Kone Instruments*.

5.2. Colesterol

La determinación plasmática de colesterol se realizó según las instrucciones del kit Colesterol-Líquidos Método CHOD-PAD Bradford Diagnostics (Kemia Científica S.A.). Con este kit el colesterol se determina utilizando 10 μ L de muestra sometiendo al éster correspondiente a hidrólisis enzimática, el colesterol así obtenido se oxida. En esta reacción se forma peróxido de hidrógeno que en presencia de 4-aminoantipirina y fenol forma quinoneimina, el indicador utilizado para medir. Los datos de concentración (mg/dL) del colesterol se obtuvieron a partir del cálculo interpolado de la concentración conocida de los estándares utilizados que fueron NORTROL y ABTROL Konelab™/ T Serie *ThermoScientific*. Las muestras se midieron en el *Specific Selective Chemistry Analyzer Kone Instruments*.

5.3. Testosterona

Para la determinación de la concentración de testosterona en plasma de ratón se utilizó el kit de ELISA (*Cayman Chemical Company*), basado en la competencia que se establece entre la testosterona fría y la marcada con fluorescencia para unirse al anticuerpo.

Se siguieron las instrucciones técnicas facilitadas por la casa comercial. Se analizó la testosterona en 50 μ L de una dilución 1/10 de las muestras de plasma de los ratones

HSL +/+ y HSL -/- realizando el análisis de las muestras por triplicado. La fluorescencia se midió en un espectrofluorímetro (TECAN infinite F200). Los resultados se expresaron en pg/mL.

6. Análisis del esperma de los animales

6.1. Aislamiento de los espermatozoides

Tras realizar la eutanasia de los ratones por dislocación cervical se recolectaron los epidídimos y los vasos deferentes, se eliminó el exceso de tejido adiposo y vasos sanguíneos para minimizar riesgos de contaminación, y se les añadieron 500 µl de medio M2 (medio 2, sales inorgánicas: CaCl₂-2H₂O, MgSO₄, KCl, KH₂PO₄, NaHCO₃, NaCl, D-glucosa (1:1), albúmina de suero bovino (BSA), ácido láctico, rojo fenol, ácido pirúvico, HEPES) precalentado siguiendo el método de Hogan y cols. (Hogan *et al.* 1994). Los espermatozoides fueron liberados del epidídimo pasando una aguja 30G y poniéndolos en medio M2 durante 5 minutos para que recuperaran la motilidad.

6.2. Determinación de las características del esperma

Para la determinación de la concentración de esperma se utilizó un hemocitómetro Bürker y el número de espermatozoides se contó mediante microscopía. Para la determinación de la motilidad del esperma, éste se colocó en un portaobjetos precalentado a 37°C en un microscopio a 37°C, y los estados y la motilidad de los espermatozoides fueron medidos en el *Sperm Class Analyzer*® SCA 2002.

6.3. Determinación de la viabilidad de los espermatozoides

La proporción de esperma vivo y muerto, se midió por tinción ácida de núcleos vivos utilizando SYBR-14, en combinación con la tinción nuclear de muerte celular, el yoduro de propidio (Garner & Johnson 1995). Se utilizó el protocolo de vida/muerte del kit de viabilidad del esperma *Molecular Probes* (Invitrogen).

Más detalladamente, a 50 µl de la suspensión de esperma (6x10⁶ células/ml) se le añadió 1 µl de SYBR-14 (10 µM) y 1.2 µl de yoduro de propidio (2.4 mM), la mezcla se incubó durante 15 minutos a 37°C. A continuación, se pusieron 20 µl de la mezcla en un portaobjetos y se observaron en un microscopio de fluorescencia. La tinción de los núcleos con SYBR-14 era verde en los espermatozoides vivos, mientras que en los no vivos o los que tenían las membranas dañadas se teñían de rojo por el yoduro de propidio.

7. Estudio histológico del testículo de ratón

7.1. Estudio inmunohistoquímico

La inmunotinción con estreptavidina-peroxidasa se realizó como hemos descrito previamente (Arenas *et al.* 2004, Martín-Hidalgo *et al.* 2005). Los testículos se fijaron durante toda la noche en 4% PFA en tampón fosfato salino (PBS, *Phosphate buffered saline*) 0.1 M. A continuación se lavaron con PBS varias veces para extraer el PFA. Posteriormente, se deshidrataron con cambios en alcoholes ascendentes, 50%, 70%, 90%, 100%; y se sumergieron en 1-butanol durante toda la noche. Finalmente, se introdujeron

en parafina a 60°C (tres baños, dos de 1 hora y otro de 2 horas), se hicieron los moldes y se dejaron enfriar.

Para la obtención de cortes se utilizaron portaobjetos silanizados previamente y se obtuvieron cortes de 5 µm (microtomo Microm). Éstos se dejaron en la estufa a 40°C durante 30 minutos y se les hicieron dos baños en Xilol (100%).

Los cortes histológicos se desparafinaron con Xilol y se hidrataron con H₂O en series de etanol graduado y agua bidestilada, y colocados en un recipiente de vidrio con agua que contenía tampón citrato sódico 10 mM pH 6.0, se calentaron en el horno microondas durante 4 ciclos de 2 minutos a potencia media. Los cortes se dejaron enfriar dentro del microondas durante 20 minutos. Después de lavarlos con agua bidestilada, se lavaron dos veces con tampón TBS (*Tris buffer saline*), pH 7.6 durante 5 minutos. La actividad peroxidasa endógena se inhibió mediante la incubación con 2% H₂O₂ durante 10 minutos. Los cortes se lavaron con H₂O y tampón TBS, y se incubaron con 3% de suero normal de cabra, 0.01% Tritón X-100, 0.1% glicina en TBS, a temperatura ambiente (TA) durante 30 minutos. Los cortes se incubaron 12 h a 4°C con el anticuerpo primario correspondiente y a las diluciones indicadas en la Tabla 2 diluidos en 0.3% de suero normal de cabra, 0.001% Tritón X-100, 0.01% glicina en TBS. A continuación, los cortes se lavaron dos veces con TBS para retirar el anticuerpo primario no unido y se volvieron a incubarse con el anticuerpo secundario conjugado con biotina correspondiente durante 1 h a TA (Tabla 2), diluidos en 0.3% de suero normal de conejo o cabra, 0.001% Tritón X-100 y 0.01% glicina en TBS. Los cortes se lavaron con TBS y se incubaron con el complejo estreptavidina-peroxidasa (Zymed, Invitrogen) 30 minutos, y se lavaron en TBS seguido de tampón Tris-HCl, pH 7.6. La actividad peroxidasa se reveló con 3-diaminobencidina tetrahidrocloro (DAB+ tampón sustrato Dako) como cromógeno. Los cortes se contrastaron con hematoxilina de Carazzi (Panreac). Por último, se deshidrataron con etanol, se limpiaron con xilol, se montaron en DePex (BDH) y se observaron al microscopio (Olympus BX51). El estudio morfológico e histopatológico, se realizó en cortes de tejido normal teñidos con hematoxilina/eosina (SurgiPath).

La especificidad de los procedimientos inmunohistoquímicos se ensayó mediante la inclusión de los siguientes controles negativos: (i) omitiendo el anticuerpo primario, (ii) utilizando un suero no inmune en lugar del anticuerpo primario y (iii) incubando con un anticuerpo secundario no relacionado después de la incubación con el anticuerpo primario a los títulos óptimos.

Anticuerpo 1º (Dilución)	Anticuerpo 2º (Dilución)
Casa comercial	(Anti-IgG biotinado)/Casa comercial
SR-BI (1:1000)	<i>Rabbit</i> (1:500)
Novus biologicals (NB400-104)	Dako (E0-353)
SR-BII (1:500)	<i>Rabbit</i> (1:500)
Novus biologicals (NB400-102)	Dako (E0-353)
LIMP II (1:700)	<i>Goat</i> (1:500)
RD Systems (AF1966)	Chemicon (AP-180B)
HSL (1:400)	<i>Chicken</i> (1:100)
Affinity BioReagents (PAI-21213)	Vector (BA9010)

Tabla 2. Anticuerpos primarios y secundarios, con la dilución y la casa comercial utilizados en las técnicas de inmunohistoquímica.

7.2. Estudio histológico de lípidos

Realizamos un estudio de localización de lípidos neutros en cortes histológicos de testículo de ratón. Para ello los testículos recolectados se sumergieron en PFA 1% en PBS durante toda la noche. A continuación se lavaron con PBS durante 2 horas y se sumergieron en soluciones crecientes de sacarosa, 5%, 10%, 15%, hasta 20%. Una vez hecho esto las piezas se secaron y se introdujeron en nitrógeno líquido.

Para la obtención de cortes se utilizaron portas silanizados. Se realizaron cortes de unas 5-6 μm (criostato Microm HM550) que se dejaron secar durante 30 minutos a TA. A continuación se fijaron con Formol tamponado 10% durante 1 hora y se lavaron 3 veces durante 5 minutos con PBS. Posteriormente, se realizaron las técnicas que se detallan a continuación.

7.2.1. Tinción con filipina

Los portaobjetos se incubaron cubriendo bien los cortes de tejido con la solución de Filipina (Sigma) (0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) en cámara oscura durante una hora a TA. Se realizaron otros tres lavados con PBS y se montaron los cubres con medio de montaje *Non-Fade* (Invitrogen). Los portas se visualizaron en el microscopio confocal (Nikon Eclipse).

7.2.2. Tinción con *Oil-Red*

Los cortes se sumergieron en isopropanol durante 3-5 segundos y se incubaron en solución de 5 g *Oil-Red*/ 100 mL de isopropanol diluido 2/3 en H_2O , de 20 a 30 minutos en oscuridad y a TA. Posteriormente, se lavaron con alcohol isopropílico y después con agua. Se contrastaron los cortes con Hematoxilina de Carazzi (Panreac) embebiéndolos durante 10 minutos, se lavaron con agua destilada y se montaron en medio acuoso (glicerol/PBS). Los portas se visualizaron en el microscopio confocal (Nikon Eclipse).

8. Aislamiento de fracciones de membrana (*lipid rafts* y *no-rafts*) en gradiente de sacarosa

Se siguió un procedimiento sin detergentes (Sanchez-Wandelmer *et al.* 2009) modificado del de Song y col. (Song *et al.* 1996). Las muestras de testículo congelado de ratones HSL +/+ y HSL -/- se homogeneizaron con un *potter* en 2 mL de una solución de carbonato sódico 0.5 M, pH 11 y coctel de inhibidor de proteasas (Pierce), posteriormente se sonicaron con un pulso de 30 segundos en posición 30 en un sonicador *Bandelin Sonorex* (RK100). A continuación, se centrifugaron a 15.000g, 30 minutos a 4°C para obtener el sobrenadante con membranas libre de otros orgánulos como el aparato de Golgi. Estos sobrenadantes se sonicaron con 2 pulsos de 30 segundos en posición 3 y un pulso de 30 segundos en posición 2 en un sonicador *Vibracell* (Sonics&Materials Inc.) para fraccionar las membranas obtenidas en el extracto. Los 2 mL de lisado obtenidos se mezclaron en un tubo de centrifuga con 2 mL de sacarosa (Merk) al 85% en tampón MBS (25 mM de ácido 2-(N-morfolino) etanosulfónico (MES) pH 6.5 y NaCl 0.15 M) y se colocó bajo un gradiente discontinuo de sacarosa formado por 1 mL al 35%, 5 mL al 30% y 2 mL al 5% en MES. Este gradiente discontinuo se centrifugó a 39.000 rpm durante 18-20 horas a 4°C en un rotor SW40 en ultracentrifuga Beckman Coulter (Beckman Instruments). Mediante esta ultracentrifugación se establece un gradiente continuo de densidad de sacarosa en el que se distribuyen las fracciones de membrana según su densidad. Se recogieron 12 fracciones de 1 mL desde la parte superior del tubo, se valoró su concentración proteica mediante BCA (ácido bicinconínico) (Pierce Biotechnology) y se procesaron para el análisis por *Western-blot* de caveolina-1 y receptor de transferrina (TfR). Las fracciones se concentraron mediante la precipitación con ácido tricloroacético para el análisis de SR-BI y SR-BII (*Novus Biologicals*) mediante *Western-blot* y para las determinaciones lipídicas las fracciones se procesaron mediante el método *Folch*.

9. Lisado de testículo

Las muestras de testículo de ratón se homogeneizaron en un *potter* en tampón de lisis compuesto por:

Tampón de lisis
Tris Base (50 mM) pH 7.5
NaCl (125 mM)
NaF (5.3 mM)
Na ₄ P ₂ O ₇ (14.03 mM)
EDTA-N ₂ (1 mM)
NP-40 (1%)

Se les añadió 10 µL/mL de coctel de inhibidores de proteasas. A continuación se centrifugaron a 10.000 rpm durante 10 minutos y se recolectó el sobrenadante valorando su contenido en proteínas.

10. Estudio de proteínas

10.1. Precipitación de proteínas en fracciones de membrana del testículo

Para el aislamiento de las proteínas de las fracciones de membrana éstas se mezclaron con un volumen de tricloroacético al 20% final y se mantuvieron en hielo durante 30 minutos. A continuación se centrifugaron a 16.000 g durante 10 minutos y el sedimentó se lavó dos veces con etanol:etilacetato (1:1). A continuación, los precipitados se disolvieron en tampón de carga para electroforesis 1X (tabla).

Tampón de carga 5X
Glicerol (50 %)
Tris Base pH 6.8 (321.5 mM)
SDS (10 %)
β-mercaptoetanol (25 %)

10.2. Valoración de proteínas

Tanto en el caso de las muestras de lisado total de testículo como en el de las fracciones de membrana del testículo, las proteínas se valoraron con el kit *BCA Protein Assay* (Pierce Biotechnology).

10.3. Estudio de expresión de proteínas mediante *western blot*

Los cambios en la expresión de las proteínas de interés, se analizaron mediante *western-blot*. Para lo que se cargaron 50-100 µg de proteína de los lisados totales de testículo y concentraciones iguales de proteínas en el caso de las fracciones de membrana separadas mediante el gradiente de sacarosa. Las proteínas se sometieron a electroforesis SDS-PAGE donde se separaron en los geles de poliacrilamida del 8-12% según el tamaño de la proteína estudiada. Después, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad) mediante transferencia húmeda, a 100V durante una hora o a 15V durante toda la noche, en ambos casos a 4°C. Las membranas se bloquearon con caseína al 0.1% en TBS (Trizma base 10 mM, NaCl 0.15 M, pH 7.4) con Tween-20 al 0.1%. A continuación, las membranas se incubaron con los anticuerpos primarios específicos según la proteína analizada (tabla 3) disueltos en TBS-Tween 0.1 % toda la noche a 4°C, o dos horas a TA. Tras incubar con los anticuerpos primarios, las membranas se lavaron con TBS-Tween 0.1% y se incubaron con los anticuerpos secundarios correspondientes (ver tabla 3), bien acoplados a peroxidasa (HRP, *HorseRadish Peroxidase*) (Santa Cruz Biotechnology, Inc) o bien a fosfatasa alcalina (Jackson ImmunoResearch) y disueltos en leche desnatada 1% en dilución 1:2.000, durante 1 hora a TA. Las membranas se lavaron con TBS-Tween 0.1%. En los anticuerpos conjugados con HRP, la inmunoreactividad se detectó por quimioluminiscencia utilizando Immuno-Star HRP (Bio-Rad) visualizándose en el *VersaDoc Imaging System* (Bio-Rad) siguiendo las instrucciones de la casa comercial. En cambio, los anticuerpos conjugados con fosfatasa alcalina las bandas se visualizaron utilizando un método colorimétrico consistente en la utilización del tampón fosfatasa

alcalina (Tris-Base 100mM, NaCl 100 mM, MgCl₂ 5 mM, pH 9.5) junto con NBT (*NitroBlue Tetrazolium*, Bio-Rad) (30 mg/ml) disuelta en 100% DMF (N, N-dimetilformamida) y BCIP (*5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl Phosphate*, Bio-Rad) (15 mg/mL) preparado en 70% DMF; ambos mezclados en proporción 1:1.

Anticuerpo primario(dilución)	Casa comercial
AKT (1:1000)	Cell Signalling #9272
Caveolina-1 (1:1000)	Santa Cruz sc-894(N-20)
ERK (1:5000)	Sigma M5670
Fyn (1:500)	Santa Cruz sc-16
GAPDH (1:2000)	Santa Cruz sc-25778
HSL (Lipe) (1:2000)	Affinity BioReagents PAL.21213
p-AKT (1:1000)	Cell Signalling #9271
p-ERK (1:1000)	Cell Signalling #9106
p-SRC (1:1000)	GenScript A00396
R-Transferrina (1:1000)	Zymed 13-6800
SR-BI (1:2000)	Novus Biologicals NB400-104
SR-BII (1:4000)	Novus Biologicals NB400-102

Tabla 3. Anticuerpos primarios, su dilución y la casa comercial utilizados en las técnicas de *Western Blot*.

11. Análisis de la composición en ácidos grasos y esteroides

11.1. Extracción de lípidos totales

La extracción de los lípidos totales de las muestras de testículo de ratón se realizó utilizando el método de Folch (Folch *et al.* 1957). Brevemente, se partió de 500 µg de proteína en el caso de los lisados totales de tejido, 100 µL de plasma o de 1 mL de las fracciones del gradiente de sacarosa. A cada muestra de extracción se le añadieron 50 µl de estándar interno (C₂₃ y C₁₇ metil éster 40 µg/ml [Nu-Chek prep] para el análisis de ácidos grasos o 5α-colestano 40 mg/mL [Sigma] para el análisis de esteroides). La extracción de lípidos se realizó con cloroformo/metanol (2:1 vol/vol) en proporción 1:4 con la muestra; a esta mezcla se le añadieron 50 mg/L de 2[6] di-tert-butil p-cresol [butilato hidroxitolueno (BHT) como antioxidante. La fase superior acuosa se descartó y la fase inferior orgánica se lavó dos veces con 500 µL metanol/agua (1:1.65 vol/vol), y se recogió y secó bajo una corriente de nitrógeno (N₂).

11.2. Obtención de ácidos grasos

La fase orgánica se transesterificó siguiendo el método descrito por Lepage y Roy (Lepage *et al.* 1989). Para obtener los ésteres metílicos de los ácidos grasos (FAMES) utilizamos una mezcla de metanol/cloruro de acetilo con la que se incubaron las muestras durante 18 horas a 50°C para la obtención de los FAMES. En el caso de las muestras de plasma se transesterificaron directamente 100 µl de muestra.

11.3. Obtención de esteroides

Los extractos lípidos totales obtenidos de las muestras de testículo se sometieron a saponificación disolviéndolos en 1 mL de KOH/Etanol (95%) y 50 mg/L de BHT, antioxidante, y calentándolos a 90°C durante 1 hora. A continuación se extrajeron los lípidos no saponificables añadiendo 1 mL de hexano y 200 µL de H₂O, recogiendo la fase superior que contenía a los mismos, se repitió dos veces. Finalmente, los esteroides se recuperaron secando las muestras con una corriente de N₂.

11.4. Análisis de los ácidos grasos mediante cromatografía de gases/espectrometría de masas (CG/EM)

Los FAMES fueron separados con el cromatógrafo de gases de *Agilent 6890N GC* y analizados con los detectores del espectrómetro de masas de *Agilent 5975 MS (Agilent Technologies)* con una columna capilar HP-INNOWAX (*J&W Scientific*) de 25 m×0.20 mm y con un grosor de 0.20 µm. Como gas transportador se utilizó helio a un flujo de 1.0 mL/min y presión variable según el tiempo de retención del ácido araquídico (C20:0). La temperatura de entrada se mantuvo a 250°C. La temperatura inicial del horno fue de 50°C durante 2 minutos y después se aumentó hasta 200°C a un ritmo de 25°C/min y luego a 230°C a 1.5 °C/min, manteniéndose así durante 8 min. El tiempo total de rutina fue 35 minutos. El inyector *splitless* fue programado para inyectar un volumen de 0.2 µL por muestra de tejido, para las muestras de plasma se usó un cociente de separación de 1:50 y un volumen de 1 µL. La línea de transferencia del SM fue mantenida a 260°C. La técnica CG/EM fue llevada a cabo utilizando una ionización de electrones a 70eV. La cuantificación de los picos se realizó mediante su comparación con los estándares externos y mediante la monitorización de las características de los iones descrita anteriormente por (Abu & Oluwatowaju 2009). Para la cuantificación el detector del MS se programó para trabajar en modo monitorización selectiva de iones (SIM), cuantificando al menos uno de los iones y cualificando dos por cada FAME. Las concentraciones de cada FAME fueron interpoladas en las curvas de calibración realizadas con los estándares externos a seis niveles, de acuerdo con el método del estándar interno. Con estas características, los coeficientes de variación de los FAME fueron inferiores al 10%. El estándar externo (GLC-462) se obtuvo de *Un-Chek Prep*, y C16:0 DMA de Sigma.

11.5. Análisis de los esteroides mediante CG/EM

Los esteroides se disolvieron en tert-butilmetileter y se derivatizaron utilizando N-metil-N-trimetilsilil.trifluoroacetamida/trimetilsililimidazol (9:1). A continuación se separaron y analizados utilizando los detectores MS: *Agilent 6890N GC* y *Agilent 5975 (Agilent Technologies)* y una columna DB-5ms, 30 m x 0.25 mm, con un grosor de 0.25 µm (*Aligent Technologies*). Para la cuantificación se utilizó un detector que monitorizaba tanto en modo de barrido completo como en modo SIM (*Selective Ion Monitoring*) siguiendo a los iones característicos de cada esteroide. Se utilizó 5α-colestano como estándar interno. La cuantificación directa se realizó por comparación directa frente a patrones según correspondiera.

12. Extracción de ARN

Las muestras de testículo de ratones HSL +/+ y HSL -/- se homogeneizaron con TRI REAGENT™ (Sigma) en una proporción de 1 ml por 50-100 mg de tejido. Para la extracción de ARN a las muestras se les añadió cloroformo en la proporción de 200 µL por cada 1 mL de TRI REAGENT™. Se mezclaron bien utilizando el vórtex y se dejaron reposar durante 15 minutos a TA. A continuación, las muestras se centrifugaron a 12.000 g durante 10 minutos a 4°C y se extrajo la fase superior acuosa a la que se le añadió isopropanol 0.5 mL por cada 1 mL de TRI REAGENT™, se agitaron con el vórtex y se dejaron reposar a TA durante 10 minutos, a continuación se centrifugaron a 12.000 g durante 10 minutos a 4°C y se descartó el sobrenadante. El precipitado se disolvió en etanol al 75% y se centrifugó durante 5 minutos a 12.000 g; a continuación se descartó el sobrenadante con cuidado de no arrastrar el *pellet* y las muestras se dejaron secar para posteriormente ser resuspendidas en agua DEPC precalentada a 65°C. Finalmente las muestras se incubaron a 65°C durante 15 minutos para disolver el precipitado y se midieron para obtener la concentración de ARN en un espectrofotómetro NanoDrop y se comprobó su integridad mediante electroforesis en gel de agarosa 0.8%.

El ARNm fue aislado a partir de 100 µg de ARN total, mediante columnas con bolas de poliT siguiendo las instrucciones del kit de purificación GenElute™ mRNA MiniPrep (Sigma). A continuación el ARNm se precipitó añadiéndole etanol:acetato sódico (3:0.1) y glucógeno, dejándolo de 16-20 horas a -20°C. Posteriormente el ARNm se centrifugó y se lavó con 1mL de etanol al 75 % centrifugando las muestras y retirando el etanol, se dejaron secar y se diluyeron con agua DEPC precalentada a 65°C. Para disolver el ARNm las muestras se incubaron a 65°C durante 5 minutos. Finalmente, se cuantificó el ARNm en un espectrofotómetro NanoDrop y se comprobó su integridad mediante electroforesis en gel de agarosa 0.8 %.

13. Expresión diferencial de genes mediante matrices de ADNc (ADNc *microarray*)

Una vez extraído el ARNm de las muestras de testículo de los ratones controles y HSL -/- se analizaron 15 ratones de cada condición agrupándolos de tres en tres de manera que se llevaron a cabo cinco *arrays* por grupo experimental.

El *array* utilizado ha sido el 32K *Mouse Genome Array* y consta de 32356 70mer oligo ADN que fue adquirido de Operon, Huntsville, AL y se imprimió en cristales silanados de 75 X 25 mm utilizando un *micorarrayer* SmarArray™ (CapitalBio). Para el *array* se marcaron 1000 ng de ARNm y se siguieron las instrucciones del kit *Amino Allyl MessageAmp™II aRNA Amplification*. Los datos se analizaron utilizando el programa Gen Expression Pattern Analysis Suite v3.1 (GEPAS), se normalizaron con el método global *loess*.

14. RT-PCR en tiempo real (Q-PCR)

En función de los resultados obtenidos en el ADNc *microarray* nos interesó comprobar los cambios notables en la expresión génica mediante ésta técnica.

Para la RT-PCR se utilizó el kit Takara Bio Inc. a partir de 500 ng de ARN en un volumen final de 10 µL y las siguientes concentraciones de reactivos:

REACTIVO	CANTIDAD (μL)	CONCENTRACIÓN FINAL
5X Primerscript™ Buffer	2	1X
PrimerScript™RT Enzyme MixI	0.5	
Oligo dT Primer (50 μM)	0.5	25 pmol
Random 6 mers (100 μM)	0.5	50 pmol
ARN total (500 ng)		
H ₂ O libre de RNAsas	Hasta 10	

La mezcla de reacción se incubó bajo las siguientes condiciones:

- 37°C, 15 minutos (transcripción reversa)
- 85°C, 5 segundos (inactivación de la transcriptasa inversa)
- 4°C

A continuación, se llevó a cabo la PCR en tiempo real utilizando el kit LightCycler® 480 SYBER Green I Master (Roche) y el termociclador LightCycler® 2.0 (Roche). Para ello se utilizó una dilución 1/10 del ADNc retrotranscrito. El protocolo de amplificación fue el siguiente:

	Temperatura (°C)	Tiempo	Tasa de rampa (°C/s)
PRE-INCUBACIÓN	95	5 min	4.4
INCUBACIÓN	95	10 seg	4.4
	60	15 seg	2.2
CURVA DE MELTING (curvas de disociación)	72	15 seg	4.4
	95	5 seg	4.4
	65	1 min	2.2
	97	---	0.11
			(adquisición 5 por °C)
ENFRIAMIENTO	40	10 seg	1.5

Los *primers* utilizados para las enzimas fueron los siguientes:

Gen	Gene Bank ID	Primer	Secuencia 5' → 3'
<i>CypB</i>	NM_011149	Cypb Fw	TGGAGAGCACCAAGACAGACA
		Cypb Rev	TGCCGGAGTCGACAATGAT
<i>Fas</i>	NM_001146708.1	Fas Fw	TGCCACCAGAGATGCTCCGATC
		Fas Rev	ACCGACCAGCGTGGCAAATGC
<i>Fads1</i>	NM_146094.2	Fads1 Fw	AGCACATGCCATACAACCATC
		Fads1 Rev	TTCCGCTGAACCACAAAATAGA
<i>Fads2</i>	NM_019699.1	Fads2 Fw	AGAAGATGCTACGGATGCCTT
		Fads2 Rev	CCTCGGTGATCTGAGAGCTTTT
<i>Elovl2</i>	NM_019423.2	Elovl2 Fw	CCTGCTCTCGATATGGCTGG
		Elovl2 Rev	AAGAAGTGTGATTGCGAGGTTAT
<i>Scd1</i>	NM_009127.4	Scd1 Fw	TTCTTGCGATACACTCTGGTGC
		Scd1 Rev	CGGGATTGAATGTTCTTGTCGT
<i>Scd2</i>	NM_009128.2	Scd2 Fw	CTCGGGAGAACATCTTGGTTTC
		Scd2 Rev	CCCAGGAGAGCCATGCAATC

Se valoraron las curvas de *melting* (temperatura de fusión) de cada uno de los genes y los productos de la reacción de PCR se corrieron en un gel de agarosa 2% para confirmar la presencia de un solo producto. La eficiencia de la reacción fue evaluada mediante la amplificación de diluciones seriadas de ADNc (1:10, 1:100, 1:1.000 y 1:10.000). Nos aseguramos de que la relación entre las Ct (del inglés *cycle treshold*, o también llamado punto de cruce) y el log [ARN] era lineal (-3.6 < pendiente < 3.2). Las muestras se analizaron por triplicado, y la cantidad relativa de los genes diana se normalizó con la expresión de un gen de referencia o *housekeeping* (*cypB* que codifica para ciclofilina B). Los resultados se analizaron con la plataforma informática del termociclador (LightCycler® 480 *software*, versión 1.5), se realizó una cuantificación relativa de la qPCR mediante el cálculo del cociente de expresión relativa del gen diana comparado con el del gen de referencia ciclofilina B (*CypB*).

15. Análisis estadístico

Los resultados se presentan como la media ± desviación estándar o error estándar de la media. Para la comparación estadística entre grupos se aplicó el test de la t de Student.

Resultados

Resultados

En estudios previos en nuestro laboratorio se había demostrado que las células necesitan colesterol para diversos procesos celulares, como la proliferación y la progresión del ciclo celular (Fernandez et al. 2005). Además se había observado la influencia del colesterol sobre la diferenciación celular (Sanchez-Martin *et al.* 2007). Durante la espermatogénesis tiene lugar una gran proliferación y diferenciación celular que a su vez requiere un gran aporte de colesterol (Parks & Hammerstedt 1985, Rana et al. 1991, Sugkraroek et al. 1991, Haidl & Opper 1997). En los tejidos esteroideogénicos, la HSL participa en la homeostasis del colesterol, contribuyendo con la movilización de los depósitos del mismo para ser utilizado por la célula o para ser excretado (Kraemer et al. 1993); lo que sugiere que esta enzima está implicada en estos procesos de proliferación y diferenciación celular que ocurren en el testículo.

1. Efecto de la ausencia de HSL en el peso corporal y de los testículos

Conociendo el papel lipolítico de la HSL, quisimos analizar si había diferencias en los pesos corporales de los ratones HSL +/+ y HSL -/-. Los ratones que forman parte del estudio fueron pesados antes de su sacrificio; al igual que los distintos tejidos y órganos extraídos. La comparación de las medias de los pesos corporales de los ratones resultó en un menor peso corporal de los ratones HSL -/- respecto a los HSL +/+ (Figura 19 A).

Como ya hemos comentado en la introducción, los ratones macho HSL -/- son estériles, por lo que nos planteamos analizar si había diferencias en el peso de los testículos; comprobando que era significativamente menor el de los ratones HSL -/- que el de los ratones HSL +/+ (Figura 19 B).

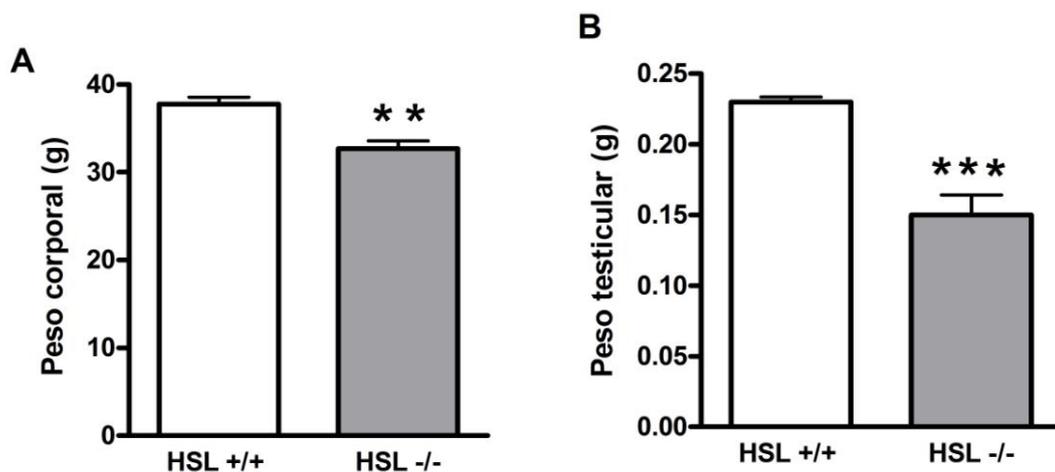


Figura 19. Los pesos corporales (A) y de los testículos (B) de los ratones HSL +/+ y HSL -/-. Los datos que se muestran son media \pm D.E.; n=8, **p<0.005 y *** p<0.0001.

2. Efecto de la ausencia de HSL en el número y la movilidad de los espermatozoides en el esperma de ratón

Una vez determinado que los pesos de los testículos de los ratones HSL -/- eran menores y dado que estos ratones son estériles, quisimos analizar si el número de espermatozoides y su movilidad se veían también afectados. Como se muestra en la tabla 4, los ratones HSL -/- presentan un número significativamente menor de espermatozoides que los ratones control (HSL +/+).

HSL +/+			HSL -/-			P-valor
Media	D.E.	N	Media	D.E.	N	
16.550x10 ⁶	1.193x10 ⁶	10	1.500x10 ⁶	1.085x10 ⁶	7	p<0.0001

Tabla 4. Número de espermatozoides (nº espermatozoides por epidídimo/mL) en el esperma de los ratones HSL +/+ y HSL -/-. Los datos que se muestran son media ± EEM; n=8n; **p<0.005 y * p<0.0001.**

Al analizar la motilidad de estos espermatozoides pudimos ver que también está muy disminuida en los ratones HSL -/- así como el porcentaje de espermatozoides vivos (Figura 20).

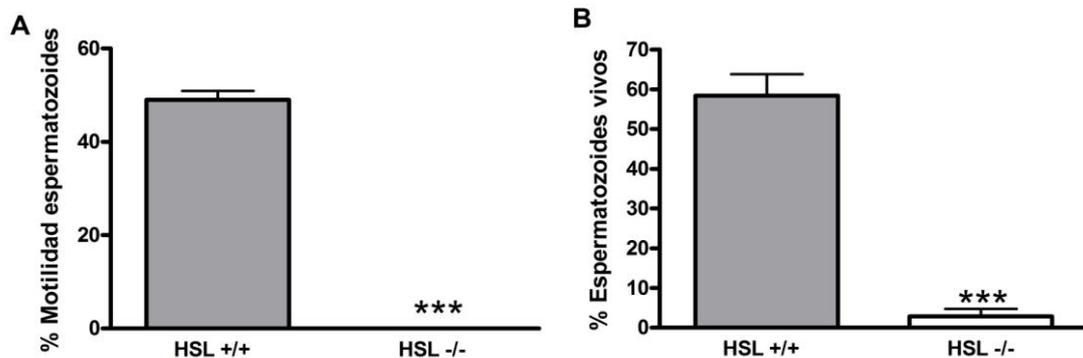


Figura 20. Motilidad de los espermatozoides (%) (A) y espermatozoides vivos (%) (B) en el fluido seminal de los ratones HSL +/+ y HSL -/-. Los datos que se muestran son media ± EEM; n=8; *p<0.0001.**

Por lo tanto, los ratones HSL -/- presentan un número muy bajo de espermatozoides, su motilidad es prácticamente nula y su viabilidad es también mucho menor.

3. Estudio de triglicéridos y colesterol en plasma de ratones HSL +/+ y HSL -/-

Haemmerle y cols. llevaron a cabo un estudio del perfil lipídico plasmático en ratones que carecían de la HSL y vieron que, independientemente de la dieta, los niveles plasmáticos de colesterol estaban incrementados entre un 30-40% en los ratones HSL -/- respecto a los controles; estos autores atribuyen esto a la presencia de un aumento de los niveles de colesterol HDL en plasma (Haemmerle et al. 2002). Conociendo este estudio, nos planteamos analizar el nivel de triglicéridos y de colesterol en el plasma de los ratones de nuestra colonia. Como puede verse en la figura 21, encontramos un aumento significativo de los niveles de colesterol en los ratones HSL -/- respecto de los controles, mientras que en los triglicéridos no se observan diferencias significativas entre los grupos.

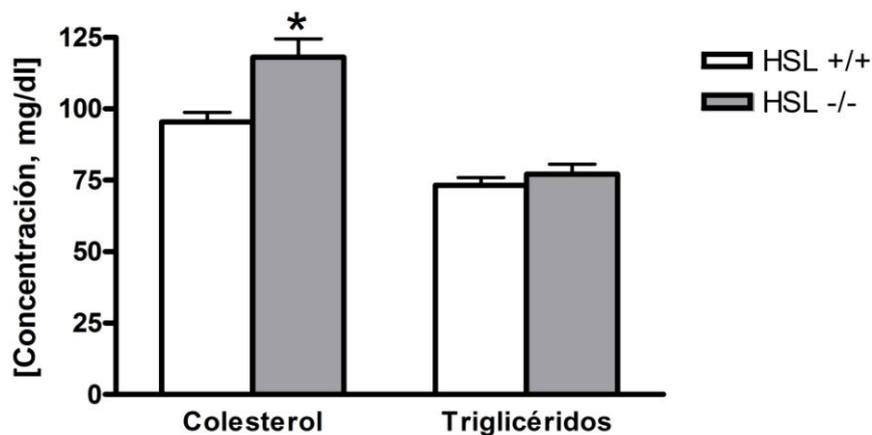


Figura 21. Concentración de colesterol y triglicéridos en el plasma de ratones HSL +/+ y HSL -/-. Los datos se expresan en mg/dl y son media \pm DE, n=11-13, *p<0.05.

4. Análisis de la testosterona en plasma de ratones HSL +/+ y HSL -/-

Aunque está descrito que los ratones HSL -/- no presentan cambios en los niveles plasmáticos de testosterona (Osuga et al. 2000), nos planteamos determinar si en nuestra colonia de ratones HSL -/- sucedía lo mismo. Además, como ya hemos comentado en la introducción, la síntesis de hormonas esteroideas se realiza a partir de colesterol (Holm et al. 1988). Por este motivo y por las implicaciones de la HSL sobre la disponibilidad de colesterol, debido a su participación en la homeostasis celular del mismo, es por lo que decidimos analizar los niveles de testosterona plasmática de los ratones que carecían de HSL respecto a los controles.

Como se puede ver en la figura 22, no hay diferencias en la concentración de testosterona en plasma entre los dos grupos de animales estudiados.

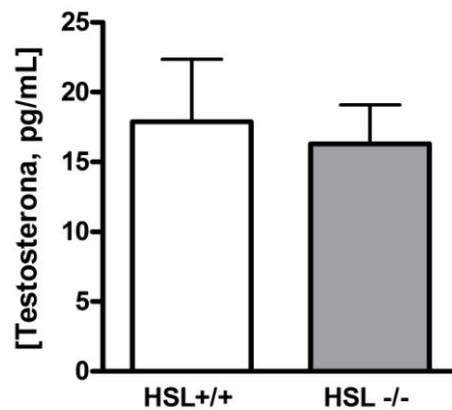


Figura 22. Concentración de testosterona en plasma de ratones HSL +/+ y HSL -/-. Los datos que se muestran son media \pm D.E., n=18-17.

5. Estudio histológico de los testículos de ratones HSL +/+ y HSL -/-

A continuación, dado que los ratones macho HSL -/- son estériles, los testículos son menores en peso, y además estos animales presentan un menor número y una baja movilidad de los espermatozoides; nos planteamos estudiar los cambios en los cortes histológicos de testículo de ratones HSL +/+ y HSL -/-.

El estudio histológico de los testículos tras la tinción con hematoxilina/eosina mostró que los testículos de los ratones HSL -/- adultos (16 semanas) eran atróficos (Figura 23). En los cortes semifinos transversales de los testículos observamos una disminución considerable de los diámetros de los túbulos seminíferos, con reducción y desorganización de las capas del epitelio seminífero. El grosor de la capa epitelial de los túbulos seminíferos de los testículos de los ratones HSL -/- esta reducido de 12 a 5-7 capas de células. Además, se observa una completa ausencia de espermatozoides maduros, las espermátidas se encuentran muy reducidas; llegando a encontrar espermátidas multinucleadas (Figura 23). También se observó una vacuolización excesiva en las células epiteliales. Estas vacuolas pudieran contener esteres de colesterol, ya que previamente se ha descrito un aumento de 2-3-veces en su contenido en los testículos de los ratones HSL -/- (Osuga et al. 2000, Chung et al. 2001). El espacio intertubular de los testículos de los ratones HSL -/- está ocupado por grupos de células de Leydig en todos los estadios del desarrollo (Figura 23). En los testículos de los ratones HSL +/+, la lámina propia está compuesta por una capa plana continua de células miodes alargadas separadas por la fina lámina basal de los dos túbulos seminíferos y del endotelio capilar linfático. En los testículos de los ratones HSL -/-, la lámina propia aumenta su espesor lo cual correlaciona con una mayor proliferación de las células miodes (Figura 23).

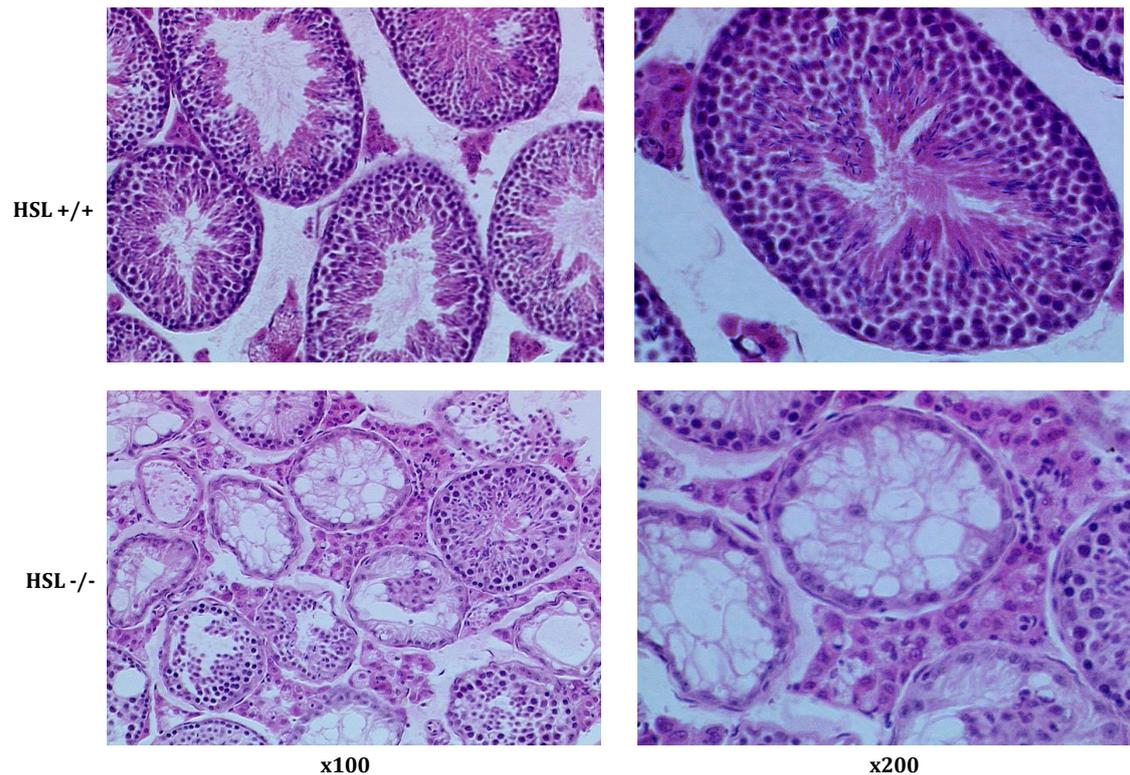


Figura 23. Cortes histológicos de los testículos de ratones HSL +/+ y HSL -/-, teñidos con hematoxilina/eosina. Se muestra una imagen representativa de 5 animales por grupo analizados.

A continuación, nos planteamos estudiar la expresión y la localización celular de proteínas claves en el metabolismo de lípidos del testículo, así como realizar un análisis histológico de los lípidos en el testículo para ver si su localización o su cantidad se encuentran afectadas por la carencia de HSL.

5.1. Inmunolocalización y expresión de HSL en testículo de ratones HSL +/+ y HSL -/-

En primer lugar decidimos estudiar la distribución de HSL en el testículo de los ratones HSL +/+ y confirmar su ausencia en los ratones HSL -/-.

Como se puede ver en la figura 24, los testículos de los ratones HSL +/+ presentan tinción positiva para HSL en el citoplasma de las células de Leydig y en el núcleo de las espermátidas alargadas localizadas en los túbulos seminíferos. Los testículos de los ratones HSL -/- resultaron inmunonegativos para HSL, como cabía esperar.

También analizamos la expresión de la proteína HSL mediante *western-blot* en lisados de testículo de ratón. Al igual que en estudios previos (Osuga et al. 2000, Chung et al. 2001), los testículos de los ratones expresan una proteína inmunoreactiva para HSL de 130 kDa (Figura 25). Sin embargo, como era de esperar, en los testículos de los ratones HSL -/- no se detectó.

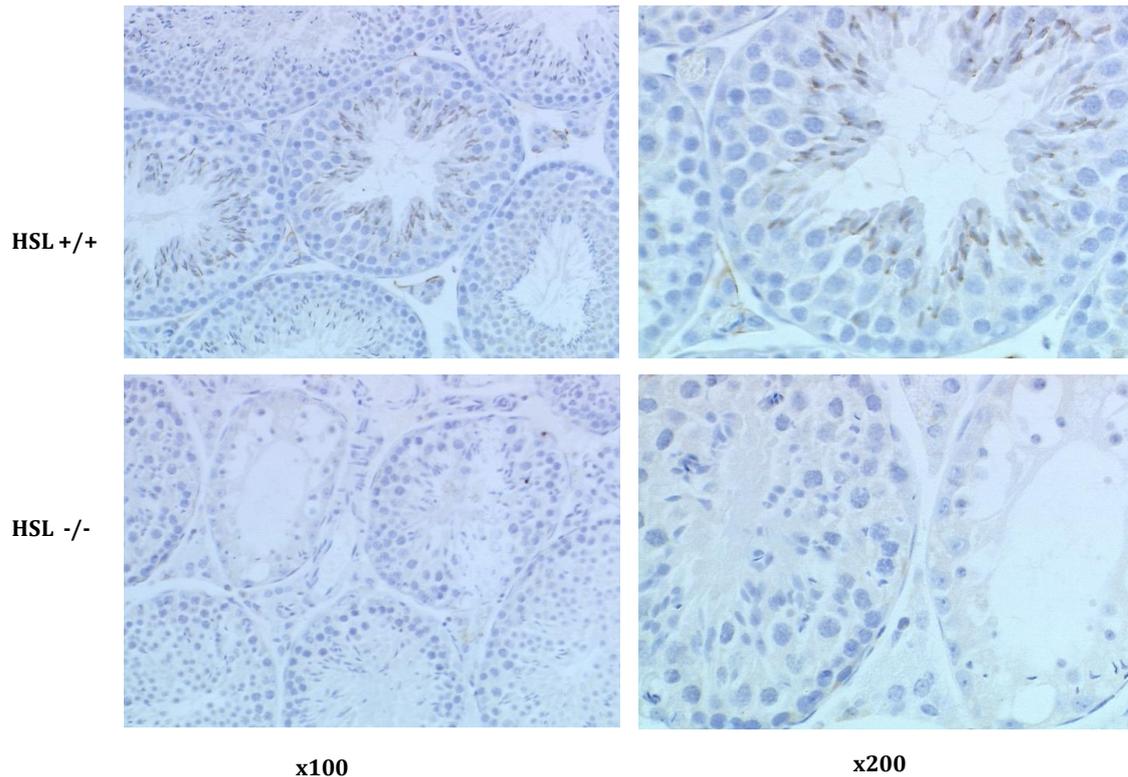


Figura 24. Fotografías de la inmunolocalización de HSL en el testículo de ratones HSL +/+ y HSL -/-. Los cortes histológicos se contrastaron con hematoxilina de *Carazzi* para la visualización de los núcleos celulares. Se muestra una imagen representativa de 5 animales por grupo analizados.

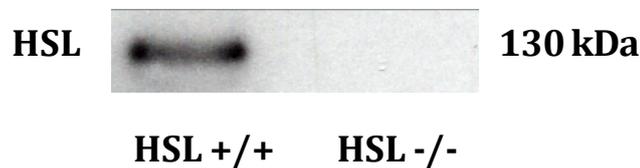


Figura 25. Expresión de HSL en lisados celulares de testículos de ratones HSL +/+ y HSL -/-. El análisis se realizó mediante *western-blot*. Se muestra una imagen representativa de un total de 5 animales por grupo analizados.

5.2. Efecto de la ausencia de HSL en la inmunolocalización de los receptores *scavenger* clase B en los testículo de ratones

Los SR-Bs, como ya hemos comentado en la introducción, se expresan en tejidos donde hay una gran demanda de colesterol, como son los tejidos esteroidogénicos. Una de las funciones de estos receptores en el testículo es captar específicamente los ésteres de colesterol transportados por las HDL, para proporcionar a este órgano el suficiente aporte de colesterol. Por todo esto, nos planteamos analizar en que tipos celulares del testículo se expresaban los distintos SR-Bs.

5.2.1. Inmunolocalización del receptor SR-BI en testículo de ratones HSL +/+ y HSL -/-

Como mostramos en la figura 26, los testículos de los ratones HSL +/+ presentan tinción positiva para SR-BI en la membrana de las células de Leydig y en las espermátidas alargadas de los túbulos seminíferos. En los testículos de los ratones HSL -/- se observa una mayor cantidad de células de Leydig y más tinción de SR-BI en estas células; así como la ausencia de espermátidas alargadas en los túbulos seminíferos.

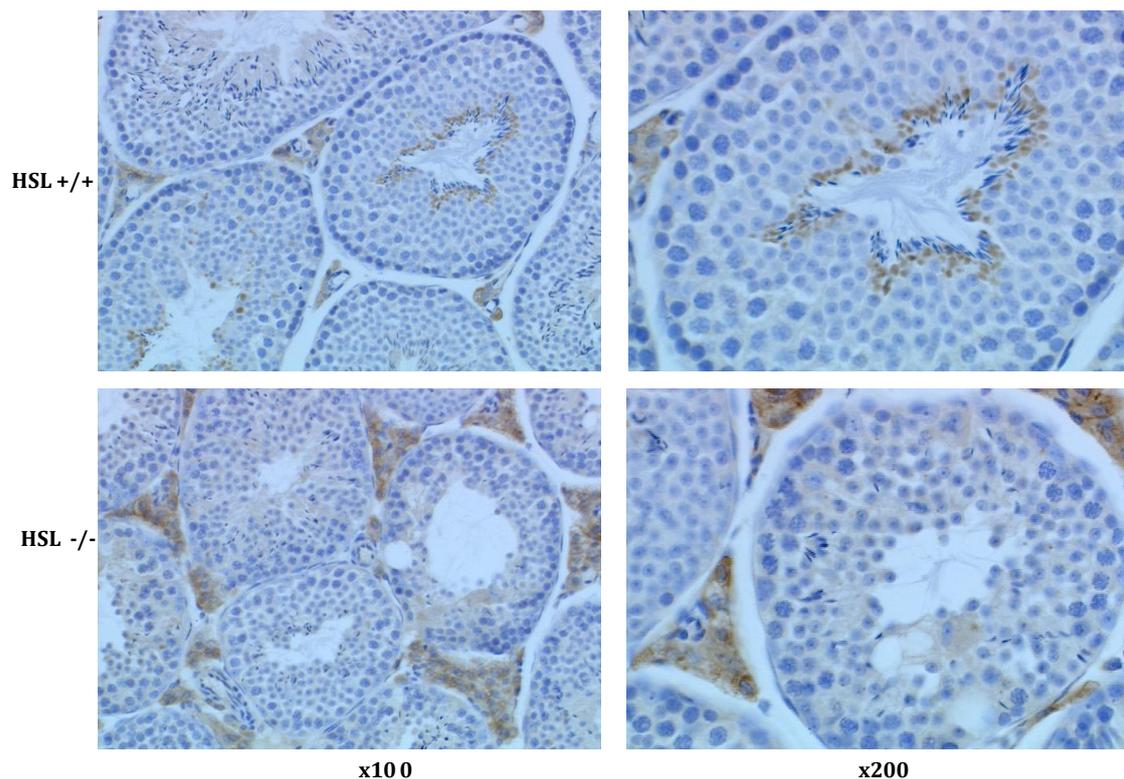


Figura 26. Fotografías de la inmunolocalización de SR-BI en los testículos de ratones HSL +/+ y HSL -/-. Los cortes histológicos se contrastaron con hematoxilina de *Carazzi* para la visualización de los núcleos celulares. Se muestra una imagen representativa de 5 animales por grupo analizados.

5.2.2. Inmunolocalización del receptor SR-BII en testículo de ratones HSL +/+ y HSL -/-

En los testículos de los ratones se observa una tinción positiva para SR-BII en la membrana de las células germinales (espermatocitos y espermatidas) y negativa en las células de Sertoli y de Leydig en ambos ratones (Figura 27). Pero, los testículos de los ratones HSL -/- muestran un aumento de la tinción positiva de SR-BII en las membranas de las células germinales de los túbulos seminíferos (Figura 27).

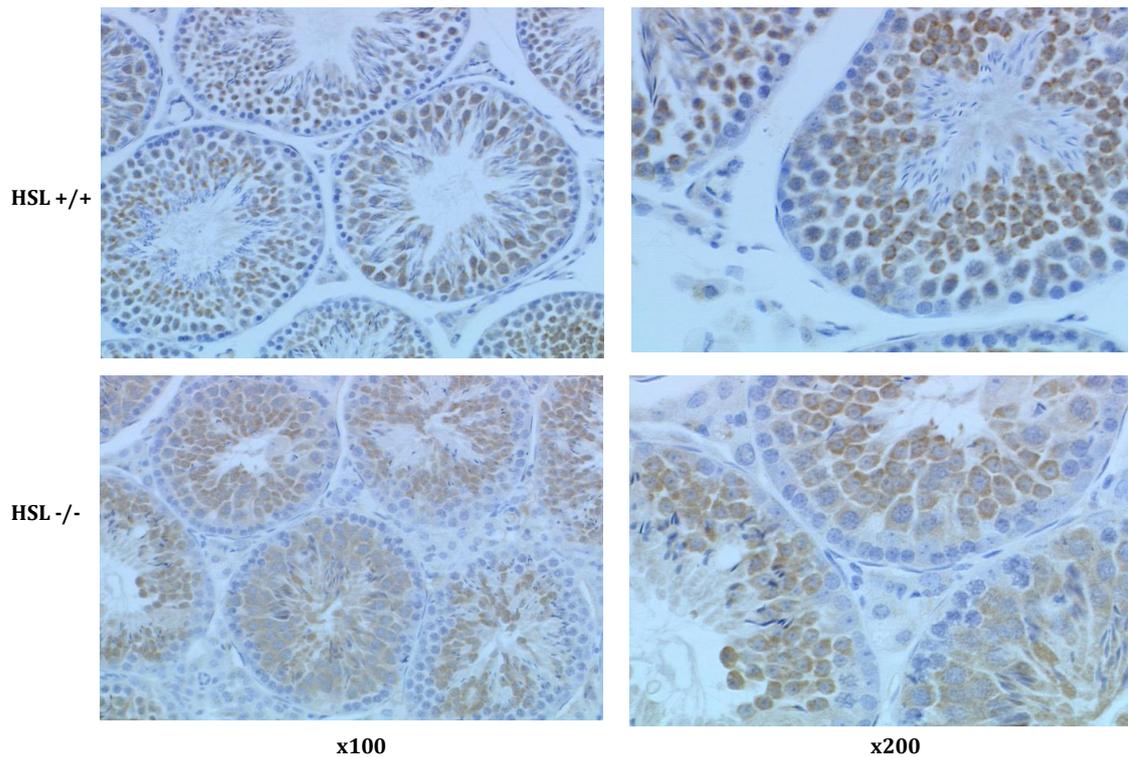


Figura 27. Fotografías de la inmunolocalización de SR-BII en los testículos de ratones HSL +/+ y HSL -/-. Los cortes histológicos se contrastaron con hematoxilina de Carazzi para la visualización de los núcleos celulares. Se muestra una imagen representativa de 5 animales por grupo analizados.

5.2.3. Inmunolocalización del receptor LIMPII en testículo de ratones HSL +/+ y HSL -/-

Como se muestra en la figura 28, los testículos de los ratones control presentan tinción positiva para LIMPII en la membrana de las células de Sertoli y en las células de Leydig. En el caso de los testículos de los ratones HSL -/- puede verse un aumento de la tinción para LIMPII en ambos tipos celulares (Sertoli y Leydig).

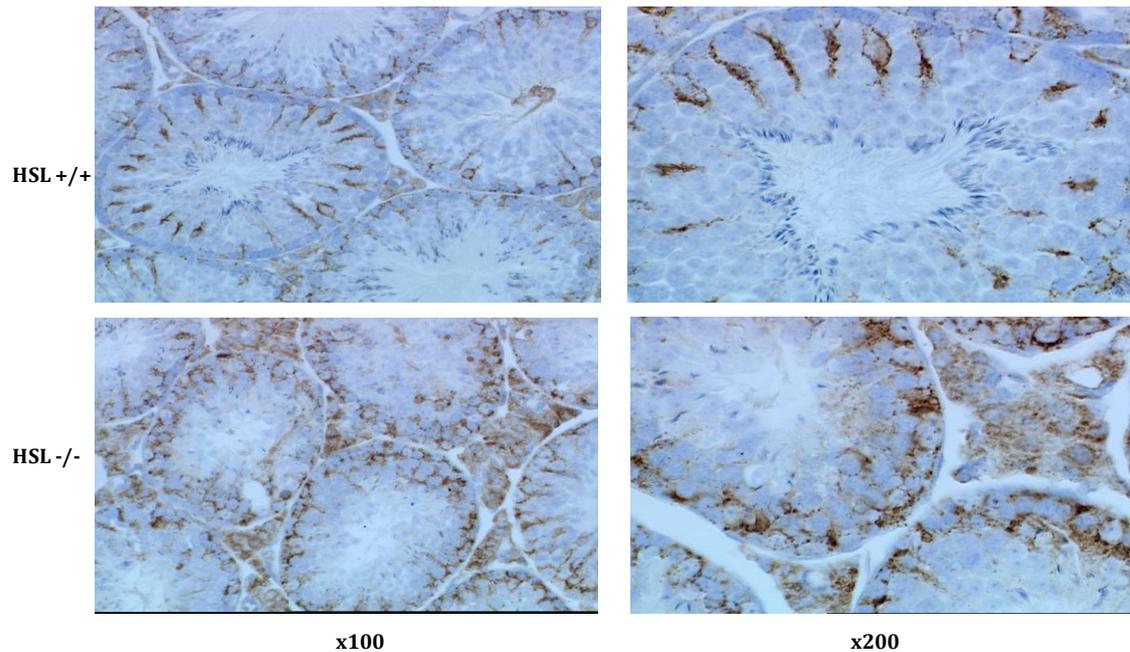


Figura 28. Fotografías de la inmunolocalización de LIMPII en los testículos de ratones HSL +/+ y HSL -/-. Los cortes histológicos se contrastaron con hematoxilina de Carazzi para la visualización de los núcleos celulares. Se muestra una imagen representativa de 5 animales por grupo analizados.

5.3. Estudio histológico de los lípidos en testículo de ratones HSL +/+ y HSL -/-

5.3.1. Tinción de colesterol libre con filipina

Debido al importante papel que tiene la HSL en el mantenimiento de la homeostasis del colesterol, nos planteamos analizar el colesterol libre, mediante la tinción con filipina.

En los testículos de los ratones HSL +/+ observamos una tinción positiva con filipina mayor en las células de Leydig y en todas las células germinales (espermatozonias, espermatozonios primarios y secundarios, y espermátidas redondas y alargadas) del túbulo seminífero (Figura 29). En los testículos de los ratones HSL -/- observamos una tinción menor en la parte central del túbulo seminífero puesto que la espermatogénesis no es completa (Figura 29).

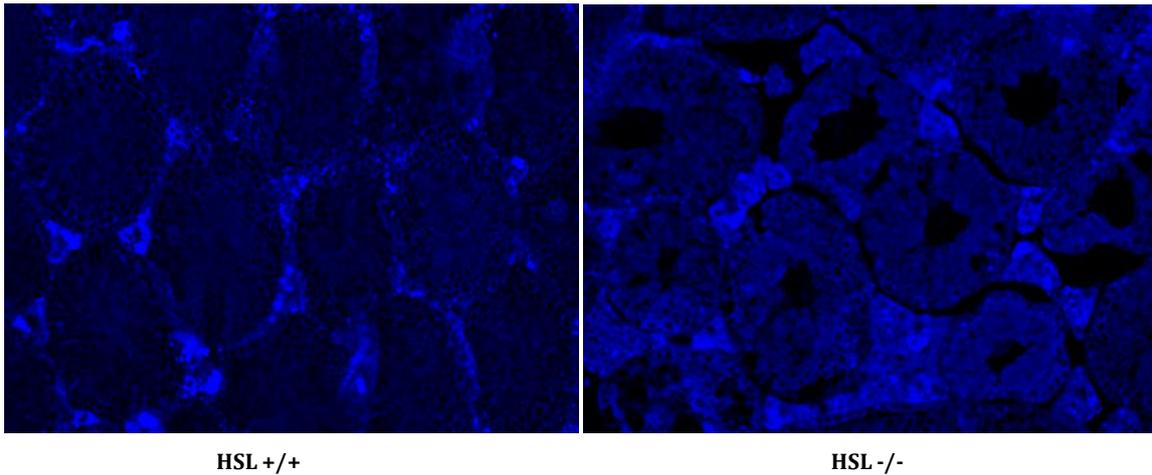


Figura 29. Cortes histológicos de los testículos de ratones HSL +/+ y HSL -/-, teñidos con filipina. Se muestra una imagen representativa de 5 animales por grupo analizados.

5.3.2. Tinción de lípidos neutros con Oil-Red

Además quisimos completar el estudio histológico realizando una tinción de los lípidos neutros con la técnica del Oil-Red.

Se observa una tinción positiva en las células de Leydig tanto en los testículos de los ratones HSL +/+ como en los de los ratones HSL -/-; pareciendo mas abundante en las testículos que carecen de HSL (Figura 30).

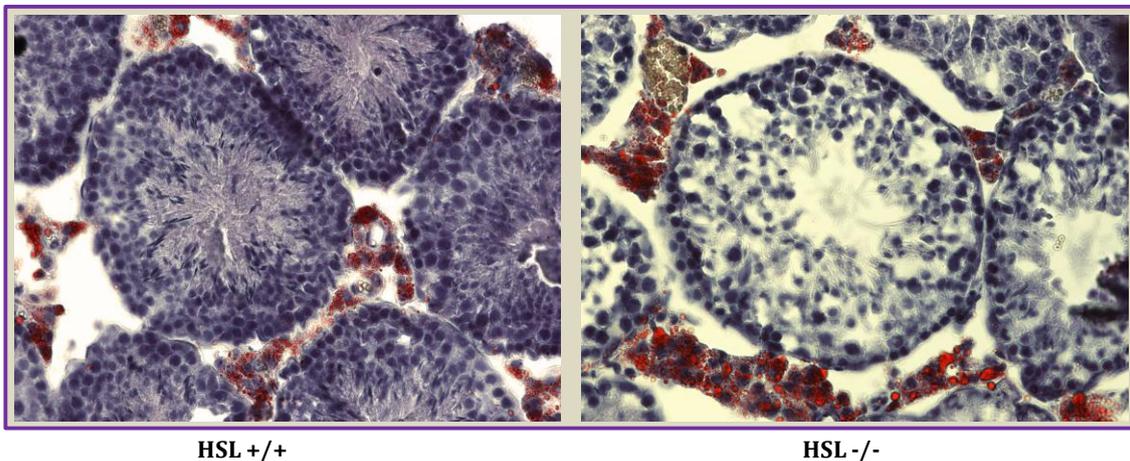


Figura 30. Cortes histológicos de los testículos de ratones HSL +/+ y HSL -/-, teñidos con Oil Red. Se muestra una imagen representativa de 4 animales por grupo analizados.

En conjunto, observamos una acumulación de lípidos neutros y esteroles en las células de Leydig en los testículos de los ratones que carecen de la HSL comparados con los controles.

6. Estudio de la expresión de SR-Bs en lisados celulares de testículo de ratones HSL +/+ y HSL -/-

Como hemos visto anteriormente, los receptores *scavenger* clase B (SR-BI, SR-BII y LIMPII) estudiados en este trabajo, en general, presentaban una mayor tinción en los testículos de los ratones HSL -/- mediante los estudios inmunohistoquímicos. Por lo que nos planteamos hacer un estudio de expresión de las proteínas de los receptores SR-Bs en los lisados celulares de los testículos de los ratones de nuestra colonia para ver las isoformas presentes y si se confirmaban las diferencias observadas previamente.

6.1. Expresión de SR-BI en los testículos de los ratones HSL +/+ y HSL -/-

Se analizó la expresión de SR-BI utilizando la técnica de *western-blot*, y observamos que en los lisados de testículos de ratones HSL +/+ se expresan dos isoformas de la proteína de SR-BI; una con un peso molecular de 82 KDa y la otra de 57 KDa (Figura 31) En los testículos de ratones HSL -/- se ve una mayor expresión de ambas formas del receptor.

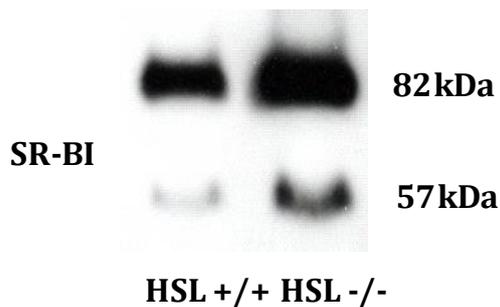


Figura 31. Expresión de SR-BI en lisados celulares de testículos de ratones HSL +/+ y HSL -/-. El análisis se realizó mediante *western-blot*. Se muestra una imagen representativa de un total de 5.

6.2. Expresión de SR-BII en el testículo de ratones HSL +/+ y HSL -/-

Cuando analizamos la expresión de SR-BII mediante *western-blot* observamos que en los lisados de testículos de ratones HSL+/+ aparece una banda a 82 KDa que estaba sobreexpresada en los ratones HSL-/- (Figura 32).

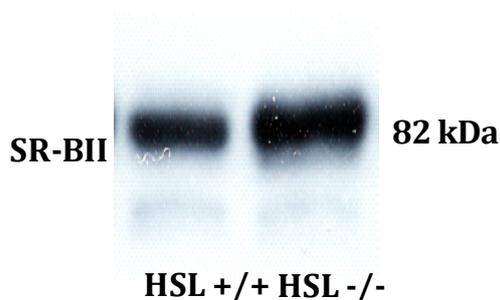


Figura 32. Expresión de SR-BII en lisados celulares de testículos de ratones HSL +/+ y HSL -/-. El análisis se realizó mediante *western-blot*. Se muestra uno representativo de un total de 5.

7. Efecto de la ausencia de HSL sobre la expresión de diferentes proteínas implicadas en rutas de señalización celular en los testículos de ratones

Ha sido descrito que la unión de HDL a SR-BI activa la cascada de señalización de la familia de las quinasas SRC, PI3K/AKT y MAPK en células endoteliales (Mineo et al. 2003). Por otro lado hemos observado que los ratones HSL $-/-$ presentan un aumento de la expresión de SR-BI; nos planteamos estudiar la expresión de algunas proteínas de las rutas de señalización relacionadas con SR-BI en los lisados celulares de los testículo de los ratones de nuestra colonia HSL.

Como se puede ver en la figura 33, comprobamos que los testículos de los ratones HSL $+/+$ se expresan las formas fosforiladas y totales de las proteínas ERK, AKT, SRC. Los testículos de los ratones que carecen de actividad HSL (HSL $-/-$) tienen inducida la fosforilación (activación) de diferentes proteínas claves implicadas en las rutas de señalización celular, como son p-ERK, p-AKT y p-SRC, para las que hemos encontrado un aumento significativo de la expresión respecto a los controles. Sin embargo, no hemos encontrado cambios significativos en las formas totales de dichas proteínas.

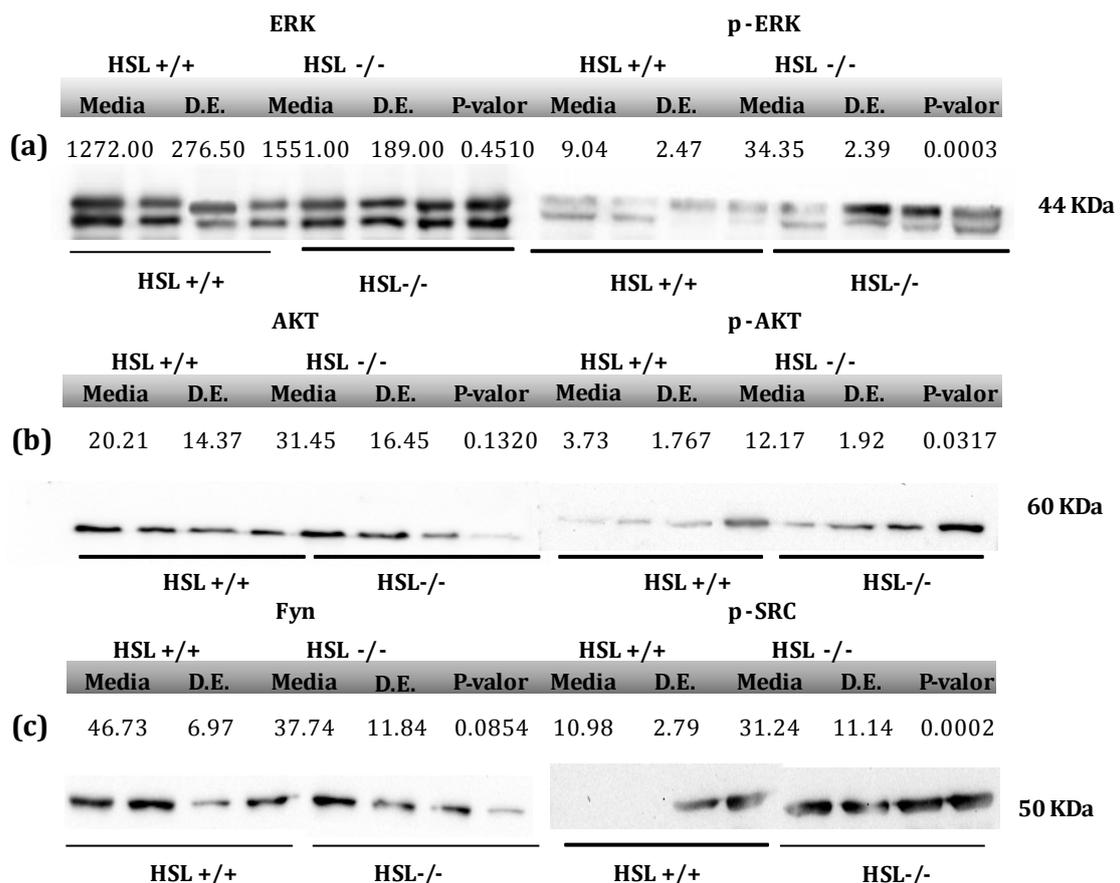


Figura 33. Análisis de las vías de transducción de señales en lisados de testículos de ratones HSL $+/+$ y HSL $-/-$. (a) Expresión de ERK y p-ERK. (b) Expresión de AKT y p-AKT. (c) Expresión de Fyn y p-SRC. Los datos se muestran como media \pm DE; n=4; * p<0.05. Cada uno de ellos con su foto de *Western-blot* correspondiente y la tabla resumen de la cuantificación de los niveles de expresión mediante densitometría de las bandas.

En resumen, lo que hemos observado es una sobreexpresión de los receptores SR-B en los testículos de los ratones HSL $-/-$ y una activación de varias rutas de señalización intracelular mediadas por los receptores SR-B como son ERK, AKT y SRC.

8. Análisis de la composición de esteroides totales en el testículo de ratones HSL $+/+$ y HSL $-/-$

Está descrito que en los testículos de los ratones HSL $-/-$ hay un aumento en colesterol esterificado (Osuga et al. 2000) y diacilglicerol (Wang et al. 2001). En el presente trabajo quisimos, por un lado comprobar si el colesterol también estaba aumentado en nuestra colonia de ratones HSL $-/-$ y profundizar en el análisis de los distintos esteroides intermediarios de la biosíntesis de colesterol analizando su composición en el testículo mediante la técnica de GC/EM. La técnica GC/EM nos permite identificar todos los esteroides intermediarios de la ruta de biosíntesis de colesterol, así como cuantificar la gran mayoría de ellos. Además, como ya hemos comentado en la introducción, los esteroides intermediarios de la biosíntesis de colesterol tienen una función biológica añadida a la de puros intermediarios del colesterol.

Los esteroides identificados en nuestras muestras fueron lanosterol, FF-MAS, colest-8,14-dienol, T-MAS, latosterol, desmosterol y colesterol (Figura 34). Como puede observarse en la figura 34, hemos hallado un aumento significativo de FF-MAS en los testículos de los ratones HSL $-/-$ respecto de los controles; éste esteroide como ya apuntamos en la introducción, interviene en la ovogénesis promoviendo la transición de metafase I a metafase II facilitando la maduración de los ovocitos (Marin Bivens *et al.* 2004). Además, en los testículos de los ratones que carecen de la HSL se observa un aumento significativo de colesterol total, este aumento puede ser debido al aumento de colesterol esterificado que ya ha sido hallado por otros autores en estos ratones HSL $-/-$ (Figura 34) (Osuga et al. 2000).

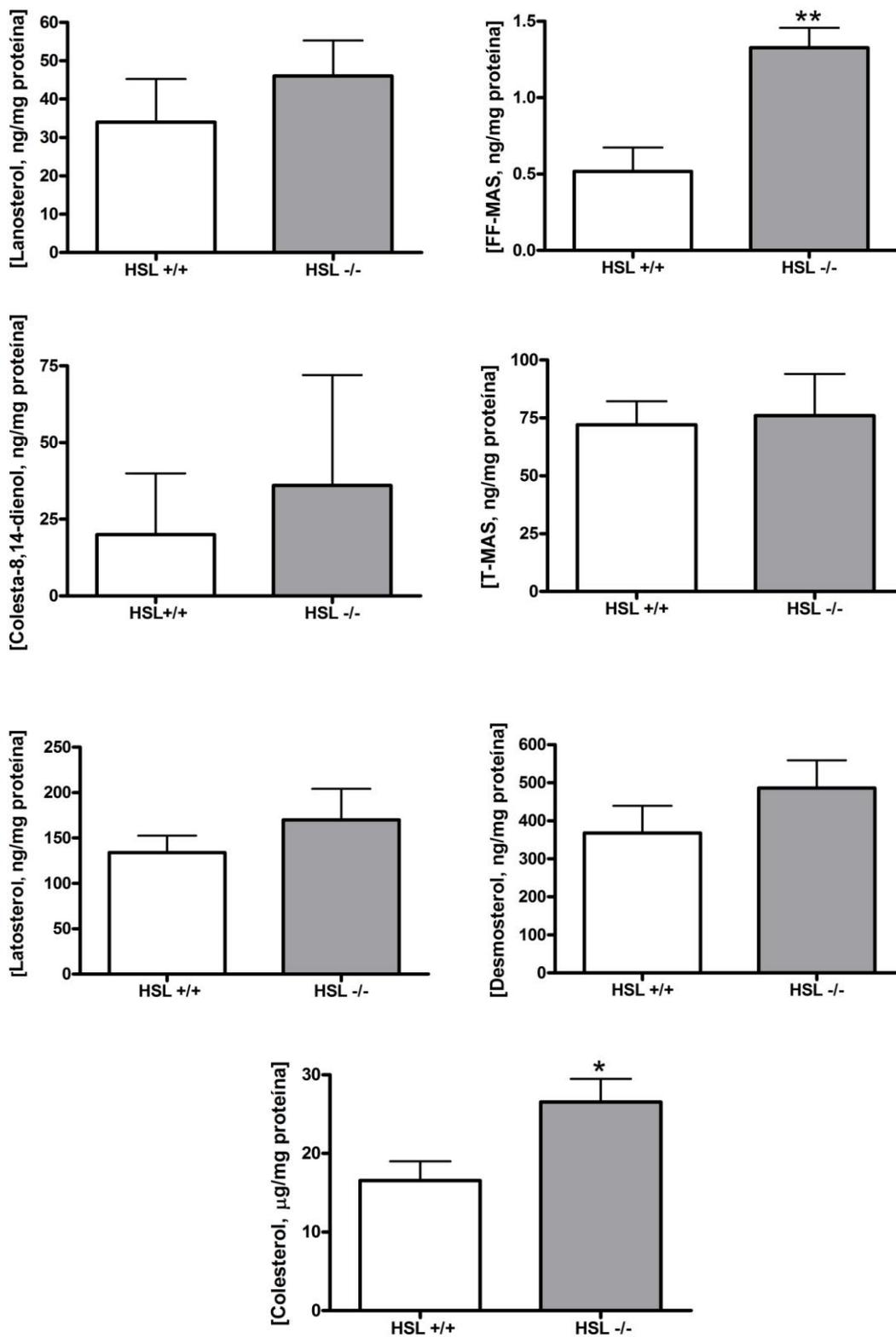


Figura 34. Concentración total de esteroides en testículo de ratones HSL +/+ y HSL -/-. Los datos mostrados se expresan en ng o µg por mg de proteína y son media ± D.E, n=5. Las comparaciones estadísticas se han realizado respecto a los controles HSL +/+, * P<0.05, ** P<0.005

9. Aislamiento de fracciones de membrana e identificación de los dominios *lipid rafts* en testículo de ratones HSL +/+ y HSL -/-

Para poder emprender un estudio detallado del efecto provocado por la carencia de HSL sobre la estructura y funcionalidad de los *lipid rafts* en testículo de ratón, primero desarrollamos un método que permitiera el aislamiento e identificación de dichas regiones de membrana. Con este objetivo, los testículos se sometieron al fraccionamiento de membrana descrito en el apartado 8 de Material y Métodos y se analizaron mediante *western-blot* los niveles de caveolina-1 (proteína característica de estos dominios), y el receptor de transferrina (RTf) (proteína característica de las regiones de membrana *no-raft*), para identificar las fracciones correspondientes a los *lipid rafts* y a las *no-raft*, respectivamente (Figura 35). Los resultados nos permitieron determinar que los *lipid rafts* se localizaban en las fracciones 2 y 3 por su alto contenido de caveolina-1 y las zonas correspondientes a los *no-raft* se aislaban en las fracciones de la 8 a la 12 del gradiente de densidad (fracciones donde se detecta el RTf) (Figura 35).

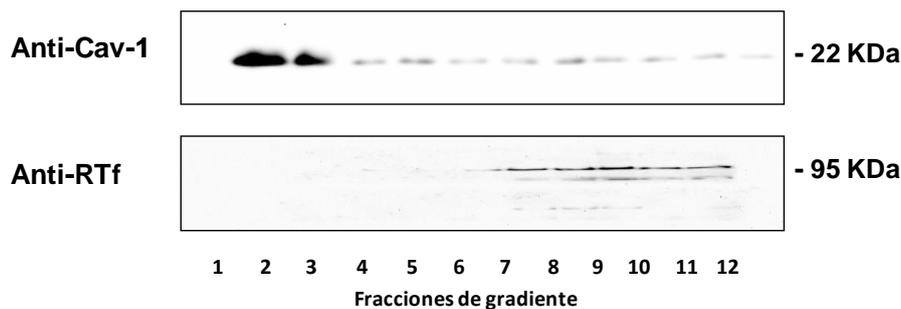


Figura 35. Western-blot de caveolina-1 (Cav-1) (proteína característica de los dominios *lipid raft*) y receptor de transferrina (RTF) (proteína característica de las regiones de membrana *no-raft*), para identificar los distintos dominios de membrana de los testículos de ratón aislados mediante gradiente de densidad en sacarosa.

9.1. Distribución de caveolina-1 en los dominios de la membrana plasmática (*lipid raft* y *no-raft*) de testículos de ratones HSL +/+ y HSL -/-

La distribución de la caveolina-1 como componente de las regiones *lipid raft* de las membranas es un buen indicador de la estructura e integridad de estos microdominios de membrana. Por ello, nos planteamos analizar la distribución de caveolina-1 en ambos dominios de la membrana plasmática (*lipid raft* y *no-raft*) de testículos de ratones HSL +/+ y HSL -/-.

Como puede observarse en la figura 36, la ausencia de HSL en el testículo de ratón provoca una disminución significativa del contenido de caveolina-1 en las fracciones de *lipid raft* y un aumento de su expresión en las fracciones de membrana *no-raft*, respecto al control.

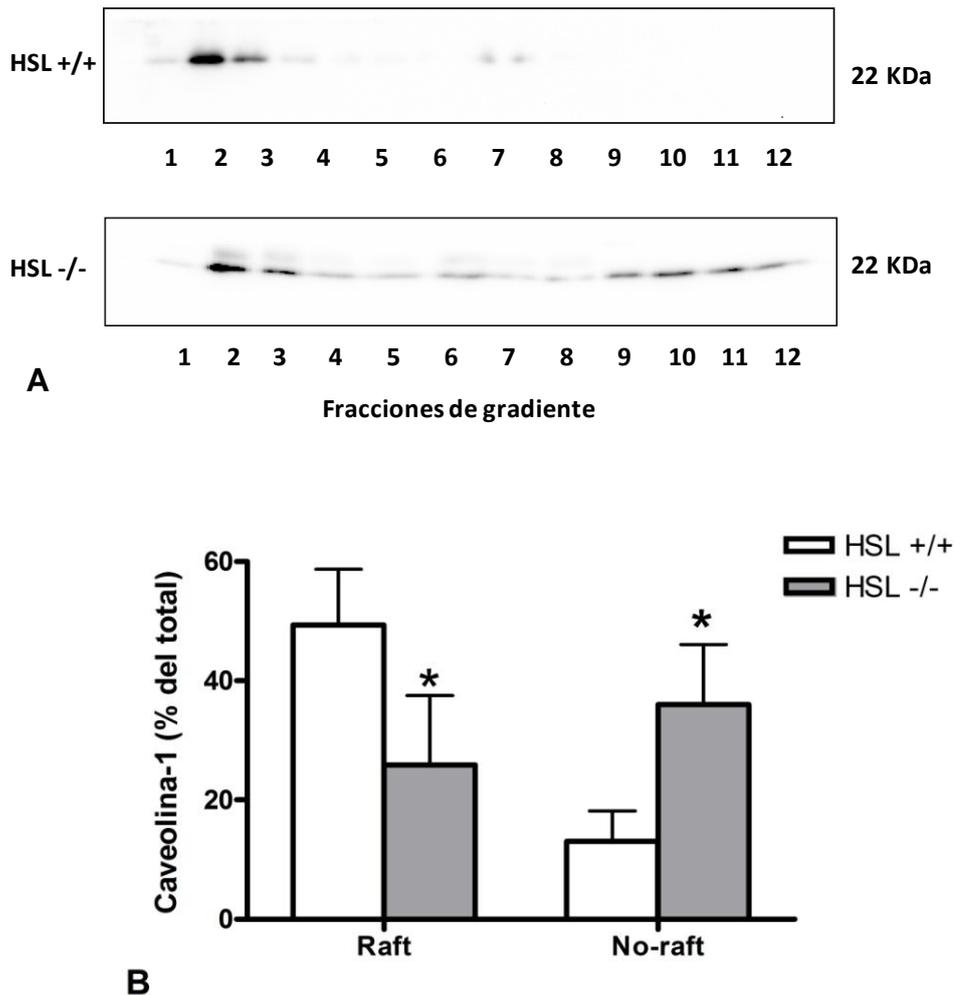


Figura 36. Efecto de la carencia de HSL sobre la distribución de la caveolina-1 en los distintos dominios de membrana en testículos HSL +/+ y HSL -/-. A. Western-blot de caveolina-1 en las distintas fracciones de membrana plasmática de testículo de ratones HSL +/+ y HSL -/-. B. Representación gráfica de la cuantificación de los niveles de caveolina-1 en las fracciones del gradiente. Los datos se expresan como % de caveolina-1 en cada fracción respecto al total (media \pm D.E.; n=4). * p<0.05.

Estos resultados indican que la ausencia de HSL en el testículo provoca una deslocalización de componentes de membrana típicamente localizados en *lipid raft*, la caveolina-1, lo cual apunta a que la ausencia de HSL conduce a una desestructuración de estos dominios.

9.2. Análisis de la distribución y expresión de los receptores *scavenger* clase B en los dominios de la membrana de los testículos de ratones HSL +/+ y HSL -/-

Según los datos recogidos en la literatura, SR-BI y SR-BII se localizan en los microdominios de membrana plasmática correspondientes a los *lipid rafts* (Babitt et al. 1997, Webb et al. 1998, Uittenbogaard 2000). Así, una vez conocida la alteración de la estructura de los *lipid rafts* en los testículos de los ratones HSL -/-, quisimos analizar a que

dominios de la membrana se encontraban asociados los receptores SR-BI y SR-BII; y si la carencia de HSL, que como ya hemos visto provocaba un aumento en la expresión total de los SR-Bs, provocaba un cambio en la localización de estos receptores en los distintos dominios de la membrana plasmática.

Como ya hemos visto en el apartado 3.3.1 de la introducción, hay dos formas de SR-BI; una forma inmadura de 57 KDa y una forma glicosilada o madura de 82 KDa (Rhainds et al. 2004). En los testículos de los ratones controles, la forma **madura de SR-BI** está presente en ambos dominios de la membrana plasmática, *lipid raft* y *no-raft* y lo mismo ocurre en los ratones HSL -/- (Figura 37). En los ratones HSL -/- observamos un aumento en la expresión de la forma madura del receptor en ambas regiones de la membrana de los testículos, en comparación con los controles (Figura 37). Mientras que la forma **inmadura de SR-BI** sólo se localiza en las fracciones de membrana *no-raft*, encontrándose también aumentada su expresión en los testículos de los ratones HSL -/-.

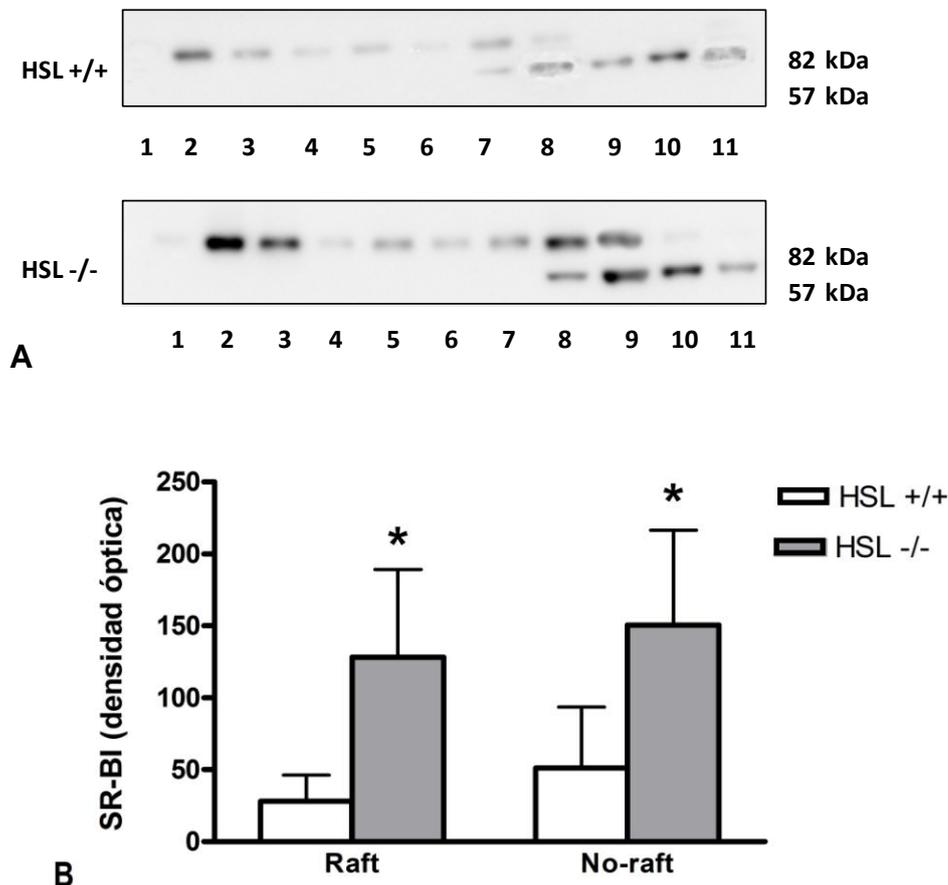


Figura 37. Efecto de la ausencia de HSL en la distribución de SR-BI en los dominios de la membrana plasmática de testículos de ratones. **A.** Western-blot para SR-BI de las distintas fracciones de membrana en testículos de ratones HSL +/+ y HSL -/-. **B.** Cuantificación densitométrica de los niveles de la forma madura de SR-BI en zonas de membrana *lipid raft* y *no-raft* (media \pm DE; n=4; * p<0.05).

A continuación pasamos a valorar la distribución **SR-BII** en ambos dominios de la membrana, *lipid raft* y *no-raft*. Los resultados muestran que SR-BII se localiza en ambos dominios de la membrana, *lipid raft* y *no-raft*, no habiendo diferencias ni en cuanto a su distribución ni en su expresión en los testículos de ratones HSL *-/-* en comparación con los controles (Figura 38).

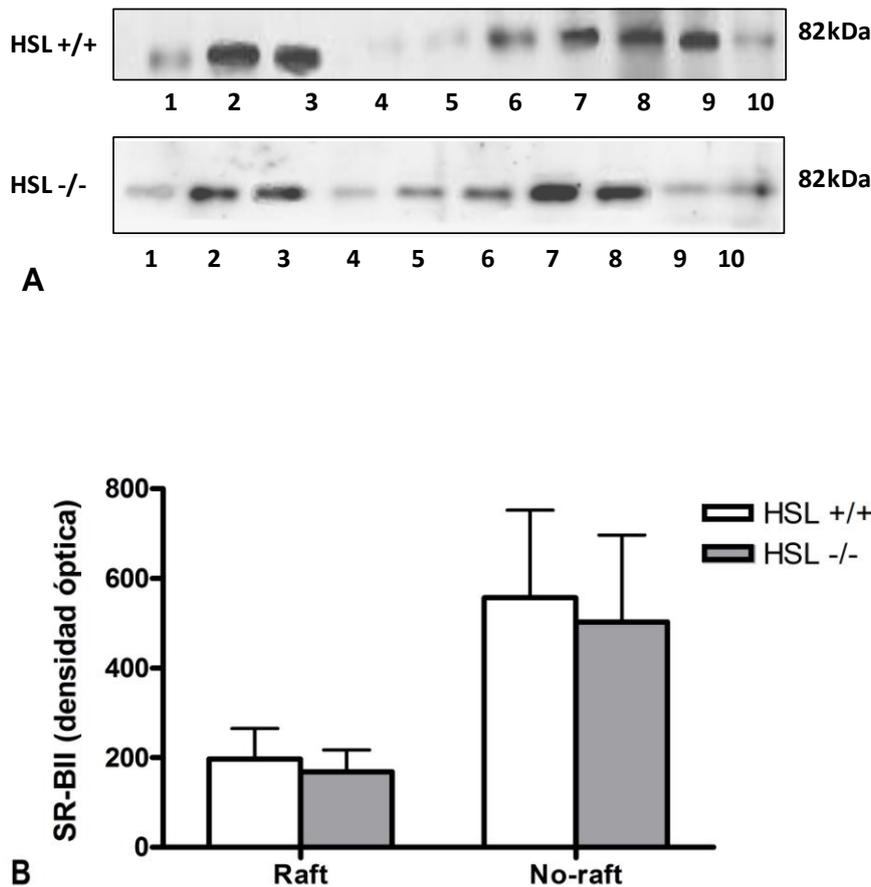


Figura 38. Cuantificación densitométrica de SR-BII en los dominios de la membrana plasmática de testículos de ratones. A. Western-blot para SR-BII de las distintas fracciones de membrana en testículos HSL +/+ y HSL -/-. B. Cuantificación densitométrica de los niveles de la forma madura de SR-BII en zonas de membrana *lipid raft* y *no-raft* (media \pm DE; n=4).

9.3. Efecto de la ausencia de HSL sobre la composición de esteroides en los dominios de la membrana plasmática de los testículos de ratones

Los dominios de membrana *lipid rafts* son zonas de la membrana plasmática ricas en colesterol y esfingolípidos (Pike 2006). El colesterol es una molécula que forma parte esencial en la constitución de las membranas celulares, y tiene un papel crucial en la función de la membrana (Simons & Ikonen 2000). En nuestro estudio, tras haber hallado que los ratones que carecen de HSL presentan una desestructuración de los microdominios de membrana y que presentan un aumento de concentración de colesterol

y FF-MAS en el testículo, decidimos analizar que ocurría con la composición de esteroides en los distintos dominios de la membrana plasmática en el testículo de estos ratones que carecen de HSL comparándolas con los controles mediante CG/EM.

En la figura 39 se representan las gráficas de los distintos esteroides detectados (lanosterol, T-MAS, latosterol, desmosterol y colesterol) en las fracciones de membrana *lipid raft* (fracciones 2 y 3) y las fracciones de membrana *no-raft* (fracciones 8, 9 y 10) del testículo de los ratones HSL +/+ vs. HSL -/-. Para todos los esteroides estudiados, observamos una mayor concentración en las fracciones *lipid raft* que en las *no-raft* de las membranas de testículos de ratón, tanto control como HSL -/-; siendo el colesterol el esteroide mayoritario (Figura 39).

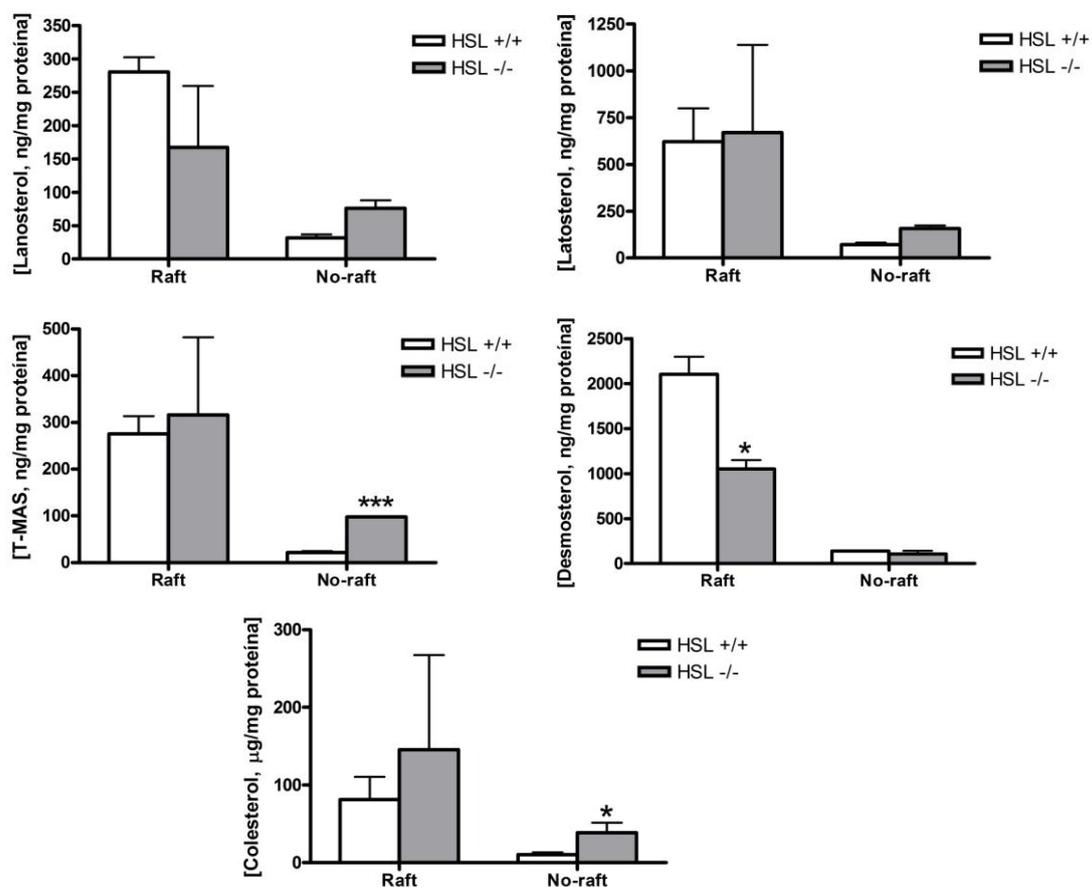


Figura 39. Concentración de esteroides en los dominios de membrana plasmática, *lipid raft* y *no-raft* de testículo de ratones HSL +/+ y HSL -/-. Los datos se han obtenido del sumatorio de las concentraciones en las fracciones *lipid raft* (2-3) y *no-raft* (8-10). Se expresan en ng o µg por mg de proteína y con media ± D.E, n=3. Las comparaciones estadísticas se han realizado respecto a los controles, * P<0.05, *** P<0.0005.

Si analizamos en detalle cada esteroide, en el caso de lanosterol y latosterol no se observan cambios en su presencia en ambas regiones de la membrana plasmática *lipid raft*

y *no-raft*. Si nos fijamos en los datos del T-MAS vemos un aumento significativo en las zonas de membrana *no-raft* de los testículos de los ratones HSL *-/-* respecto a los controles, no así en las fracciones *lipid raft* donde no se observan diferencias (Figura 39). En cuanto al desmosterol hay un descenso significativo de sus niveles en los dominios *lipid raft* no presentando cambios en los dominios *no-raft*.

Por último, se observa una tendencia a mayores niveles de colesterol en los dominios *lipid raft* en los testículos de los ratones HSL *-/-*, aunque este cambio no es significativo, en cambio sí que es significativo el aumento de los niveles de colesterol en los dominios *no-raft* de la membrana plasmática (Figura 39).

En resumen, vemos un cambio en la composición en esteroides tanto en los dominios *lipid raft* como en los *no-raft* aislados de testículos de ratones HSL *-/-* en comparación con los controles. Este cambio pudiera alterar el buen funcionamiento y el papel que juegan estos dominios en la fisiología del testículo.

10. Estudio de la expresión diferencial de genes mediante la técnica de *microarray*

El 32K *Mouse Genome Array* es una herramienta muy útil para estudiar los perfiles de expresión de los genes de ratón, por lo que nos planteamos utilizar este *array* para analizar si la ausencia de HSL afecta a la expresión de genes en los testículos de los ratones de la colonia.

En la tabla 5, se muestran algunos de los genes estudiados agrupados en función del metabolismo o ruta a la que pertenecen. Si nos fijamos en el grupo de genes correspondiente al metabolismo de los AG podemos ver que, en general, están sobreexpresados, al igual que ocurre con los del metabolismo de esteroides y de las hormonas esteroideas. Por otro lado, en el grupo de los genes relacionados con el testículo y la espermatogénesis, el resultado es más heterogéneo encontrándose algunos reprimidos, otros sobreexpresados o sin cambios, igual que en el grupo de los genes del metabolismo del ácido retinoico. Si observamos los resultados obtenidos en el grupo de genes implicados en la transducción de señales vemos que la mayoría se encuentran sobreexpresados aunque los de las rutas de las MAPK están reprimidos (Tabla 5).

Símbolo	Nombre del gen	
FAS	<i>fatty acid synthase</i>	Yellow
FADS1	<i>fatty acid desaturase 1</i>	Red
FADS2	<i>fatty acid desaturase 2</i>	Red
ELOVL2	<i>elongation of very long chain fatty acids-like 2</i>	Yellow
ELOV6	<i>ELOVL family member 6, elongation of long chain fatty acids</i>	Yellow
SCD1	<i>stearoyl-CoA desaturase (delta-9-desaturase)</i>	Red
SCD2	<i>stearoyl-Coenzyme A desaturase 2</i>	Red
ACAA2	<i>acetyl-Coenzyme A acyltransferase 2</i>	Red
ACOX1	<i>acyl-Coenzyme A oxidase 1, palmitoyl</i>	Red
ABHD6	<i>abhydrolase domain containing 6</i>	Red
AACS	<i>acetoacetyl-CoA synthetase</i>	Yellow
ABCA1	<i>ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 1</i>	Yellow
TESK1	<i>testis-specific kinase 1</i>	Green
TESSP1	<i>testis serine protease 1</i>	Yellow
4930486L24RIK	<i>RIKEN cDNA 4930486L24 gene</i>	Red
SPAM1 (includes EG:20690)	<i>sperm adhesion molecule 1</i>	Green
SPAM1 (includes EG:6677)	<i>sperm adhesion molecule 1</i>	Green
CREB3	<i>cAMP responsive element binding protein 3</i>	Red
SREBF1	<i>sterol regulatory element binding transcription factor 1</i>	Yellow
SREBF2	<i>sterol regulatory element binding transcription factor 2</i>	Yellow
EBP	<i>emopamil binding protein (sterol $\Delta^{8,7}$ isomerase)</i>	Red
HMGCR	<i>3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A reductase</i>	Yellow
HMGCS1	<i>HMG-Coenzyme A synthase 1 (soluble)</i>	Yellow
HMGCS2	<i>HMG-Coenzyme A synthase 2 (mitochondrial)</i>	Red
SC4MOL	<i>sterol-C4-methyl oxidase-like</i>	Red
SOAT1	<i>sterol O-acyltransferase 1</i>	Red
APOC1	<i>apolipoprotein C-I</i>	Red
APOE	<i>apolipoprotein E</i>	Red
SCARB1	<i>scavenger receptor class B, member 1</i>	Yellow
MSR1	<i>macrophage scavenger receptor 1 SRA</i>	Green
CD36	<i>CD36 molecule (thrombospondin receptor)</i>	Red

Símbolo	Nombre del gen	
RARA	<i>retinoic acid receptor, alpha</i>	Red
RARB	<i>retinoic acid receptor, beta</i>	Green
RARG	<i>retinoic acid receptor, gamma</i>	Yellow
RARRES2	<i>retinoic acid receptor responder 2</i>	Red
RBP1	<i>retinol binding protein 1, cellular</i>	Red
RBP2	<i>retinol binding protein 2, cellular</i>	Yellow
RBP3	<i>retinol binding protein 3, interstitial</i>	Yellow
RBP4	<i>retinol binding protein 4, plasma</i>	Red
RBP7	<i>retinol binding protein 7, cellular</i>	Red
RDH11	<i>retinol dehydrogenase 11 (all-trans/9-cis/11-cis)</i>	Green
RETSAT	<i>retinol saturase (all-trans-retinol 13,14-reductase)</i>	Red
CYP17A1	<i>cytochrome P450, family 17, subfamily A, polypeptide 1</i>	Red
HSD3B1	<i>hydroxy-delta-5-steroid dehydrogenase, 3 beta- and steroid delta-isomerase 1</i>	Red
HSD3B2	<i>hydroxy-delta-5-steroid dehydrogenase, 3 beta- and steroid delta-isomerase 2</i>	Red
HSD3B4	<i>hydroxy-delta-5-steroid dehydrogenase, 3 beta- and steroid delta-isomerase 4</i>	Red
HSD3B5	<i>hydroxy-delta-5-steroid dehydrogenase, 3 beta- and steroid delta-isomerase 5</i>	Yellow
HSD3B7	<i>hydroxy-delta-5-steroid dehydrogenase, 3 beta- and steroid delta-isomerase 7</i>	Red
HSD17B3	<i>hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 3</i>	Red
HSD17B4	<i>hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 4</i>	Yellow
HSD17B6	<i>hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 6 homolog</i>	Yellow
HSD17B7	<i>hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 7</i>	Yellow
HSD17B8	<i>hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 8</i>	Yellow
HSD17B10	<i>hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 10</i>	Red
HSD17B12	<i>hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 12</i>	Red
HSD17B13	<i>hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 13</i>	Yellow
HSD17B14	<i>hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 14</i>	Yellow
CYP21A2	<i>cytochrome P450, family 21, subfamily A, polypeptide 2</i>	Yellow
CSK	<i>c-src tyrosine kinase</i>	Red
SSR4	<i>signal sequence receptor, delta</i>	Red

Símbolo	Nombre del gen	
STAT1	<i>signal transducer and activator of transcription 1, 91kDa</i>	Red
STAT2	<i>signal transducer and activator of transcription 2, 113kDa</i>	Yellow
JAK1	<i>Janus kinase 1</i>	Red
JAK2	<i>Janus kinase 2</i>	Red
JAK3	<i>Janus kinase 3</i>	Red
MAP2K7	<i>mitogen-activated protein kinase kinase 7</i>	Green
MAP4K1	<i>mitogen-activated protein kinase kinase kinase kinase 1</i>	Green
STAT3	<i>signal transducer and activator of transcription 3</i>	Red
NPC2	<i>Niemann-Pick disease, type C2</i>	Red
CD63	<i>CD63 molecule</i>	Red
SOD1	<i>superoxide dismutase 1, soluble</i>	Red
CAT	<i>catalase</i>	Red
GADD45B	<i>growth arrest and DNA-damage-inducible, beta</i>	Yellow
B2M	<i>beta-2-microglobulin</i>	Red
CKB	<i>creatine kinase, brain</i>	Red
CPE	<i>carboxypeptidase E</i>	Red
CEBPB	<i>CCAAT/enhancer binding protein, beta</i>	Red
SCAMP1	<i>secretory carrier membrane protein 1</i>	Red

Metabolismo de ácidos grasos
Testículo/espermatogénesis
Metabolismo de esteroides
Metabolismo de ácido retinoico
Biosíntesis de hormonas esteroideas
Transducción de señales
Endosomas
Estrés oxidativo
Apoptosis
Otros genes

Tabla 5. Análisis GEPAS de algunos genes del 32K *Mouse Genome Array*. El color rojo indica sobreexpresión, verde represión y amarillo sin cambios.

11. Estudio de la expresión génica de las enzimas implicadas en el metabolismo de los ácidos grasos en los testículos de los ratones HSL +/+ y HSL -/-

Tras analizar los resultados obtenidos en el *array*, nos planteamos corroborar las alteraciones halladas en la expresión de los genes de las enzimas implicadas en el metabolismo de los AG (FADS1, FADS2, SCD1 y SCD2) en los testículos de los ratones HSL -/- respecto de los controles. Para ello, utilizamos la técnica de PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR).

Como puede verse en la figura 40, la expresión de FADS2 (Δ^6 desaturasa) y FADS1 (Δ^5 desaturasa) está aumentada en los testículos de los ratones que carecen de la HSL respecto de los controles (HSL +/+). La FADS2 cataliza el paso inicial y limitante de la síntesis de AGP (Nakamura & Nara 2004).

La SCD o Δ^9 -desaturasa es una enzima clave y fuertemente regulada que está implicada en la síntesis de AGMs, cataliza la desaturación de Δ^9 -cis de muchos AGs (Paton & Ntambi 2009). En ratones han sido identificadas cuatro isoformas aunque en testículo solo se expresan, SCD1 y SCD2 (Saether et al. 2007). La expresión de SCD1 está aumentada en los testículos de los ratones HSL -/- respecto de los HSL +/+ (Figura 40). Mientras que SCD2 no presenta cambios significativos entre ambos grupos.

Analizamos la expresión de FAS, no encontramos diferencias significativas en los dos grupos experimentales (Figura 40).

Recientemente, se ha publicado que ELOVL2 es esencial para la formación en el testículo de los AGP n-6 (Zadravec *et al.* 2011). Nosotros hemos estudiado la expresión del ARNm de esta enzima en el testículo hallando, una reducción significativa de los niveles de esta elongasa en los testículos de los ratones carentes de HSL (Figura 40).

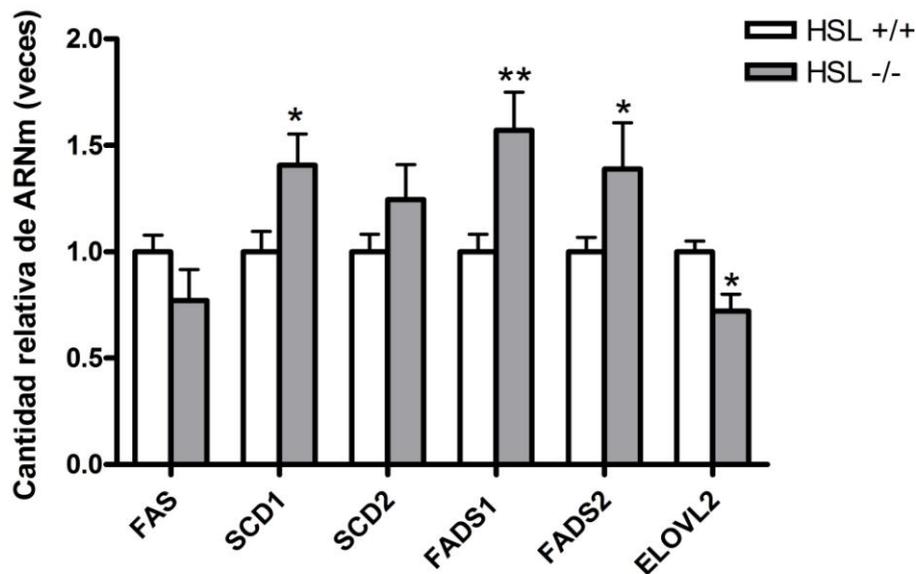


Figura 40. Efecto de la ausencia de HSL sobre los niveles de ARNm de enzimas del metabolismo de ácidos en los testículos de los ratones. Los ARNm fueron extraídos y cuantificados por qRT-PCR y normalizados frente a los niveles de CypB. Los datos fueron normalizados respecto al control. Los datos se representan como media \pm D.E, n=9-10, cada uno analizado por triplicado. El análisis estadístico vs. HSL +/+ (* $P < 0.05$, ** $P < 0.001$).

En conjunto corroboramos los datos de expresión en el *array* en cuanto a la FAS, FADS1, FADS2 y SCD1, mediante la técnica de qPCR. Confirmado que en los testículos de los ratones HSL -/- existe una alteración en las enzimas implicadas en el metabolismo de los AGs.

12. Estudio de la composición de ácidos grasos en el testículo ratones HSL +/+ y HSL -/-

Una vez conocido que la expresión de las enzimas implicadas en el metabolismo de AGs en el testículo del ratón carente de HSL estaban alteradas, nos planteamos estudiar si había cambios en la composición de AGs en este mismo grupo (HSL -/-) respecto a los controles mediante la técnica CG/EM.

En la tabla 4 se muestran los datos de la concentración y la composición total de AG en los testículos de los ratones HSL +/+ y HSL -/-. Nos centraremos en comentar los cambios en AGs coincidentes tanto en concentración como en composición de AGs (Tabla 6).

Los testículos de los ratones HSL -/-, presentan reducción importante en los AGs precursores esenciales de los AGP n-6 y n-3, LA (C18:2n-6) (-45%) y ALA (C18:3n-3) (-55%), respectivamente (Tabla 6). Cuando analizamos los AG intermediarios de la ruta de síntesis de los AGP, entre los n-6 encontramos un incremento significativo en la concentración del intermediario, C22:4n-4 (+41%) sin cambios ni en el ácido araquidónico (C20:4n-6) (el más abundante), ni en el DPA C22:5n-6, el producto final de la vía.

Igualmente, entre la serie n-3, vemos un aumento significativo del precursor C22:5n-3 sin cambios en el producto final el DHA (C22:6n-3) en los ratones HSL -/- comparados con los controles HSL +/+ (Tabla 6).

También observamos un descenso en el AGM, C16:1n-7 (-49%) en los testículos de los ratones HSL -/- y un incremento en la concentración del C20:3n-9 (*Mead acid*) (+78%) (Tabla 6).

En nuestro estudio no hallamos diferencias entre los grandes grupos de AG (AGS, AGM, AGP n-6 y AGP n-3) entre los testículos de los ratones HSL -/- respecto a los controles HSL +/+. Al analizar los AGP en el testículo de ratón observamos que los principales son los de la serie n-6, siendo estos valores en porcentaje de 27.1 ± 0.5 en los HSL +/+ y de 27.7 ± 1.3 en los HSL -/-.

	HSL +/+	HSL -/-	HSL +/+	HSL -/-
	concentración AG (ng/mg prot)		Composición AG (%)	
AGS	45240 ±3446	38456±2539	35.47±1.82	37.70±1.52
C14:0	1239±154	1111±219	0.95±0.06	1.01±0.20
C16:0	32202±2445	25392±2000 *	25.17±1.10	25.04±1.73
C18:0	11478±1288	13569±1444	9.06±0.92	11.32±0.64*
C20:0	121±11	137±14	0.09±0.01	0.12±0.01
C22:0	131±6	133±4	0.11±0.01	0.13±0.01
C24:0	70±4	74±1	0.06±0.01	0.07±0.01
AGM	43862±5319	33672±3115	29.79±2.53	29.29±1.04
C14:1	111±22	82±12	0.08±0.01	0.07±0.02
C16:1n-7	6687±1727	2597±459 *	4.73±1.06	2.43±0.52*
C18:1n-7	4656±486	4767±434	3.57±0.10	4.28±0.21
C18:1n-9	28196±4397	25048±2619	21.03±1.78	21.61±0.83
C20:1n-9	623±84	730±59	0.48±0.02	0.68±0.08*
C22:1n-9	288±17	300±25	0.24±0.04	0.28±0.04
C24:1n-9	239±9.7	246±6	0.19±0.02	0.25±0.03
n-9 PUFA				
C20:3n-9	122±12	187±30 *	0.09±0.00	0.16±0.02*
n-6 PUFA	35073±3096	33858±3124	27.13±0.47	27.71±1.30
C18:2n-6 LA	9317±2212	5058±746 *	7.43±1.92	4.06±0.61*
C18:3n-6	69±12	48±4	0.05±0.01	0.05±0.01
C20:2n-6	149±17	142±7	0.12±0.01	0.13±0.01
C20:3n-6	1520±167	1469±203	1.19±0.10	1.29±0.09
C20:4n-6	14850±1796	15932±2273	12.47±1.01	13.91±0.90
C22:2	107±4	135±17	0.09±0.01	0.16±0.04*
C22:4n-6	1593±82	2076±199 *	1.28±0.12	1.80±0.23*
C22:5n-6 DPA	6609±438	6851±577	5.27±0.47	5.64±0.38
n-3 PUFA	9510±625	8717±613	7.61±0.71	7.97±0.53
C18:3n-3 ALA	298±93	118±35 *	0.22±0.07	0.10±0.04*
C20:5n-3	174±15	167±15	0.14±0.01	0.16±0.03
C22:5n-3	347±8	466±53 *	0.28±0.03	0.46±0.11*
C22:6n-3 DHA	8651±699	7867±635	6.94±0.75	7.13±0.46
AG Totales	129783±11972	119563±9337		

Tabla 6. Concentración total de ácidos grasos (ng/mg de proteína) y composición (%) en testículo de ratones HSL +/+ y HSL -/-. Los datos que se muestran son la media ± EEM, n=7. Las comparaciones estadísticas se han realizado respecto a los controles (* $P < 0.05$, ** $P < 0.001$).

Como puede observarse en la tabla 7 no hallamos tampoco diferencias en los diferentes cocientes analizados entre las sumas de los AGS, AGM, PUFA n-6 y PUFA n-3 en el testículo de los ratones HSL +/+ y los que carecen de HSL.

	HSL +/+	HSL -/-
AGMs/AGSs	1.26 ± 0.16	1.24 ± 0.09
PUFAs/AGSs	0.99 ± 0.04	0.94 ± 0.04
AGMs/PUFAs	0.87 ± 0.09	0.88 ± 0.04
n-6/n-3	3.73 ± 0.38	3.53 ± 0.09

Tabla 7. Ratios entre los sumatorios de los grades grupos de ácidos grasos en el testículo de ratones HSL +/+ vs. HSL -/-. Los datos que se muestran son media ± D.E., n=7.

13. Estudio de la composición de ácidos grasos en el plasma ratones HSL +/+ y HSL -/-

Tras haber visto que la expresión de los genes de las enzimas implicadas en el metabolismo de los AG y que la composición de los estos estaban afectadas en el testículo de los ratones HSL -/-, quisimos analizar si estos cambios en la composición de los AG eran observables en el plasma de los ratones.

No hallamos diferencias significativas ni en la composición ni en la concentración de los distintos tipos de AGs en el plasma de estos ratones HSL -/- respecto a HSL +/+ (Tabla 8).

	HSL +/+	HSL -/-	HSL +/+	HSL -/-
	concentración AG (mg/L)		Composición AG (%)	
AGS	823.6±35.9	847.9±31.8	29.22±0.07	29.93±0.39
C14:0	8.5±0.9	8.9±0.7	0.30±0.03	0.30±0.02
C16:0	602.5±30.3	638.6±25.9	21.36±0.39	22.28±0.34
C18:0	195.8±12.3	181.8±6.0	6.96±0.36	6.47±0.22
C20:0	4.6±0.4	5.5±0.4	0.17±0.02	0.19±0.01
C22:0	8.9±0.7	9.2±0.7	0.32±0.02	0.33±0.03
C24:0	3.3±0.3	3.9±0.4	0.12±0.01	0.14±0.02
AGM	607.6±47.0	652.1±24.9	21.43±0.95	22.95±1.22
C14:1	0.5±0.1	0.4±0.1	0.02±0.00	0.01±0.00
C16:1n-7	123.3±12.8	105.2±5.4	4.35±0.31	3.74±0.18
C18:1n-7	77.4±6.9	69.0±4.3	2.73±0.18	2.38±0.25
C18:1n-9	390.6±29.1	444.9±16.6	13.78±0.60	15.82±1.04
C20:1n-9	7.5±0.7	10.4±1.0	0.27±0.01	0.33±0.02
C22:1n-9	0.6±0.3	1.5±0.2	0.02±0.01	0.05±0.01
C24:1n-9	13.5±1.1	12.6±0.6	0.48±0.04	0.45±0.03
n-9 PUFA				
C20:3n-9	8.7±2.0	8.5±1.9	0.31±0.07	0.29±0.11
n-6 PUFA	1092.9±43.9	1076.3±58.6	38.86±0.87	37.77±1.16
C18:2n-6 LA	625.0±25.8	668.4±44.2	22.26±0.47	23.57±1.31
C18:3n-6	6.2±0.4	7.9±0.8	0.22±0.01	0.28±0.03
C20:2n-6	3.3±0.2	3.0±0.1	0.12±0.01	0.11±0.01
C20:3n-6	63.7±8.6	54.0±3.0	2.25±0.28	1.89±0.18
C20:4n-6	390.0±26.2	338.0±18.7	13.41±0.66	12.03±0.49
C22:2	0.0±0.0	0.1±0.1	0.00±0.00	0.00±0.00
C22:4n-6	2.2±0.1	2.2±0.2	0.08±0.00	0.08±0.01
C22:5n-6DPA	2.5±0.2	2.6±0.2	0.09±0.01	0.09±0.01
n-3 PUFA	286.0±10.3	262.7±15.7	9.62±0.30	9.25±0.36
C18:3n-3 ALA	4.6±0.7	6.2±1.1	0.17±0.02	0.18±0.03
C20:5n-3	32.3±2.1	31.5±2.6	1.06±0.05	1.01±0.06
C22:5n-3	9.9±0.8	9.7±0.9	0.34±0.02	0.33±0.02
C22:6n-3 DHA	239.2±7.8	215.3±11.9	8.07±0.25	7.71±0.33
AG Totales	2818.7±121.2	2847.5±118.0		

Tabla 8. Concentración (mg/L) y composición (%) de AG totales en el plasma de los ratones HSL +/+ vs. HSL -/-. Los datos mostrados son la media ± EEM, n=7.

14. Estudio de la composición de plasmalógenos en el testículo de ratones HSL +/+ y HSL -/-

Como ya apuntamos en el apartado 4.4. de la introducción, los plasmalógenos son un grupo de fosfolípidos que se encuentran en mayor proporción en algunos tejidos como el cerebro, los riñones, los testículos y el corazón (Lessig & Fuchs 2009). Éstos lípidos implicados en procesos biológicos, en los cuales puede verse afectada la fiabilidad de la membrana, median en la transducción de señales, protegen frente al estrés oxidativo y actúan en el transporte de colesterol (Lessig & Fuchs 2009).

En la tabla 9, se observa la concentración de *fatty aldehyde dimethyl acetals* (DMA derivados representativos de los plasmalógenos), en el testículo de los ratones HSL +/+ y HSL -/-. En los ratones que carecen de HSL, la concentración del C16:0 DMA se ve incrementada, mientras que los niveles del C18:0 DMA no cambian, pero sí observamos una tendencia a mayores niveles en los testículos de los ratones carentes de HSL respecto a los controles. Al analizar los cocientes entre C16:0 DMA/C16:0 y C18:0 DMA/C18:0 no vemos cambios significativos, aunque sí una tendencia a un mayor valor de estos cocientes en los testículos de los ratones HSL -/- frente a HSL +/+ (Tabla 9).

	HSL +/+	HSL -/-
C16:0 DMA	55.3±7.0	98.0±22.3 *
C18:0 DMA	1168.4±162.3	1376.0±224.4
C16:0 DMA/C16:0	5.3±0.7	8.3±1.6
C18:0 DMA/C18:0	0.6±0.1	0.9±0.2

Tabla 9. Concentración de los plasmalógenos (ng/mg proteína) en testículo de ratones HSL +/+ vs. HSL -/- . Los valores que se muestran son la media±EEM, n=7. Las comparaciones con respecto al HSL +/+ (*p<0.05).

Discusión

Discusión

La HSL es una enzima clave en la lipólisis, en la esteroidogénesis y en la regulación de la principal fuente de energía, los lípidos (Lampidonis et al. 2011). Esta enzima se encarga de hidrolizar triacilgliceroles, diacilgliceroles, monoacilgliceroles, ésteres de colesterol y de retinol (Bickel et al. 1997); y se expresa en diversos tejidos en los que varía su función y el sustrato sobre el que actúa (Yeaman 1990). Han sido descritas numerosas variantes moleculares de la HSL (Yeaman 2004). Así, por ejemplo, esta enzima se expresa, sobre todo, en el tejido adiposo (Holm et al. 1988, Kraemer et al. 1993, Kraemer & Shen 2002) donde posee actividad triacilglicerol lipasa y por tanto, parece ser una enzima limitante en la hidrólisis de los triacilglicéridos y diacilglicéridos (Kraemer & Shen 2006). De las dos lipasas mayoritarias de los adipocitos, la HSL y ATGL, se ha visto que sólo la HSL posee actividad hidrolasa frente a ésteres de retinol (Wei et al. 1997, Zimmermann et al. 2004). Además, esta enzima, se expresa en las glándulas adrenales, los ovarios y los testículos (Yeaman 1990, Kraemer et al. 1991, Hui 1996), lo que indica su participación en la esteroidogénesis (Osuga et al. 2000). Y en el testículo juega un papel en la espermatogénesis (Osuga et al. 2000). Esta enzima se expresa, en menor medida, en músculo esquelético y cardíaco, en macrófagos (Holm et al. 1988, Kraemer et al. 1993), en placenta y en células β pancreáticas (Chung et al. 2001). Ha sido descrita su presencia en los adipocitos y las células epiteliales de la glándula mamaria y, por primera vez, en la leche de la rata (Martin-Hidalgo et al. 2005) y en hígado de ratón (Sekiya et al. 2008). En los hepatocitos, la deficiencia de HSL se asocia con una reducción de la actividad colesterol ester hidrolasa pero no de la triglicérido lipasa, lo cual induce la acumulación de ésteres de colesterol en el hígado (Sekiya et al. 2008). Esta enzima está bajo control neuronal y hormonal (Okazaki et al. 2006).

Existen varios laboratorios que han conseguido con éxito la obtención de ratones *KO* para la HSL (HSL $-/-$) (Osuga et al. 2000, Chung et al. 2001, Haemmerle et al. 2002). Los resultados fenotípicos de estos ratones fueron algo sorprendentes, ya que al contrario de lo que se esperaba, estos ratones no eran obesos (Osuga et al. 2000, Chung et al. 2001, Haemmerle et al. 2002), es más tenían un descenso en el índice de masa abdominal comparado con los ratones controles (Chung et al. 2001) y además, eran resistentes a la dieta alta en grasas, aunque tras esta dieta el contenido en triglicéridos en hígado era menor en los ratones HSL $-/-$ (Haemmerle et al. 2002). Por otro lado, estos ratones HSL $-/-$ eran igual de sensibles al frío que los ratones controles o *WT* (Osuga et al. 2000, Chung et al. 2001). Otro resultado inesperado en los ratones macho es que eran estériles a causa de la oligospermia que presentaban (Osuga et al. 2000, Haemmerle et al. 2002). Todos estos

resultados indican un papel crítico de la HSL en la espermatogénesis (Osuga et al. 2000, Chung et al. 2001, Haemmerle et al. 2002).

Histológicamente vieron que tanto en tejido adiposo blanco como marrón, los ratones que carecían de la HSL presentaban una mayor heterogeneidad en cuanto al tamaño de las células adiposas, con un marcado alargamiento de los adipocitos en contraposición a la morfología normal de las células. Además, en los adipocitos aislados de los ratones HSL^{-/-}, la lipólisis no aumentaba significativamente bajo estimulación β 3-adrenérgica, no obstante bajo condiciones basales la tasa de actividad lipolítica era al menos igual de alta que la de las células controles (Chung et al. 2001). Estos ratones acumulaban diacilglicéridos en el tejido adiposo blanco y marrón, en el tejido musculoesquelético y cardíaco y en el testículo (Haemmerle et al. 2002). Observaron además alteraciones en la composición y liberación de los AGs del tejido adiposo blanco en estos ratones que carecían de la HSL (Haemmerle et al. 2002).

En el presente trabajo nos planteamos estudiar el papel de la HSL en la fisiología del testículo y su repercusión en la esteroidogénesis y la espermatogénesis centrándonos en el estudio del análisis lipídico y los receptores *scavenger* clase B.

Como ya hemos comentado, estos ratones, al contrario de lo que se esperaba, no son obesos (Osuga et al. 2000). Nosotros hemos analizado su peso corporal encontrado un menor peso corporal de los ratones HSL^{-/-} respecto a los controles, este resultado va en contraposición con lo hallado por otros autores que no observaron cambios (Osuga et al. 2000, Chung et al. 2001, Haemmerle et al. 2002), aunque sí vieron un descenso en el índice de masa corporal (Chung et al. 2001).

Haemmerle y cols. llevaron a cabo un estudio del perfil lipídico plasmático en ratones que carecían de la HSL y vieron que, independientemente de la dieta, los niveles plasmáticos de colesterol estaban incrementados entre un 30 y un 40% en los ratones HSL^{-/-}; lo cual atribuyen a un aumento de los niveles de colesterol HDL (Haemmerle et al. 2002). En este estudio pusieron de manifiesto que un descenso de la concentración plasmática de los AGs no esterificados (NEFA) provoca una alteración del perfil lipoproteico del plasma, con un descenso de los niveles de triglicéridos y un aumento de la concentración de colesterol HDL (Haemmerle et al. 2002). En el presente estudio al analizar los niveles plasmáticos de triglicéridos y colesterol, observamos sólo un aumento de este último en los ratones HSL^{-/-} respecto de los controles.

Kabajj y cols. estudiaron las diferencias de expresión de la HSL durante el crecimiento y el ciclo reproductivo del visón y vieron un aumento de los niveles de FSH en plasma concomitante al aumento de la actividad de la HSL en los túbulos seminíferos, lo que sugiere una posible relación entre estos parámetros (Kabbaj et al. 2003). Además

estos autores observaron que en el tejido intersticial, la actividad elevada de la HSL coincidía con periodos de niveles bajos de prolactina y niveles elevados de testosterona en plasma (Kabbaj et al. 2003). En otro estudio en cerdo de guinea encontraron que los niveles de HSL y su actividad enzimática en el tejido intersticial y en los túbulos seminíferos se correlacionaban positivamente con los niveles de testosterona en el suero durante el desarrollo (Kabbaj et al. 2001). En el modelo de ratones HSL $-/-$ desarrollado por Osuga y cols. no se observan cambios en los niveles plasmáticos de hormonas tales como testosterona, FSH o LH, lo que indica que la oligospermia que poseen estos ratones no es el resultado de una insuficiencia hormonal (Osuga et al. 2000). En el presente trabajo medimos los niveles de testosterona plasmática y al igual que Osuga y cols. (Osuga et al. 2000), no encontramos diferencias significativas entre los dos grupos estudiados. Aunque sí observamos un aumento en la expresión de varias de las enzimas implicadas en su síntesis, como hemos podido comprobar por los estudios de genes mediante *microarray*, lo cual podría poner de manifiesto que aunque no hay una alteración en los niveles plasmáticos de testosterona, si podría haber una alteración e nivel testicular.

La HSL contribuye a la liberación de los AGs libres en el tejido adiposo (Kraemer & Shen 2002). Los ratones HSL $-/-$ además de no ser obesos, se ha visto que presentan un descenso en los niveles de NEFAs en el plasma, que proviene de una alteración de la lipólisis en el adipocito (Fernandez *et al.* 2008). Haemmerle y cols. observaron que el descenso en los niveles plasmáticos de NEFAs iba acompañado de un descenso de la síntesis de VLDL en el hígado, la cual es la principal causa del descenso de los niveles de triglicéridos en el plasma que se observó en estos ratones (Haemmerle et al. 2002). En nuestro estudio hemos analizado la composición de AGs totales en el plasma de los ratones HSL $-/-$ vs HSL $+/+$ y no hemos hallado diferencias significativas.

Papel de la HSL en la fisiología testicular

La importancia de la HSL en el testículo ha sido demostrada gracias al estudio de los ratones macho HSL *KO* (HSL *-/-*). Estos estudios han puesto de manifiesto que estos animales presentan niveles elevados de ésteres de colesterol (Osuga et al. 2000) y diacilgliceridos (Haemmerle et al. 2002), son estériles, tienen oligospermia (Osuga et al. 2000) y poseen alteraciones en la morfología de los testículos y una reducción del tamaño de los mismos (Chung et al. 2001).

Haemmerle y cols. estudiaron mediante una tinción para lípidos neutros, los testículos de ratones HSL *-/-* y en ellos han visto que hay una extensa vacuolización que parecen ser acúmulos de lípidos (Haemmerle *et al.* 2003). El motivo de la infertilidad masculina hallada en estos ratones HSL *-/-* podría estar relacionado con que la ausencia de actividad colesterol ester hidrolasa, cause una reducción en la disponibilidad de colesterol libre el cual está implicado en la proliferación celular (Brown & Goldstein 1974, Chen et al. 1974) y por tanto en la espermatogénesis, o bien, cause una reducción de AG muy importantes para la fisiología testicular (Ayala & Brenner 1980, Coniglio 1994, Retterstol *et al.* 2000).

En el presente estudio, al analizar el colesterol libre, mediante la tinción con filipina, vimos un incremento de la tinción en las células de Leydig de los ratones carentes de HSL y una menor tinción en la luz del túbulo seminífero puesto que en estos ratones la espermatogénesis no llega a término. Mediante la tinción con Oil Red valoramos los lípidos neutros acumulados en los testículos de los ratones HSL *-/-*, viendo un aumento de tinción como en el caso anterior en las células de Leydig.

En nuestro estudio histológico del testículo hemos hallado cambios en la morfología del testículo de los ratones HSL *-/-* que se corresponden con los hallados por otros autores (Osuga et al. 2000, Chung et al. 2001). Los testículos de los ratones HSL *-/-* son atróficos (ver figura 23 de Resultados) y presentan una disminución de los diámetros de los túbulos seminíferos junto con una desorganización de las capas del epitelio seminífero. También observamos una vacuolización excesiva en las células epiteliales como han descrito anteriormente otros autores (Holm et al. 1988, Osuga et al. 2000, Haemmerle et al. 2002). Además, pudimos ver que en los testículos de los ratones HSL *+/+* la lámina propia se compone de una capa plana continua de células miodes alargadas separadas por una fina lámina basal de los dos túbulos seminíferos y del endotelio capilar linfático mientras que, en los testículos de los ratones HSL *-/-* la lámina propia aumenta el espesor y la proliferación de las células miodes se correlaciona con el mayor espesor de la membrana basal. Todos estos datos confirman que los ratones HSL *-/-* presentan una gran atrofia testicular que justificaría su infertilidad.

La adquisición de motilidad del espermatozoide y la fertilidad han sido asociadas con los cambios del contenido de colesterol de los gametos masculinos durante el tránsito por el epidídimo (Haidl & Opper 1997) y durante la capacitación (Go & Wolf 1983), y se ha visto que unos niveles insuficientes de colesterol causan infertilidad en el humano (Sugkraroek et al. 1991). Cuando analizamos en nuestros ratones la motilidad y la concentración de espermatozoides pudimos comprobar que los resultados concuerdan con la infertilidad y oligospermia características de estos ratones carentes de HSL, puesto que tenemos unos espermatozoides escasos en número y casi sin motilidad en los ratones que carecían de la HSL.

En el testículo una de las principales vías de obtención de colesterol es la de la captación selectiva de los ésteres de colesterol de las HDL mediada por los receptores SR-Bs. Las HDL son la principal fuente de colesterol en las células de Sertoli (Fofana et al. 1996). SR-BI se une a una gran variedad de ligandos entre los que se incluyen lipoproteínas nativas y modificadas, y otros ya comentados en profundidad en la Introducción (Ohgami 2001, Rigotti et al. 2003, Rhainds et al. 2004). El receptor SR-BI media el flujo bidireccional de colesterol no esterificado y fosfolípidos entre las HDL y las células (Saddar et al. 2010). En el caso del receptor SR-BII, que es una isoforma del gen de SR-BI formada por un ajuste alternativo del transcrito, este receptor también une HDL con alta afinidad, pero no moviliza los depósitos intracelulares de ésteres de colesterol (Webb et al. 1997). Mediante el estudio de los ratones KO para SR-BI, se ha esclarecido que SR-BI desempeña un papel múltiple en el metabolismo del colesterol y de los esteroides (Babitt et al. 1997), y es crítico en el metabolismo de las HDL (Acton et al. 1996, Rigotti et al. 2003, Rhainds et al. 2004). Además estos ratones sufren insuficiencia adrenal de glucocorticoides, lo que sugiere que la funcionalidad de SR-BI es necesaria para una correcta esteroidogénesis adrenal en los ratones (van der Velde 2010).

En nuestro laboratorio hemos estudiado la expresión y la distribución de los receptores *scavenger* CLA-1/SR-BI y CD36 en testículo humano normal y con desórdenes tumorales (Arenas et al. 2004). En testículos normales de personas jóvenes, el receptor CLA-1/SR-BI se expresaba en la vesícula acrosómica de las espermátidas y en la superficie de las células de Sertoli y de Leydig; mientras que en los testículos que presentaban criptorquidia tenían una tinción muy débil de estos receptores en las células de Sertoli (en el núcleo y el citoplasma) y en las de Leydig (en el citoplasma) (Arenas et al. 2004). Otros estudios llevados a cabo en testículo de visón se ha visto que la predominancia de las isoformas de SR-BI está asociada con un aumento de los niveles de colesterol esterificado (Akpovi et al. 2006). El SR-BI se localiza en las células germinales y de Sertoli de forma específica según la etapa del ciclo reproductivo. En cuanto a SR-BII vieron que tenía una

localización intracelular en las proximidades del núcleo de las células germinales y de Sertoli, pero no observaron cambios en la distribución de este receptor a lo largo del ciclo reproductivo (Akpovi et al. 2006).

Nosotros hemos realizado un estudio inmunohistológico de SR-BI, SR-BII y LIMPII en el testículo de los ratones HSL +/+ y HSL -/- y vimos que, en los testículos de los ratones control, el SR-BI se localiza en la membrana de las células de Leydig al igual que se observó en estudios previos realizados en rata (Reaven *et al.* 2000, Eckhardt *et al.* 2006) y en humanos (Arenas et al. 2004); sin embargo no hemos detectado su presencia en las células de Sertoli como estaba descrito en las otras especies (Arenas et al. 2004, Akpovi et al. 2006). Hemos detectado su localización en las espermátidas alargadas, coincidiendo con los datos descritos anteriormente (Arenas et al. 2004, Akpovi et al. 2006). Además observamos que en los testículos de los ratones HSL -/- se aprecia una mayor expresión de SR-BI en dichas células; dato que comprobamos mediante *western-blot*. En cuanto al análisis de la localización celular del receptor SR-BII en los testículos de los ratones controles hemos detectado que se localiza en la membrana de las células germinales, resultado que coincide con lo descrito anteriormente (Akpovi et al. 2006); observándose también una mayor expresión de éste receptor en los testículos de los ratones que carecen de HSL. Por último, al estudiar la localización de LIMPII hallamos que los testículos de los ratones que poseían la HSL, el receptor se localizaba en la membrana de las células de Sertoli y de Leydig, y en el caso de los testículos de los ratones HSL -/- había un aumento de la tinción para LIMPII en ambos tipos celulares (Sertoli y Leydig). Las diferencias en cuanto a la localización de los receptores SR-Bs en algunos tipos celulares testiculares podría deberse a diferencias intraespecies o a la baja expresión de los SR-Bs en ese tipo celular en nuestro modelo, no pudiendo ser detectados por técnicas inmunohistiquímicas. Por lo tanto, la carencia de HSL provoca un aumento en la expresión de los receptores SR-Bs, probablemente para aumentar la captación de colesterol-HDL debido a la alteración de la homeostasis del colesterol descrito en estos animales (Kabbaj et al. 2001).

Está descrito que la unión de HDL a SR-BI activa la cascada de señalización de la familia de las quinasas SRC, PI3K/AKT y MAPK en células endoteliales (Mineo et al. 2003). Estudios realizados en células de ovario de hámster pusieron de manifiesto que la actividad selectiva de SR-BI está regulada por las vías de señalización de PKC y por PI3K. La activación de PKC por un lado, y la inhibición de PI3K por el otro, aumentan la eficiencia de la mediación de SR-BI en la captación selectiva de lípidos, mientras que, la inhibición de PKC y la activación de PI3K disminuye dicha eficiencia (Zhang et al. 2007). Zhang y cols. demostraron que la activación de PKC y la inactivación de PI3K van asociadas con un aumento del cociente de captación de lípidos/captación de proteínas de los componentes

lipoproteicos, lo que derivaría en un aumento de la actividad de SR-BI y por tanto, de la captación selectiva de lípidos. Estos datos apoyan la idea de que la endocitosis pueda ser un punto en el que se regula la actividad de los SR-BIs y que PKC y PI3K jueguen un papel importante en esta regulación (Zhang et al. 2007). En nuestro trabajo comprobamos que los testículos de los ratones HSL -/- tienen inducida la fosforilación (activación) de las tres vías de señalización estudiadas, p-ERK, p-AKT y p-SRC, respecto a los ratones control; no hemos encontrado cambios en las formas totales de dichas proteínas. La activación de estas rutas de señalización podría estar relacionada con el aumento de la expresión de los receptores SR-Bs en los ratones HSL -/- obtenido en el presente estudio; y por tanto con el aumento de la captación de HDL.

Papel de la HSL en la composición en esteroides y ácidos grasos del testículo

En la biosíntesis de colesterol la enzima limitante de la ruta es la HMGCoA reductasa, esta enzima está a su vez regulada por otros esteroides y por diversos estímulos (Ikonen 2006). En la ruta de biosíntesis de colesterol se forman además precursores del mismo que poseen funciones biológicas específicas, características de ellos mismos. Centrándonos en los esteroides intermediarios, el lanosterol y el dihidrolanosterol que se encargan de la ubiquitinación de la HMGCoA reductasa, consiguiendo una disminución de la actividad de dicha enzima (Song et al. 2005); el desmosterol y el 4,4-dimetilesterol (FF-MAS y T-MAS) que son ligandos de LXR (Janowski et al. 1996), LXR a su vez regula la transcripción de muchos genes relacionados con el metabolismo de lípidos (Yamauchi et al. 2007); y el 7DHC, que es un precursor de la vitamina D (Herman 2003). Además los esteroides intermediarios FF-MAS y T-MAS se conoce que estimulan la meiosis en las gónadas (Marin Bivens et al. 2004).

La esteroidogénesis y la gametogénesis son procesos que están íntimamente relacionados con el metabolismo del colesterol. En el testículo, el colesterol participa en la síntesis de testosterona e interviene en la fertilidad de los gametos ya sea formando parte de las membranas celulares de los mismos, o por los cambios de niveles que se experimentan en los gametos masculinos (Sugkraroek et al. 1991, Haidl & Opper 1997, Kabbaj et al. 2003). Por otro lado, se sabe que la composición lipídica del testículo es de gran importancia para su histología y su fisiología (Ayala & Brenner 1980, Coniglio 1994, Retterstol et al. 2000).

En los lisados de testículo de ratón hemos identificado los siguientes esteroides: lanosterol, colest-8,14-dienol, FF-MAS, T-MAS, lanosterol, desmosterol y colesterol. En términos generales observamos que hay una mayor cantidad de desmosterol que de T-MAS en los testículos de los dos grupos de ratones estudiados, esto coincide con

resultados previos que describen la presencia de elevadas concentraciones de desmosterol en el testículo, el epididímo y los espermatozoides de varias especies (Lindenthal et al. 2001). Connor y cols. observaron en testículo de mono que la concentración de desmosterol aumentaba un 40% durante la pubertad (Connor et al. 1997). Por otro lado, Lindenthal y cols. en el testículo del cerdo de guinea vieron que había una concentración de 2 a 5 veces mayor de latosterol, desmosterol, lanosterol y dihidrolanosterol que la que tenía el hígado (Lindenthal et al. 2002). Además, observaron que T-MAS era uno de los esteroides intermediarios mayoritarios en el testículo; mientras que el FF-MAS sólo representaba un 6% de la concentración de T-MAS (Lindenthal et al. 2002). Nosotros en los testículos de los ratones de nuestra colonia HSL hemos visto que aparte del colesterol, el desmosterol es el esteroide intermediario mayoritario seguido de latosterol y T-MAS. Además de los 4,4-dimetilesteroides el mayoritario es el T-MAS en los testículos de los ratones de nuestra colonia.

En cuanto a las diferencias entre la composición en esteroides de los testículos de los ratones HSL -/- y los controles (WT) hemos visto un aumento en la concentración de FF-MAS en los ratones HSL -/-. El FF-MAS es ligando de LXR, receptor importante en la regulación entre la respuesta inflamatoria y el metabolismo del colesterol (Janowski et al. 1996, El-Hajjaji et al. 2011). Las dificultades en el mantenimiento de la colonia de ratones carentes de LXR hicieron plantearse la hipótesis de que LXR pueda tener un papel fisiológico en los tejidos reproductivos y esteroideogénicos (Seo et al. 2004, Cummins et al. 2006). Concretamente, LXR α es un regulador muy importante de la homeostasis adrenal gracias a su capacidad para modular la transcripción de genes que gobiernan las tres rutas principales del colesterol en las glándulas adrenales: el eflujo, el almacenamiento y la conversión a hormonas esteroideas (Cummins et al. 2006). Hay estudios *in vivo* que muestran que los ratones deficientes en LXR α y LXR β tienen reducida la fertilidad y se caracterizan por una concepción menos frecuente y un menor número de crías por camada (Mascrez et al. 2004, Volle et al. 2007). Nuestro resultado en cuanto al aumento de FF-MAS en los testículos de los ratones HSL -/- podría ser un mecanismo para intentar activar LXR que es determinante en la fertilidad.

El colestano-8,14-dienol es un metabolito del MAS-412, que no había sido identificado en testículo hasta el momento. Nosotros hemos identificado su presencia en el testículo de los ratones tanto controles como HSL -/-, sin apreciarse diferencias entre ambos. Como ya hemos comentado, Osuga y cols. describieron un aumento del colesterol esterificado en el testículo de los ratones que carecían de la HSL (Osuga et al. 2000); esto explicaría nuestros resultados en cuanto al aumento del colesterol total. Por lo tanto, vemos una alteración en la composición en esteroides de los ratones carentes de HSL, con un aumento del colesterol

total y del esteroil intermediario FF-MAS, que podría estar alterando la fisiología del testículo.

El testículo es un órgano extraordinario en cuanto al metabolismo de los AGs y tiene un alto contenido en AGP de 20 a 22 carbonos que se acumulan en el esperma (Burr 1973). La deficiencia en AGs esenciales (Engster *et al.* 1978, Marzouki & Coniglio 1982, Saether *et al.* 2007) o las alteraciones en el metabolismo de los AGs en pacientes diabéticos (Peluffo *et al.* 1970) se asocia a malformaciones en el testículo.

Como ya hemos comentado, la HSL es una enzima esencial para la espermatogénesis puesto que su ausencia en el testículo tiene como consecuencia una fuerte oligospermia e infertilidad (Osuga *et al.* 2000, Chung *et al.* 2001) y que esta infertilidad no tiene su origen en una alteración hormonal (Osuga *et al.* 2000). Cabe destacar que los ratones *KO* para la enzimas FADS2 y ELOVL2 presentan un fenotipo con ausencia de espermatogénesis similar al de los ratones HSL *-/-* (Stroud *et al.* 2009, Zadavec *et al.* 2011). Ya sabemos que los ratones HSL *-/-* acumulan ésteres de colesterol (Osuga *et al.* 2000) y diacilgliceroles (Chung *et al.* 2001) en el testículo, y que la HSL es la encargada de catalizar la hidrólisis de estos lípidos. Estas observaciones sugieren que los cambios en el metabolismo de los AGs podrían estar participando en las alteraciones de la funcionalidad del testículo por la pérdida de la HSL.

En nuestro estudio hemos visto que la deficiencia de la HSL en los ratones provoca una alteración en la composición de los AGs en el testículo, no así en la composición de los mismos en plasma. Los cambios más importantes han sido un descenso en la concentración de los AGs esenciales n-6 y n-3, AGP AL (C18:2n-6) y ALA (C18:3n-3) respectivamente, así como un aumento del ácido docosatrienoico (C22:4n-6) y el ácido docosapentaenoico (C22:5n-3), sin observar cambios en los productos finales de las series, el ácido DPA (C22:5n-6) y el ácido DHA (C22:6n-3) respectivamente. Además observamos un aumento de la concentración del *Mead acid* (C20:3n-9) en los testículos de los ratones HSL *-/-* respecto de los controles.

Para profundizar en el estudio del metabolismo de los AGs en el testículo analizamos la expresión de ARNm de enzimas relevantes en el mismo. Hallamos un aumento significativo de la expresión de SCD1, FADS1 y FADS2, y un descenso significativo de la ELOVL2, en el testículo de los ratones que carecían de la HSL en comparación con los HSL *+/+*. No encontramos diferencias significativas entre ambos grupos en la expresión de FAS ni de SCD2. Para evaluar la importancia de los cambios en la expresión de SCD1 calculamos el cociente C16:1n-7/C16:0, que es utilizado como un índice de actividad de la Δ^9 desaturasa (SCD) y vimos que este índice estaba disminuido en el testículo de los

ratones HSL -/- respecto de los controles (HSL -/- = 0.09 ± 0.01 , HSL +/- = 0.20 ± 0.05 $p < 0.05$); este resultado contrasta con el aumento de expresión de SCD1 obtenido. Hay autores que han encontrado también un descenso en la desaturación del palmitato, a pesar de obtener un aumento en la expresión tanto de SCD1 como de SCD2, causado por la deficiencia de la HSL (Fernandez et al. 2008, Fernandez *et al.* 2011). Cao y cols. demostraron que el ácido palmitoleico (C16:1n-7) es el principal lípido que controla la expresión de SCD1 en hígado (Cao et al. 2008). Además, el aumento de la expresión de SCD1 podría ser debido a un descenso de la concentración de palmitoleato detectado en los testículos de los ratones HSL -/-. Otros autores han hallado cambios similares en la expresión de SCD1 (aumento) y la concentración de palmitoleato (descenso) en ratones que carecen de la HSL (Fernandez et al. 2008).

En el hígado una deficiencia en AGs esenciales induce la expresión de genes y/o la actividad de las enzimas SCD1 (Ntambi 1999), Δ^5 desaturasa (FADS1) (Cho *et al.* 1999, Igarashi *et al.* 2007), Δ^6 desaturasa (FADS2) (Cho et al. 1999, Igarashi et al. 2007) y ELOVL2 (Cho et al. 1999, Igarashi et al. 2007). Sin embargo, en testículo de rata no se ha visto que ninguna de las desaturasas (SCD1, SCD2, FADS1 y FADS2) se induzcan cuando hay un descenso en la concentración de AG esenciales (Saether et al. 2007). De hecho, en nuestro estudio no hemos encontrado una disminución de los AGPs de la serie n-6 y n-3 en el testículo de los ratones HSL -/- respecto de los controles, por otro lado, los cambios obtenidos en la expresión de las enzimas FADS1/FADS2 y ELOVL2 siguen direcciones opuestas.

Las enzimas FADS1 y FADS2 catalizan la incorporación de un doble enlace en $\Delta 5$ y el $\Delta 6$, respectivamente, y están implicadas en las transformaciones de todos los AG insaturados (Guillou *et al.* 2010). El aumento de la expresión de estas desaturasas podría estar favoreciendo la producción de AG insaturados de cualquiera de las series. La ELOVL2 se expresa en gran cantidad en el testículo (Stocco et al. 2005) y participa en la producción de los AGCL junto con las enzimas ELOV5 y ELOVL4 (Guillou et al. 2010, Zadravec et al. 2011). Concretamente, la elongación del ácido docosatetranoico (C22:4n-6) y del ácido docosapentaenoico (C22:5n-3) en el testículo parece depender exclusivamente de la actividad de la ELOVL2 (Zadravec et al. 2011). Por tanto, ELOVL2 resulta esencial para la formación de los AGPs C24-30 de la serie n-6, los cuales son indispensables para la maduración del espermatozoide y la fertilidad en los ratones macho (Zadravec et al. 2011). Nosotros hemos visto que la expresión de ELOVL2 estaba disminuida en un 28% en los testículos de los ratones HSL -/- respecto a los controles, lo que probablemente resulte en un descenso de la actividad de dicha enzima. Se ha demostrado un efecto dosis del gen *Elovl2* sobre la actividad de la enzima ELOV2 en testículo de ratón: los ratones

heterocigotos *Elovl2*^{+/-} tienen una alteración del perfil de AG intermedia entre los homocigotos *Elovl2*^{-/-} y los ratones *WT Elovl2*^{+/+} (Zadravec et al. 2011). Esto va en consonancia con el aumento en los niveles del ácido docosatetranoico (C22:4n-6) y del ácido docosapentaenoico (C22:5n-3) obtenidos en nuestro estudio.

Teniendo en cuenta todos estos resultados se sugiere que el aumento de la expresión de FADS1 y FADS2 en el testículo de los ratones HSL ^{-/-} es responsable de la utilización acelerada de los AG esenciales (LA y ALA) para la síntesis de los AGP de cadena larga de la serie n-3 y n-6, como indica el incremento de las concentraciones del ácido docosatetranoico (C22:4n-6) y del ácido docosapentaenoico (C22:5n-3). Esto garantiza la síntesis de dichos AGs consiguiendo que no se vean afectados sus niveles en el testículo de los ratones HSL ^{-/-}. De la disminución en la expresión de ELOVL2 se espera como resultado la disminución de la síntesis de los AGCL (Zadravec et al. 2011). Para confirmar esto serían necesarios más estudios para analizar los AGCL, C24-C36, que requieren una tecnología sofisticada que no está al alcance de nuestro laboratorio.

Los cambios observados en la expresión de genes explican también el aumento de la concentración del *Mead acid* (C20:3n-9) que hemos obtenido en los testículos de los ratones HSL ^{-/-}. El *Mead acid* se sintetiza por la acción atípica de las enzimas FADS1, FADS2 y ELOVL5 sobre el ácido oleico (C18:1n-9) (Holman 1960, Guillou et al. 2010). En otros modelos animales se ha comprobado que la deficiencia de AGs en el testículo produce degeneración del mismo e infertilidad, todo esto acompañado por el aumento de *Mead acid* (Engster et al. 1978, Marzouki & Coniglio 1982, Saether et al. 2007). Si el *Mead acid* es un indicador de la funcionalidad del testículo merece ser estudiado con mayor profundidad.

Hay varios autores que han estudiado los efectos de la deficiencia en la HSL sobre la composición de AGs en diferentes tejidos; así por ejemplo, en hígado los niveles de triglicéridos disminuyen drásticamente en los ratones HSL ^{-/-}, junto con cambios en la composición en AG insaturados de los triglicéridos, observándose un aumento de la proporción de ácido oleico (C18:1n-9) y un descenso del ácido palmitoleico (C16:1n-7) y del ALA (C18:3n-3) (Haemmerle et al. 2002, Fernandez et al. 2011). En tejido adiposo blanco el contenido total de triacilgliceroles no se ha visto afectado (Haemmerle et al. 2002), pero sí se han observado cambios importantes en la proporción de AGs (Haemmerle et al. 2002, Fernandez et al. 2011), dándose una acumulación selectiva de las distintas clases de lípidos (más diacilglicéridos en detrimento de los triacilglicéridos). Estos cambios se explican, al menos en parte, por la especificidad de sustrato de la HSL para la hidrólisis de los AGs (Raclot et al. 2001). Esta selectividad de la HSL para para

hidrolizar los ésteres de los AG podría determinar diferencias en la movilización de unos AG insaturados frente a otros (Raclot et al. 2001). Estudios de lipidómica han revelado la existencia de una acumulación selectiva de ciertos lípidos en plasma de ratones HSL -/- tras haber sido sometidos a una dieta alta en grasas (Fernandez et al. 2011).

El papel de la HSL es distinto según el tejido donde actúe y esto parece trasladarse a las alteraciones en la transcripción de genes observadas en los ratones HSL -/-. Merece la pena resaltar que la expresión de los genes que codifican para SCD1 y SCD2 experimenta un gran descenso en tejido adiposo blanco, mientras que en tejido adiposo marrón no se ve afectada, y aumenta en hígado (Fernandez et al. 2008, Fernandez et al. 2011) y en testículo como mostramos en el presente trabajo, aunque solo SCD1. Respecto a las elongasas, los ratones HSL -/- presentan un aumento de la expresión de ELOVL1 en hígado y en tejido adiposo blanco y marrón, y las enzimas ELOVL3, ELOVL5 y ELOVL6 se encuentran o bien disminuidas o bien no están afectadas (Fernandez et al. 2008, Fernandez et al. 2011). En el testículo, la ELOVL2 es la enzima mayoritaria y experimenta un marcado descenso por efecto de la ausencia de la HSL, como hemos visto en nuestro estudio. Desconocemos cómo afecta la deficiencia de la HSL a la expresión de las enzimas implicadas en el metabolismo de los AG en el testículo. Hay autores que sugieren que determinados lípidos que se acumulan como resultado de la ausencia de la HSL puede ser la causa.

Los plasmalógenos participan en diversas funciones de la célula como son la fluidez de la membrana, la protección frente al estrés oxidativo, la transducción de señales (Lessig & Fuchs 2009), así como en el tráfico de membrana y en el metabolismo intracelular del colesterol (Thai et al. 2001, Munn et al. 2003, Mankidy et al. 2010). En nuestro estudio hemos visto un aumento de la concentración del C16:0 DMA en el testículo de los ratones HSL -/- en comparación con los controles, mientras que los niveles del C18:0 DMA no cambian, aunque sí observamos una tendencia a mayores niveles en los testículos de los ratones carentes de HSL respecto a los controles. Este incremento de la concentración de plasmalógenos puede considerarse una respuesta al estrés generado por la deficiencia de la HSL.

En resumen hemos demostrado que la deficiencia en HSL altera la composición en AGs así como la expresión de algunas enzimas implicadas en el metabolismo de los AGs en los testículos. Encontramos un descenso en los AGs esenciales LA (C18:2n-6) y ALA (C18:3n-3) sin cambios en DPA (C22:5n-6) o DHA (C22:6n-3). Además el cambio en la composición en AGs esenciales concuerda con el aumento de *Mead acid*. Posiblemente los cambios descritos en el metabolismo de los AGs pudieran tener algo que ver con la

esterilidad que presentan estos animales HSL $-/-$. Aunque harán falta más estudios para clarificar el mecanismo por el cual la deficiencia en HSL causa los cambios en el metabolismo de los AGs y sus consecuencias en la fertilidad masculina.

Papel de la HSL en los microdominios de membrana plasmática

Los principales componentes de las membranas celulares son los glicerofosfolípidos y, aunque son suficientes para formar bicapas, las membranas de células eucariotas contienen además esfingolípidos y esteroides (Barenholz 2002, Mouritsen & Zuckermann 2004). El principal esteroide de las membranas celulares es el colesterol (Barenholz 2002, Mouritsen & Zuckermann 2004). El colesterol es una molécula muy importante para el organismo que interviene en numerosos procesos (Chang et al. 2006, van der Velde 2010); además de ser necesario para la formación de membrana celular contribuyendo al mantenimiento de la permeabilidad de ésta, participa en la formación de los *lipid raft* y regula la función de las proteínas integrales de la misma (Tabas 2002).

Los principales lípidos que forman parte de las caveolas o *lipid raft* son el colesterol, esfingomielina, glicosfingolípidos, glicerofosfolípidos, fosfatidilserinas, fosfatidilglucosas, ceramidas y lactosilceramidas (Pike 2003).

En los *lipid rafts* están presentes ciertas proteínas de membrana que podrían, por ejemplo, potenciar las cascadas de señalización, o interferir de forma crucial en muchas otras funciones (Simons & Ikonen 1997). La formación anormal de los puentes membranosos intercelulares, entre las células germinales de los ratones HSL $-/-$, sugiere un papel de HSL en la estabilización e integridad de la membrana (Chung et al. 2001). Por otro lado, los niveles de colesterol determinan la fluidez de la membrana y su distribución está ampliamente organizada en la membrana de las espermátidas (Pelletier & Friend 1983, Ladha 1998). La caveolina-1 es una proteína asociada a los *lipid rafts*, en nuestro estudio hemos encontrado una redistribución de la caveolina-1 desde los dominios *lipid rafts* hacia dominios densos de membrana (*no-raft*), que indica una desestructuración de los microdominios *lipid raft*. Se ha propuesto que la isoforma testicular de HSL podría controlar la deposición celular de colesterol en dominios específicos de membrana (Holst et al. 1996), por lo que una ausencia de esta podría estar afectando a la estructura de estos dominios. Nuestro grupo en trabajos anteriores, ya había utilizado la caveolina-1 como marcador de la desestructuración de los dominios *lipid raft* de la membrana plasmática (Sanchez-Wandelmer et al. 2009), demostrando que una deslocalización de proteínas específicas de *lipid raft* es consecuencia de una desestructuración de estos dominios de la membrana plasmática.

La membrana plasmática de las células tiene dos funciones claves; por un lado, la de separar el medio intracelular y extracelular por medio de una barrera lípido/proteína; y por otro lado, la de servir como dominio celular que puede detectar los cambios que

ocurren en el exterior de la célula e iniciar eventos que alteran la fisiología de la célula (por ejemplo; transporte celular, comunicación célula-célula y transducción de señales). Un aspecto esencial de las repuestas funcionales que aporta la membrana celular es la presencia de moléculas en la membrana que reconocen estímulos externos y luego envían la información a otras moléculas de la membrana o a otros compartimentos celulares (Patel & Insel 2009). En las caveolas de células de hepatoma humano HepG2 se había demostrado la presencia del receptor SR-BI de 52 KDa en las fracciones de membrana *no-raft* y que dicha banda se corresponde con una forma inmadura de la proteína, no glicosilada; mientras que, en las fracciones correspondientes a las caveolas o *lipid raft*, hay una banda de 82 KDa que se corresponde con la forma glicosilada madura de SR-BI (Rhainds et al. 2004). Nuestros estudios en testículo de ratón de la colonia deficientes en HSL confirman estos datos en cuanto a la distribución de las dos formas de SR-BI en los dominios de la membrana plasmática. Además hemos observado un aumento de la expresión de la forma madura del receptor o glicosilada (82 kDa) en ambos microdominios de membrana en los testículos de los ratones HSL -/- comparados con los HSL +/+. Al igual que la forma inmadura (52 kDa) de la proteína, que aunque sólo se encontraba en los microdominios *no-raft*, también estaba incrementada su expresión en los testículos de los ratones HSL-/- respecto de los controles. Por lo tanto, los ratones carentes de la HSL presentan un aumento de SR-BI en ambos dominios de la membrana plasmática, *lipid raft* y *no-raft*.

La presencia de esteroides en la membrana, tales como el colesterol, minimiza el volumen libre, reduciendo de ese modo la permeabilidad de la membrana (Mouritsen & Jorgensen 1994, Mouritsen & Jorgensen 1998). El principal papel de los esteroides en la membrana es modular la organización lateral, especialmente la heterogeneidad lateral (Barenholz 2002). Diversos estudios sugieren que no todos los *lipid rafts* son idénticos en cuanto a su composición lipídica y proteica, es más, puede que estas diferencias se deban a la segregación espacial que se da en células para llevar a cabo su función específica. Estas diferencias en cuanto a composición y situación probablemente sean importantes para la función de los *lipid rafts* en la señalización celular (Pike 2003).

Las enzimas responsables de convertir el escualeno en colesterol se localizan en las membranas del RE (Gurr & Harwood 1991). Estudios previos han demostrado que los precursores obtenidos en la biosíntesis de colesterol dejan la membrana RE y van hasta la membrana plasmática en un intervalo de 30 minutos (Echevarria *et al.* 1990, Lange *et al.* 1991). Estos precursores regresan a la membrana del RE donde son procesados hasta colesterol. Este movimiento retrógrado es un paso esencial para la completa biosíntesis de colesterol (Yamauchi *et al.* 2007). Como ya hemos comentado, el primer esteroide

intermediario en la ruta de biosíntesis del colesterol es el lanosterol. Este, en una reacción mediada por la enzima lanosterol 14 α -desmetilasa, es convertido en esteroide activador de la meiosis folicular, FF-MAS, y en el testículo en su análogo T-MAS, éstos dos intermediarios poseen una función biológica añadida a la de la biosíntesis de colesterol (Rozman et al. 2005), que es la de estimular la meiosis en las gónadas. Además, en estudios *in vitro* se ha visto que FF-MAS promueve la transición de metafase I a metafase II en oocitos facilitando así la maduración de éstos (Marin Bivens et al. 2004).

El colesterol posee un papel crítico en la formación de los *lipid raft*. Se han realizado numerosos estudios en membranas artificiales analizando la repercusión de los intermediarios de la biosíntesis de colesterol en las propiedades de las bicapas lipídicas (Miao et al. 2002, Megha et al. 2006, Ollila et al. 2007). Vainio y cols. estudiaron como afectaba a los microdominios de membrana el remplazo de colesterol por desmosterol (Vainio et al. 2006), este último es un componente estructural de membrana abundante en células de mamíferos tales como los espermatozoides (Abumrad et al. 1993). Sus resultados sugieren que las características biofísicas y funcionales que tiene el desmosterol en las membranas difieren considerablemente de las que posee el colesterol (Vainio et al. 2006). Los datos experimentales obtenidos apuntan que la capacidad del desmosterol de promover la formación y la estabilización de los dominios ordenados de las membranas es mucho más débil que la del colesterol (Vainio et al. 2006); viéndose afectada la activación de receptores de señales dependientes de los *lipid rafts*, como el receptor de insulina (Vainio et al. 2006). Nosotros hemos analizado la composición en esteroides de los microdominios de la membrana plasmática, *lipid raft* y *no-raft*, detectando la presencia de los siguientes esteroides, lanosterol, T-MAS, lanosterol, desmosterol, colesterol en el testículo de los ratones HSL +/+ y de ratones HSL -/-. En ambos modelos encontramos una mayor concentración de todos estos esteroides en las fracciones de membrana *lipid raft* que en las *no-raft*; además, como es de esperar el colesterol era el esteroide mayoritario (Pike 2003). En cuanto a las diferencias entre los dominios de los testículos de los ratones HSL -/- y control, vimos un aumento significativo del colesterol en los dominios *no-raft* de la membrana plasmática en los ratones HSL -/-. Este aumento de colesterol en los dominios *no-raft* estaría provocando un mayor empaquetamiento de estas zonas y su mayor similitud con los dominios *lipid raft*. También observamos un descenso de los niveles de desmosterol en los dominios *lipid raft* de los testículos de los ratones que carecían de la HSL respecto de los controles. Si nos fijamos en los esteroides intermediarios más minoritarios como el T-MAS vemos un aumento de sus niveles en las zonas de membrana *no-raft* en los testículos de los ratones HSL -/- respecto de los controles. Todo esto parece indicar que hay una desestructuración de las membranas en

los testículos de los ratones HSL *-/-*, ya que tienen alterada su composición de esteroides tanto los dominios *lipid raft* como los *no-raft*, lo cual podría estar afectando a la fluidez de las membranas necesaria para la correcta espermatogénesis y explicar en parte la infertilidad en estos ratones.

Se ha visto que los intermediarios de la síntesis de colesterol que contienen un doble enlace en el carbono 8, como son el lanosterol, el dihidrolanosterol, el zimosterol y el zimostenol, tienen una capacidad muy limitada para estabilizar los *lipid raft* (Miao *et al.* 2002, Megha *et al.* 2006). Resulta razonable pensar que los esteroides que tienen una estructura más parecida al colesterol podrían intercambiarse entre sí en la formación de estos microdominios; de hecho, compuestos de este tipo como latosterol y 7DHC se incorporan a la membrana de forma más eficaz que el propio colesterol, pero alteran una característica importante de la membrana como es la presión lateral (Ollila *et al.* 2007). Estos precursores estarían modificando la estabilidad de la membrana plasmática afectando la presión lateral, y reflejándose esto en última instancia en una desestructuración de los microdominios de membrana *lipid raft*.

En general, hemos visto un descenso en los esteroides presentes en los dominios *lipid raft*, en concreto el desmosterol, esto hará cambiar la funcionalidad de estos dominios apoyando la idea de que en los ratones que carecen de la HSL se produce una desestructuración de las membranas celulares. Pero en contraposición, también hemos demostrado un aumento en los esteroides presentes en los dominios *no-raft*, colesterol y T-MAS, lo que los compactaría más y les hará más parecidos a los dominios *lipid raft*, y por tanto alterando también su funcionalidad.

Conclusiones

Conclusiones

1. Los ratones macho HSL $-/-$, al contrario de lo esperado, no son obesos y presentan un peso corporal disminuido respecto de los controles.
2. En los ratones macho HSL $-/-$, la alteración en la espermatogénesis e infertilidad de estos animales va asociada a un menor peso de los testículos, y una disminuida movilidad de los espermatozoides e infertilidad. Los testículos son atróficos y presentan una reducción de los diámetros de los túbulos seminíferos junto con una desorganización de las capas del epitelio seminífero; y en el espacio intertubular tienen una mayor cantidad de células de Leydig. Mientras que los testículos de los ratones control, la lámina propia se compone de una capa plana continua de células miodes alargadas separadas por una fina lámina basal de los túbulos seminíferos y del endotelio capilar linfático; en los testículos de los ratones HSL $-/-$ la lámina propia aumenta el espesor y la proliferación de las células miodes se correlaciona con el mayor espesor de la membrana basal.
3. Los ratones HSL $-/-$ no presentan cambios en los niveles plasmáticos de testosterona, lo que indica que la severa oligospermia que presentan no es el resultado de una insuficiencia hormonal o hipogonadismo.
4. Los receptores *scavenger* clase B (SR-BI, SR-BII y LIMPII) en los testículos de los ratones tienen una localización celular específica para cada receptor. SR-BI se localiza en las células de Leydig y en las espermátidas; SR-BII en los espermátocitos y espermátidas de los túbulos seminíferos, pero no en las células de Leydig; y LIMPII se localiza en la membrana de las células de Sertoli y Leydig. La ausencia de HSL induce un aumento en la expresión de SR-BI, SR-BII y LIMPII y en la activación de varias rutas de señalización (ERK, AKT y SRC) en los testículos de ratón, lo que podría favorecer un aumento de la captación de los ésteres de colesterol de las HDL del plasma por estos receptores.
5. Los testículos de los ratones que carecen de la HSL tienen aumentados los niveles de colesterol total, y de FF-MAS, esterol que interviene en la ovogénesis. Presentan un incremento en lípidos neutros en las células de Leydig con respecto a los ratones controles.

6. La ausencia de HSL altera la estructura de los dominios de la membrana *lipid rafts* en los testículos de ratón, provocando la deslocalización de caveolina-1 de los *lipid raft* hacia los dominios *no-raft*. Además induce un cambio en la composición en esteroides en ambos dominios de la membrana, *lipid raft* y *no-raft*. En los *lipid raft* hay un descenso en los niveles de desmosterol; mientras que en los *no-raft* hay un aumento en la concentración de colesterol y T-MAS. Estos cambios pueden alterar el buen funcionamiento y el papel que juegan estos dominios en la fisiología del testículo.

7. SR-BI y SR-BII se localizan en los microdominios de membrana plasmática *lipid rafts* y *no-rafts*. La forma madura de SR-BI se localiza en los dominios *lipid raft* y *no-raft* de la membrana plasmática de los testículos de ratón; mientras que la forma inmadura del receptor sólo se localiza en las zonas *no-raft*. La carencia de HSL provoca un aumento en la expresión de ambas formas del receptor SR-BI en los dominios de la membrana donde se localizaba, no observándose cambios en el receptor SR-BII.

8. La deficiencia de la HSL provoca una alteración en la composición de los ácidos grasos en el testículo de ratón, no así en el plasma. Los cambios más importantes son un descenso en la concentración de los ácidos grasos esenciales, ácido linoleico (C18:2n-6) y ácido α linolénico (C18:3n-3), así como un aumento de los ácidos grasos intermediarios C22:4n-6 y C22:5n-3, sin observar cambios en los productos finales, ácido docosapentaenoico (C22:5n-6) y ácido docosaheptaenoico (C22:7n-3). También observamos un aumento de la concentración del *Mead acid* (C20:3n-9). Estos cambios van acompañados de un incremento en la expresión de enzimas implicadas en su metabolismo como SCD1, FADS1 y FADS2, y un descenso de la ELOVL2. De la disminución en la expresión de ELOVL2 se espera una disminución de la síntesis de los AGCL. Los cambios en el metabolismo de los ácidos grasos también podrían en parte ser responsables de alteración en la funcionalidad del testículo por la pérdida de la HSL.

9. En nuestro estudio hemos visto un aumento de la concentración del C16:0 DMA, representativo de los plasmalógenos, en el testículo de los ratones HSL -/- en comparación con los controles, mientras que los niveles del C18:0 DMA no cambian.

Bibliografía

Bibliografia

- Abifadel, M., Varret, M., Rabes, J. P. et al. (2003) Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia. *Nat Genet*, 34, 154-156.
- Abu, E. O. Oluwatowoju, I. (2009) Omega-3 index determined by gas chromatography with electron impact mass spectrometry. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 80, 189-194.
- Abumrad, N. A. el-Magharabi, M. R.; Amri, E. Z.; Lopez, E.; Grimaldi, P. A. (1993) Cloning of a rat adipocyte membrane protein implicated in binding or transport of long-chain fatty acids that is induced during preadipocyte differentiation. Homology with human CD36. *Journal of Biological Chemistry*, 268, 17665-17668.
- Acton, S., Rigotti, A., Landschulz, K. T., Xu, S., Hobbs, H. H. and Krieger, M. (1996) Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor. *Science*, 271, 518-520.
- Acton, S. L., Scherer, P. E., Lodish, H. F. and Krieger, M. (1994) Expression cloning of SR-BI, a CD36-related class B scavenger receptor. *J Biol Chem*, 269, 21003-21009.
- Ahlborg, G. Felig, P.; Hagenfeldt, L.; Hendler, R.; Wahren, J. (1974) Substrate turnover during prolonged exercise in man. Splanchnic and leg metabolism of glucose, free fatty acids, and amino acids. *J Clin Invest*, 53, 1080-1090.
- Ahluwalia, B., Holman, R. T (1969) Fatty acid composition of lipids of bull, boar, rabbit and human semen. In: *Journal of reproduction and fertility*, Vol. 18, pp. 431-437. ENGLAND.
- Aitken, R. J. and Baker, H. W. G. (1995) Andrology: Seminal leukocytes: passengers, terrorists or good Samaritans. In: *Human Reproduction*, Vol. 10, pp. 1736-1739.
- Akpovi, C. D., Yoon, S. R., Vitale, M. L. and Pelletier, R. M. (2006) The predominance of one of the SR-BI isoforms is associated with increased esterified cholesterol levels not apoptosis in mink testis. *J Lipid Res*, 47, 2233-2247.
- Al-Jarallah, A. Ttigatti, B. L. (2010) A role for the scavenger receptor, class B type I in high density lipoprotein dependent activation of cellular signaling pathways. *Biochim Biophys Acta*, 1801, 1239-1248.
- Ambros, V. (2003) MicroRNA pathways in flies and worms: growth, death, fat, stress, and timing. *Cell*, 113, 673-676.
- Ambros, V. (2004) The functions of animal microRNAs. *Nature*, 431, 350-355.
- Anderson, R. G. (1998) The caveolae membrane system. *Annu Rev Biochem*, 67, 199-225.
- Arenas, M. I., Lobo, M. V., Caso, E., Huerta, L., Paniagua, R. and Martin-Hidalgo, M. A. (2004) Normal and pathological human testes express hormone-sensitive lipase and the lipid receptors CLA-1/SR-BI and CD36. *Hum Pathol*, 35, 34-42.
- Arner, P. (1988) Control of lipolysis and its relevance to development of obesity in man. *Diabetes Metab Rev*, 4, 507-515.
- Asch, A. S. Barnwell, J.; Silverstein, R. L.; Nachman, R. L. (1987) Isolation of the thrombospondin membrane receptor. *J Clin Invest*, 79, 1054-1061.
- Ayala, S. and Brenner, R. R. (1980) Effect of polyunsaturated fatty acids of the alpha-linolenic series in the lipid composition of rat testicles during development. *Acta Physiol Lat Am*, 30, 147-152.
- Azhar, S. Reaven, E. (2002) Scavenger receptor class BI and selective cholesteryl ester uptake: partners in the regulation of steroidogenesis. *Mol Cell Endocrinol*, 195, 1-26.
- Babitt, J., Trigatti, B., Rigotti, A., Smart, E. J., Anderson, R. G., Xu, S. and Krieger, M. (1997) Murine SR-BI, a high density lipoprotein receptor that mediates selective lipid uptake, is N-glycosylated and fatty acylated and colocalizes with plasma membrane caveolae. *J Biol Chem*, 272, 13242-13249.
- Baranova, I. N., Vishnyakova TG; Bocharov, A. V.; Kurlander, R.; Chen, Z.; Kimelman, M. L.; Remaley, A. T.; Csako, G.; Thomas, F.; Eggerman, T. L.; Patterson, A. P. (2005) Serum amyloid A binding to CLA-1 (CD36 and LIMPII analogous-1) mediates serum amyloid A protein-

- induced activation of ERK1/2 and p38 mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem*, 280, 8031-8040.
- Barenholz, Y. (2002) Cholesterol and other membrane active sterols: from membrane evolution to "rafts". *Prog Lipid Res*, 41, 1-5.
- Barenholz, Y. C., G. (2000) Physical chemistry of biological surfaces In: *Physical chemistry of biological surfaces*, (A. Baszkin, Norde, W. editors ed.), pp. 171-241. Marcel Dekker, NY.
- Barriocanal, J. G., Bonifacino, J. S., Yuan, L., Sandoval, I. V. (1986) Biosynthesis, glycosylation, movement through the Golgi system, and transport to lysosomes by an N-linked carbohydrate-independent mechanism of three lysosomal integral membrane proteins. *J Biol Chem*, 261, 16755-16763.
- Bartel, D. P. (2009) MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*, 136, 215-233.
- Bartke, A. (1971) Concentration of free and esterified cholesterol in the testes of immature and adult mice. *J Reprod Fertil*, 25, 153-156.
- Behr, S. R., Patsch, J. R., Forte, T. and Bensadoun, A. (1981) Plasma lipoprotein changes resulting from immunologically blocked lipolysis. *J Lipid Res*, 22, 443-451.
- Beins, D. M., Vining, R. and Balasubramaniam, S. (1982) Regulation of neutral cholesterol esterase and acyl-CoA : cholesterol acyltransferase in the rat adrenal gland. *Biochem J*, 202, 631-637.
- Belfrage, P. (1985) Hormonal control of lipid degradation. In: *New Perspectives in Adipose Tissue: Structure, Function, and Development.*, pp. 121-144. Butterworths, London.
- Belfrage, P., Fredrikson G., Stralfors P., Tornqvist H. (1984a) *Adipose tissue lipases*. Amsterdam.
- Belfrage, P., Jergil, B., Stralfors, P. and Tornqvist, H. (1977) Hormone-sensitive lipase of rat adipose tissue: identification and some properties of the enzyme protein. *Febs Lett*, 75, 259-264.
- Belfrage, P., Fredrikson, G.; Olsson, H.; Stralfors, P. (1984b) Regulation of adipose tissue lipolysis through reversible phosphorylation of hormone-sensitive lipase. *Adv Cyclic Nucleotide Protein Phosphorylation Res*, 17, 351-359.
- Bendel-Stenzel, M.; Anderson, R.; Heasman, J.; Wylie, C. (1998) The origin and migration of primordial germ cells in the mouse. *Semin Cell Dev Biol*, 9, 393-400.
- Bickel, P. E., Scherer, P. E., Schnitzer, J. E., Oh, P., Lisanti, M. P. and Lodish, H. F. (1997) Flotillin and epidermal surface antigen define a new family of caveolae-associated integral membrane proteins. *J Biol Chem*, 272, 13793-13802.
- Bieri, J. G.; Prival, E. L. (1965) Lipid composition of testes from various species. In: *Comparative biochemistry and physiology*, Vol. 15, pp. 275-282. UNITED STATES.
- Bjoerntorp, P. (1964) The Fatty Acid Release and Lipolysis of Human Subcutaneous Adipose Tissue in Vitro. *Metabolism*, 13, 1318-1326.
- Bjorkman, O. (1986) Fuel metabolism during exercise in normal and diabetic man. *Diabetes Metab Rev*, 1, 319-357.
- Bjorntorp, P. and Cramer, K. (1961) Influence of cholesteryl esters from human serum on serum cholesterol determination with the modified Theorell method. *Scand J Clin Lab Invest*, 13, 434-438.
- Blaise, R., Grober, J., Rouet, P., Tavernier, G., Daegelen, D. and Langin, D. (1999) Testis expression of hormone-sensitive lipase is conferred by a specific promoter that contains four regions binding testicular nuclear proteins. *J Biol Chem*, 274, 9327-9334.
- Blaise, R., Guillaudeux, T., Tavernier, G., Daegelen, D., Evrard, B., Mairal, A., Holm, C., Jegou, B. and Langin, D. (2001) Testis hormone-sensitive lipase expression in spermatids is governed by a short promoter in transgenic mice. *J Biol Chem*, 276, 5109-5115.
- Blanco Dolado, L. (1997) Efecto de la diabetes sobre la actividad y la expresión (ARNm) tisular de lipasas en la rata gestante y sus consecuencias metabólicas. In: *Facultad de Ciencias*. Universidad de Alcalá de Henares, Madrid.

- Boyd, G. S., Gorban AMS. (1980) Protein phosphorylation and steroidogenesis. In: *Molecular Aspects of Cellular Regulation. Vol 1: Recently discovered systems of enzyme regulation by reversible phosphorylation.*, (I. C. P. ed.), pp. 95-134. Elsevier, Amsterdam.
- Brasaemle, D. L., Rubin, B., Harten, I. A., Gruia-Gray, J., Kimmel, A. R., Londos, C. (2000) Perilipin A increases triacylglycerol storage by decreasing the rate of triacylglycerol hydrolysis. *J Biol Chem*, 275, 38486-38493.
- Braun, R. E.; Behringer, R. R., Peschon, J. J., Brinster, R. L., Palmiter, R. D. (1989) Genetically haploid spermatids are phenotypically diploid. *Nature*, 337, 373-376.
- Braydich-Stolle, L., Kostereva, N., Dym, M., Hofmann, M. C. (2007) Role of Src family kinases and N-Myc in spermatogonial stem cell proliferation. *Dev Biol*, 304, 34-45.
- Brenner, R. R. (1977) Regulatory function of delta6 desaturase -- key enzyme of polyunsaturated fatty acid synthesis. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology*, Vol. 83, pp. 85-101. UNITED STATES.
- Brites, P., Mooyer, P. A., El Mrabet, L., Waterham, H. R., Wanders, R. J. (2009) Plasmalogens participate in very-long-chain fatty acid-induced pathology. In: *Brain : a journal of neurology*, Vol. 132, pp. 482-492. England.
- Brites, P. W., H. R.; Wanders, R. J. (2004) Functions and biosynthesis of plasmalogens in health and disease. *Biochim Biophys Acta*, 1636, 219-231.
- Brown, D. A. and Rose, J. K. (1992) Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell*, 68, 533-544.
- Brown, M. S. and Goldstein, J. L. (1974) Suppression of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity and inhibition of growth of human fibroblasts by 7-ketocholesterol. *J Biol Chem*, 249, 7306-7314.
- Burgos-Trinidad, M., Youngblood, G. L.; Maroto, M. R., Scheller, A., Robins, D. M., Payne, A. H. (1997) Repression of cAMP-induced expression of the mouse P450 17 alpha-hydroxylase/C17-20 lyase gene (Cyp17) by androgens. *Mol Endocrinol*, 11, 87-96.
- Burns, T. W., Langley, P. E., Terry, B. E. and Robinson, G. A. (1978) The role of free fatty acids in the regulation of lipolysis by human adipose tissue cells. *Metabolism*, 27, 1755-1762.
- Burns, T. W., Terry, B. E., Langley, P. E. and Robison, G. A. (1980) Role of cyclic AMP in human adipose tissue lipolysis. *Adv Cyclic Nucleotide Res*, 12, 329-341.
- Burr, G. O., Burr, M. M. (1973) Nutrition classics from The Journal of Biological Chemistry 82:345-67, 1929. A new deficiency disease produced by the rigid exclusion of fat from the diet. In: *Nutrition reviews*, Vol. 31, pp. 248-249. UNITED STATES.
- Byskov AG., Andersen CY., Nordholm L., Thøgersen H., Xia G., Wassmann O., Andersen JV., Guddal E., Roed T. (1995) Chemical structure of sterols that activate oocyte meiosis. *Nature*, 374, 559-562.
- Calvo, D. and Vega, M. A. (1993) Identification, primary structure, and distribution of CLA-1, a novel member of the CD36/LIMPII gene family. *J Biol Chem*, 268, 18929-18935.
- Calvo, D., Dopazo, J., Vega, M. A. (1995) The CD36, CLA-1 (CD36L1), and LIMPII (CD36L2) gene family: cellular distribution, chromosomal location, and genetic evolution. *Genomics*, 25, 100-106.
- Cao, H. G., Kristin; Mayers, Jared R.; Wiest, Michelle M.; Watkins, Steven M.; Hotamisligil, G (2008) Identification of a Lipokine, a Lipid Hormone Linking Adipose Tissue to Systemic Metabolism. In: *Cell Biochemistry and Function*, Vol. 134, pp. 933-944.
- Clark, A. M. Chuzel, F.; Sanchez, P.; Saez, J. M. (1996) Regulation by gonadotropins of the messenger ribonucleic acid for P450 side-chain cleavage, P450(17) alpha-hydroxylase/C17,20-lyase, and 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in cultured pig Leydig cells. *Biol Reprod*, 55, 347-354.
- Clark, B. J.; Wells, J.; King, S. R.; Stocco, D. M. (1994) The purification, cloning, and expression of a novel luteinizing hormone-induced mitochondrial protein in MA-10 mouse Leydig tumor

- cells. Characterization of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR). *J Biol Chem*, 269, 28314-28322.
- Clayton, P. T. (1998) Disorders of cholesterol biosynthesis. *Arch Dis Child*, 78, 185-189.
- Clermont, Y. (1972) Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. *Physiol Rev*, 52, 198-236.
- Clermont, Y. Bustos-Obregón, E. (1968) Re-examination of spermatogonial renewal in the rat by means of seminiferous tubules mounted "in toto". *Am J Anat*, 122, 237-247.
- Clermont, Y. Hermo, L. (1975) Spermatogonial stem cells in the albino rat. *Am J Anat*, 142, 159-175.
- Clermont, Y. Leblond, C. P. (1953) Renewal of spermatogonia in the rat. *Am J Anat*, 93, 475-501.
- Clermont, Y. Leblond, C. P. (1959) Differentiation and renewal of spermatogonia in the monkey, *Macacus rhesus*. *Am J Anat*, 104, 237-273.
- Clermont, Y. Perey, B. (1957) Quantitative study of the cell population of the seminiferous tubules in immature rats. *Am J Anat*, 100, 241-267.
- Coniglio, J. G. (1994) Testicular lipids. *Prog Lipid Res*, 33, 387-401.
- Conley, A. J. Mason, J. I. (1990) Placental steroid hormones. *Baillieres Clin Endocrinol Metab*, 4, 249-272.
- Connor, W. E., Lin, D. S. and Neuringer, M. (1997) Biochemical markers for puberty in the monkey testis: desmosterol and docosahexaenoic acid. *J Clin Endocrinol Metab*, 82, 1911-1916.
- Connor, W. E., Lin, D. S., Wolf, D. P., Alexander, M. (1998) Uneven distribution of desmosterol and docosahexaenoic acid in the heads and tails of monkey sperm-. In: *Journal of lipid research*, Vol. 39- pp. 1404--1411-. UNITED STATES-.
- Contreras, J. A. and Lasuncion, M. A. (1994) Essential differences in cholesteryl ester metabolism between human monocyte-derived and J774 macrophages. Evidence against the presence of hormone-sensitive lipase in human macrophages. *Arterioscler Thromb*, 14, 443-452.
- Contreras, J. A. Karlsson, M.; Osterlund, T.; Laurell, H.; Svensson, A.; Holm, C. (1996) Hormone-sensitive lipase is structurally related to acetylcholinesterase, bile salt-stimulated lipase, and several fungal lipases. Building of a three-dimensional model for the catalytic domain of hormone-sensitive lipase. *J Biol Chem*, 271, 31426-31430.
- Cook, K. G., Colbran, R. J., Snee, J. and Yeaman, S. J. (1983) Cytosolic cholesterol ester hydrolase from bovine corpus luteum. Its purification, identification, and relationship to hormone-sensitive lipase. *Biochim Biophys Acta*, 752, 46-53.
- Cook, K. G., Yeaman, S. J., Stralfors, P., Fredrikson, G. and Belfrage, P. (1982) Direct evidence that cholesterol ester hydrolase from adrenal cortex is the same enzyme as hormone-sensitive lipase from adipose tissue. *Eur J Biochem*, 125, 245-249.
- Coppack, S. W., Fisher, R. M., Gibbons, G. F., Humphreys, S. M., McDonough, M. J., Potts, J. L. and Frayn, K. N. (1990) Postprandial substrate deposition in human forearm and adipose tissues in vivo. *Clin Sci (Lond)*, 79, 339-348.
- Coppack, S. W., Frayn, K. N., Humphreys, S. M., Dhar, H. and Hockaday, T. D. (1989) Effects of insulin on human adipose tissue metabolism in vivo. *Clin Sci (Lond)*, 77, 663-670.
- Cordle, S. R., Colbran, R. J. and Yeaman, S. J. (1986) Hormone-sensitive lipase from bovine adipose tissue. *Biochim Biophys Acta*, 887, 51-57.
- Cummins CL., Volle DH., Zhang Y., McDonald JG., Sion B., Lefrançois-Martinez AM., Caira F., Veyssière G., Mangelsdorf DJ., Lobaccaro JM. (2006) Liver X receptors regulate adrenal cholesterol balance. *The Journal of Clinical Investigation*, 116, 1902-1912.
- Chang, T. Y., Chang, C. C., Ohgami, N. and Yamauchi, Y. (2006) Cholesterol sensing, trafficking, and esterification. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 22, 129-157.
- Chanmugam, P. S., Boudreau, M. D. and Hwang, D. H. (1991) Dietary (n-3) fatty acids alter fatty acid composition and prostaglandin synthesis in rat testis. In: *The Journal of nutrition*, Vol. 121, pp. 1173 -1178. UNITED STATES.

- Chen, H. W., Kandutsch, A. A., Waymouth, C. (1974) Inhibition of cell growth by oxygenated derivatives of cholesterol. *Nature*, 251, 419-421.
- Cheng, C. Y. Mruk, D. D. (2002) Cell junction dynamics in the testis: Sertoli-germ cell interactions and male contraceptive development. *Physiol Rev*, 82, 825-874.
- Chiarini-Garcia, H. R., A. M.; Russell, L. D. (2003) Non-random distribution of spermatogonia in rats: evidence of niches in the seminiferous tubules. *Reproduction*, 126, 669-680.
- Cho, H. P., Nakamura, M., Clarke, S. D. p. (1999) Cloning, expression, and fatty acid regulation of the human delta-5 desaturase. In: *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 274, pp. 37335-37339.
- Chung, S., Wang, S. P., Pan, L., Mitchell, G., Trasler, J. and Hermo, L. (2001) Infertility and testicular defects in hormone-sensitive lipase-deficient mice. *Endocrinology*, 142, 4272-4281.
- Dadoune, J. P. (2007) New insights into male gametogenesis: what about the spermatogonial stem cell niche? *Folia Histochem Cytobiol*, 45, 141-147.
- Davies, J. I. and Souness, J. E. (1981) The mechanisms of hormone and drug actions on fatty acid release from adipose tissue. *Rev Pure Appl Pharmacol Sci*, 2, 1-112.
- Davis, W. W. and Garren, L. D. (1968) On the mechanism of action of adrenocorticotrophic hormone. The inhibitory site of cycloheximide in the pathway of steroid biosynthesis. *J Biol Chem*, 243, 5153-5157.
- De Kretser, D. M., Catt, K. J. and Paulsen, C. A. (1971) Studies on the in vitro testicular binding of iodinated luteinizing hormone in rats. *Endocrinology*, 88, 332-337.
- de la Llera-Moya, M. C., Margery A., Drazul, D., K., Seth M., Favari, E., Yancey, P. G., Williams, D. L., Rothblat, G. H. (2001) Scavenger receptor class B type I affects cholesterol homeostasis by magnifying cholesterol flux between cells and HDL. *Journal of Lipid Research*, 42, 1969-1978.
- de Rooij, D. G. (2001) Proliferation and differentiation of spermatogonial stem cells. *Reproduction*, 121, 347-354.
- Do Rego, J. L. M. S., J. Y.; Burel, D.; Leprince, J., Luu-The, V., Tsutsui, K., Tonon, M. C., Pelletier, G., Vaudry, H. (2009) Neurosteroid biosynthesis: enzymatic pathways and neuroendocrine regulation by neurotransmitters and neuropeptides. *Front Neuroendocrinol*, 30, 259-301.
- Dorfman, R. I. (1957) Biosynthesis of adrenocortical steroids. *Cancer*, 10, 741-745.
- Dufau, M. (1997) The luteinizing hormone receptor. In: *The Leydig cell*, (H. M. In Payne AH, Russell LD, eds. ed.). II: Cache River Press, Viena.
- Duplus, E. and Forest, C. (2002) Is there a single mechanism for fatty acid regulation of gene transcription. In: *Biochemical pharmacology*, Vol. 64, pp. 893 -901.
- Dym, M. and Clermont, Y. (1970) Role of spermatogonia in the repair of the seminiferous epithelium following x-irradiation of the rat testis. *Am J Anat*, 128, 265-282.
- Eacker, S. M., Agrawal, N., Qian, K., Dichek, H. L., Gong, E. Y., Lee, K. and Braun, R. E. (2008) Hormonal regulation of testicular steroid and cholesterol homeostasis. *Mol Endocrinol*, 22, 623-635.
- Eckhardt, E. R., Cai, L., Shetty, S., Zhao, Z., Szanto, A., Webb, N. R. and Van der Westhuyzen, D. R. (2006) High density lipoprotein endocytosis by scavenger receptor SR-BII is clathrin-dependent and requires a carboxyl-terminal dileucine motif. *J Biol Chem*, 281, 4348-4353.
- Echevarria, F., Norton, R. A., Nes, W. D. and Lange, Y. (1990) Zymosterol is located in the plasma membrane of cultured human fibroblasts. *J Biol Chem*, 265, 8484-8489.
- Eddy, E. M. (2002) Male germ cell gene expression. *Recent Prog Horm Res*, 57, 103-128.
- Egan, J. J., Greenberg, A. S., Chang, M. K. and Londos, C. (1990) Control of endogenous phosphorylation of the major cAMP-dependent protein kinase substrate in adipocytes by insulin and beta-adrenergic stimulation. *J Biol Chem*, 265, 18769-18775.
- El-Hajjaji FZ., Oumeddour A., Pommier AJ., Ouvrier A., Viennois E., Dufour J., Caira F., Drevet JR., Volle DH., Baron S., Saez F., Lobaccaro JM. (2011) Liver X receptors, lipids and their reproductive secrets in the male. *Biochim Biophys Acta*.

- Engster, H. M., Carew, L. B., Jr., Cunningham, F. J. (1978) Effects of an essential fatty acid deficiency, pair-feeding and level of dietary corn oil on the hypothalamic-pituitary-gonadal axis and other physiological parameters in the male chicken. *J Nutr*, 108, 889-900.
- Eriksson, H., Ridderstrale, M., Degerman, E., Ekholm, D., Smith, C. J., Manganiello, V. C., Belfrage, P. and Tornqvist, H. (1995) Evidence for the key role of the adipocyte cGMP-inhibited cAMP phosphodiesterase in the antilipolytic action of insulin. *Biochim Biophys Acta*, 1266, 101-107.
- Espenshade, P. J., Li, W. P., Yabe, D. (2002) Sterols block binding of COPII proteins to SCAP, thereby controlling SCAP sorting in ER. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 11694-11699.
- Fain, J. N. and Shepherd, R. E. (1975) Free fatty acids as feedback regulators of adenylate cyclase and cyclic 3':5'-AMP accumulation in rat fat cells. *J Biol Chem*, 250, 6586-6592.
- Fain, N. (1982) Regulation of lipid metabolism by cyclic nucleotides. In: *Handbook of Experimental Pharmacology*, (K. J. Nathanson JA ed.), pp. 89-150. Springer-Verlag, Berlin.
- Farese AM., MacVittie TJ., Lind LB., Smith WG., McKearn JP. (1998) The combined administration of daniplestim and Mpl ligand augments the hematopoietic reconstitution observed with single cytokine administration in a nonhuman primate model of myelosuppression. *Stem Cells*, 16 Suppl 2, 143-154.
- Febbraio M., Hajjar DP., Silverstein RL. (2001) CD36: a class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism. *J Clin Invest*, 108, 785-791.
- Fernández-Hernando C., Suárez Y., Rayner KJ., Moore KJ. (2011) MicroRNAs in lipid metabolism. *Curr Opin Lipidol*, 22, 86-92.
- Fernandez, C., Lindholm, M., Krogh, M., Lucas, S., Larsson, S., Osmark, P., Berger, K., Boren, J., Fielding, B., Frayn, K., Holm, C (2008) Disturbed cholesterol homeostasis in hormone-sensitive lipase-null mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 295, E820-831.
- Fernandez, C., Martin, M., Gomez-Coronado, D. and Lasuncion, M. A. (2005) Effects of distal cholesterol biosynthesis inhibitors on cell proliferation and cell cycle progression. *J Lipid Res*, 46, 920-929.
- Fernandez, C., Schuhmann, K., Herzog, R., Fielding, B., Frayn, K., Shevchenko, A., James, P., Holm, C. and Strom, K. (2011) Altered desaturation and elongation of fatty acids in hormone-sensitive lipase null mice. *PLoS One*, 6, e21603.
- Filipowicz W., Bhattacharyya SN., Sonenberg N. (2008) Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet*, 9, 102-114.
- Fofana, M., Travert, C., Carreau, S., Le Goff, D. (2000) Evaluation of cholesteryl ester transfer in the seminiferous tubule cells of immature rats in vivo and in vitro. *J Reprod Fertil*, 118, 79-83.
- Fofana, M. M., J. C.; Bocquet, J.; Le Goff, D. (1996) Transfer of cholesterol between high density lipoproteins and cultured rat Sertoli cells. *Biochem Cell Biol*, 74, 681-686.
- Folch, J. L., M.; Sloane Stanley, G. H. (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem*, 226, 497-509.
- Foster LJ., De Hoog CL., Mann M. (2003) Unbiased quantitative proteomics of lipid rafts reveals high specificity for signaling factors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 5813-5818.
- Fra AM., Williamson E., Simons K., Parton RG. (1995) De novo formation of caveolae in lymphocytes by expression of VIP21-caveolin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92, 8655-8659.
- Fredrikson, G. and Belfrage, P. (1983) Positional specificity of hormone-sensitive lipase from rat adipose tissue. *J Biol Chem*, 258, 14253-14256.
- Fredrikson, G., Nilsson, S., Olsson, H., Bjorck, L., Akerstrom, B. and Belfrage, P. (1987) Use of protein G for preparation and characterization of rabbit antibodies against rat adipose tissue hormone-sensitive lipase. *J Immunol Methods*, 97, 65-70.

- Fredrikson, G., Stralfors, P., Nilsson, N. O. and Belfrage, P. (1981) Hormone-sensitive lipase from adipose tissue of rat. *Methods Enzymol*, 71 Pt C, 636-646.
- Fredrikson, G., Tornqvist, H. and Belfrage, P. (1986) Hormone-sensitive lipase and monoacylglycerol lipase are both required for complete degradation of adipocyte triacylglycerol. *Biochim Biophys Acta*, 876, 288-293.
- Garner DL., Johnson LA. (1995) Viability assessment of mammalian sperm using SYBR-14 and propidium iodide. *Biology of Reproduction*, 53, 276-284.
- Garton, A. J., Campbell, D. G., Carling, D., Hardie, D. G., Colbran, R. J., Yeaman, S. J. (1989) Phosphorylation of bovine hormone-sensitive lipase by the AMP-activated protein kinase. A possible antilipolytic mechanism. *Eur J Biochem*, 179, 249-254.
- Garton, A. J., Campbell, D. G., Cohen, P., Yeaman, S. J. (1988) Primary structure of the site on bovine hormone-sensitive lipase phosphorylated by cyclic AMP-dependent protein kinase. *FEBS Lett*, 229, 68-72.
- Glennay, J. R., Jr. (1989) Tyrosine phosphorylation of a 22-kDa protein is correlated with transformation by Rous sarcoma virus. *J Biol Chem*, 264, 20163-20166.
- Go, K. J. and Wolf, D. P. (1983) The role of sterols in sperm capacitation. *Adv Lipid Res*, 20, 317-330.
- Goldstein, J. L. and Brown, M. S. (1990) Regulation of the mevalonate pathway. *Nature*, 343, 425-430.
- Gorbachinsky I, Akpınar H, Assimos DG. (2010) Metabolic syndrome and urologic diseases. *Rev Urol*, 12, e157-180.
- Gorban, A. M. and Boyd, G. S. (1977) ACTH activation of cytosol triglyceride hydrolase in the adrenal of the rat. *FEBS Lett*, 79, 54-58.
- Grahame, H., D., Carling, D., T.R. Sim, A. (1989) The AMP-activated protein kinase: a multisubstrate regulator of lipid metabolism. *Trends in Biochemical Sciences*, 14, 20-23.
- Green, C. D., Ozguden-Akkoc, C. G., Wang, Y., Jump, D. B., Olson, L. K. (2010) Role of fatty acid elongases in determination of de novo synthesized monounsaturated fatty acid species. In: *Journal of lipid research* Vol. 51, pp. 1871-1877 United States.
- Greenberg, A. S., Shen, W. J., Muliro, K., Patel, S., Souza, S. C., Roth, R. A. and Kraemer, F. B. (2001) Stimulation of lipolysis and hormone-sensitive lipase via the extracellular signal-regulated kinase pathway. *J Biol Chem*, 276, 45456-45461.
- Griswold, M. D. (1998) The central role of Sertoli cells in spermatogenesis. *Semin Cell Dev Biol*, 9, 411-416.
- Grober, J., Laurell, H., Blaise, R., Fabry, B., Schaak, S., Holm, C., Langin, D. (1997) Characterization of the promoter of human adipocyte hormone-sensitive lipase. *Biochem J*, 328 (Pt 2), 453-461.
- Gu, F., Harbitz, I., Chowdhary, B. P., Bosnes, M., Gustavsson, I. (1992) Chromosomal localization of the hormone sensitive lipase (LIPE) and insulin receptor (INSR) genes in pigs. *Hereditas*, 117, 231-236.
- Guardavaccaro, D., Kudo, Y., Boulaire, J. et al. (2003) Control of meiotic and mitotic progression by the F box protein beta-Trcp1 in vivo. *Dev Cell*, 4, 799-812.
- Guillou, H., Zadravec, D., Martin, P. G. P., Jacobsson, A. (2010) The key roles of elongases and desaturases in mammalian fatty acid metabolism: Insights from transgenic mice. In: *Progress in lipid research*, Vol. 49, pp. 186 -199.
- Gurr, M. I. and Harwood, J. L. (1991) *Lipid Biochemistry*: Chapman & Hall. New York.
- Guyton, A. C. and Hall John E. (1996) *Tratado de fisiología médica*. Madrid.
- Gwynne, J. T. and Strauss, J. F., 3rd (1982) The role of lipoproteins in steroidogenesis and cholesterol metabolism in steroidogenic glands. *Endocr Rev*, 3, 299-329.
- Haemmerle G, Zimmermann R, Hayn M, Theussl C, Waeg G, Wagner E, Sattler W, Magin TM, Wagner EF, Zechner R. (2002) Hormone-sensitive lipase deficiency in mice causes diglyceride accumulation in adipose tissue, muscle, and testis. *J Biol Chem*, 277, 4806-4815.

- Haemmerle, G., Zimmermann, R., Zechner, R. (2003) Letting lipids go: hormone-sensitive lipase. *Curr Opin Lipidol*, 14, 289-297.
- Haidl, G. and Opper, C. (1997) Changes in lipids and membrane anisotropy in human spermatozoa during epididymal maturation. *Hum Reprod*, 12, 2720-2723.
- Hales DB., Sha LL., Payne AH. (1987) Testosterone inhibits cAMP-induced de Novo synthesis of Leydig cell cytochrome P-450(17 alpha) by an androgen receptor-mediated mechanism. *J Biol Chem*, 262, 11200-11206.
- Ham, A. W. L., Thomas Sydney (1963) *Tratado de histología*. México.
- Harada, K., Shen, W. J., Patel, S., Natu, V., Wang, J., Osuga, J., Ishibashi, S. and Kraemer, F. B. (2003) Resistance to high-fat diet-induced obesity and altered expression of adipose-specific genes in HSL-deficient mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 285, E1182-1195.
- Harbitz, I., Langset, M., Ege, A. G., Hoyheim, B. and Davies, W. (1999) The porcine hormone-sensitive lipase gene: sequence, structure, polymorphisms and linkage mapping. *Anim Genet*, 30, 10-15.
- Havel, R. J. Naimark, A., Borchgrevink, C. F. (1963) Turnover rate and oxidation of free fatty acids of blood plasma in man during exercise: studies during continuous infusion of palmitate-1-C14. *J Clin Invest*, 42, 1054-1063.
- He, Z. J. J., Kokkinaki, M., Golestaneh, N., Hofmann, M. C., Dym, M. (2008) Gdnf upregulates c-Fos transcription via the Ras/Erk1/2 pathway to promote mouse spermatogonial stem cell proliferation. *Stem Cells*, 26, 266-278.
- Heckert, L. L. and Griswold, M. D. (2002) The expression of the follicle-stimulating hormone receptor in spermatogenesis. *Recent Prog Horm Res*, 57, 129-148.
- Herman, G. E. (2003) Disorders of cholesterol biosynthesis: prototypic metabolic malformation syndromes. *Hum Mol Genet*, 12 Spec No 1, R75-88.
- Hermo L., Pelletier RM., Cyr DG., Smith CE. (2010) Surfing the wave, cycle, life history, and genes/proteins expressed by testicular germ cells. Part 1: background to spermatogenesis, spermatogonia, and spermatocytes. *Microsc Res Tech*, 73, 241-278.
- Herrera, E., Lasuncion, M. A., Gomez-Coronado, D., Aranda, P., Lopez-Luna, P. and Maier, I. (1988) Role of lipoprotein lipase activity on lipoprotein metabolism and the fate of circulating triglycerides in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*, 158, 1575-1583.
- Hilscher, B., Hilscher, W.; Maurer, W. (1969) [Autoradiographic studies on the modus of proliferation and regeneration of the seminiferous epithelium of Wistar rats]. *Z Zellforsch Mikrosk Anat*, 94, 593-604.
- Hillgartner, F. B., Salati, L. M. and Goodridge, A. G. (1995) Physiological and molecular mechanisms involved in nutritional regulation of fatty acid synthesis. In: *Physiological Reviews*, Vol. 75, pp. 47 -76r.
- Hoekstra, M, Van Berkel, T. J., Van Eck, M. (2010) Scavenger receptor BI: a multi-purpose player in cholesterol and steroid metabolism. *World J Gastroenterol*, 16, 5916-5924.
- Hogan, B., Beddington, R., Costantini, F., Lacy, E. (1994) *Manipulating the Mouse Embryo. A Laboratory Manual*, pp 392-393.
- Holm, C. (1989) Hormone sensitive lipase. cDNA cloning, structure, properties and function. Lund (Suiza).
- Holm, C. (2003) Molecular mechanisms regulating hormone-sensitive lipase and lipolysis. *Biochem Soc Trans*, 31, 1120-1124.
- Holm, C., Belfrage, P., Fredrikson, G. (1987a) Immunological evidence for the presence of hormone-sensitive lipase in rat tissues other than adipose tissue. *Biochem Biophys Res Commun*, 148, 99-105.
- Holm, C., Belfrage, P., Osterlund, T., Davis, R. C., Schotz, M. C. and Langin, D. (1994) Hormone-sensitive lipase: structure, function, evolution and overproduction in insect cells using the baculovirus expression system. *Protein Eng*, 7, 537-541.

- Holm, C., Fredrikson, G., Cannon, B. and Belfrage, P. (1987b) Hormone-sensitive lipase in brown adipose tissue: identification and effect of cold exposure. *Biosci Rep*, 7, 897-904.
- Holm, C., Kirchgessner, T. G., Svenson, K. L. et al. (1988) Hormone-sensitive lipase: sequence, expression, and chromosomal localization to 19 cent-q13.3. *Science*, 241, 1503-1506.
- Holm, C., Osterlund, T., Laurell, H. and Contreras, J. A. (2000) Molecular mechanisms regulating hormone-sensitive lipase and lipolysis. *Annu Rev Nutr*, 20, 365-393.
- Holman, R. T. (1960) The ratio of trienoic: tetraenoic acids in tissue lipids as a measure of essential fatty acid requirement. *J Nutr*, 70, 405-410.
- Holst, L. S., Langin, D., Mulder, H., Laurell, H., Grober, J., Bergh, A., Mohrenweiser, H. W., Edgren, G. and Holm, C. (1996) Molecular cloning, genomic organization, and expression of a testicular isoform of hormone-sensitive lipase. *Genomics*, 35, 441-447.
- Hollenberg, C. H., Raben, M. S., Astwood, E. B. (1961) The lipolytic response to corticotropin. *Endocrinology*, 68, 589-598.
- Horton, J. D., Goldstein, J. L., Brown, M. S. (2002) SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest*, 109, 1125-1131.
- Horton, J. D., Shah, N. A., Warrington, J. A., Anderson, N. N., Park, S. W., Brown, M. S., Goldstein, J. L. (2003) Combined analysis of oligonucleotide microarray data from transgenic and knockout mice identifies direct SREBP target genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 12027-12032.
- Hua, X., Wu, J., Goldstein, J. L., Brown, M. S., Hobbs, H. H. (1995) Structure of the human gene encoding sterol regulatory element binding protein-1 (SREBF1) and localization of SREBF1 and SREBF2 to chromosomes 17p11.2 and 22q13. *Genomics*, 25, 667-673.
- Huckins, C. (1971) The spermatogonial stem cell population in adult rats. II. A radioautographic analysis of their cell cycle properties. *Cell Tissue Kinet*, 4, 313-334.
- Hui, D. Y. (1996) Molecular biology of enzymes involved with cholesterol ester hydrolysis in mammalian tissues. *Biochim Biophys Acta*, 1303, 1-14.
- Huttunen JK, Aquino AA, Steinberg D. (1970) A purified triglyceride lipase, lipoprotein in nature, from rat adipose tissue. *Biochim Biophys Acta*, 224, 295-298.
- Igarashi, M., Ma, K., Chang, L., Bell, J. M., Rapoport, S. I. (2007) Dietary n-3 PUFA deprivation for 15 weeks upregulates elongase and desaturase expression in rat liver but not brain. *Journal of Lipid Research*, 48, 2463-2470.
- Ikemoto M, Arai H, Feng D, Tanaka K, Aoki J, Dohmae N, Takio K, Adachi H, Tsujimoto M, Inoue K. (2000) Identification of a PDZ-domain-containing protein that interacts with the scavenger receptor class B type I. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97, 6538-6543.
- Ikonen, E. (2006) Mechanisms for cellular cholesterol transport: defects and human disease. *Physiol Rev*, 86, 1237-1261.
- Illiano, G. and Cuatrecasas, P. (1972) Modulation of adenylate cyclase activity in liver and fat cell membranes by insulin. *Science*, 175, 906-908.
- Ingham, P. W. (2001) Hedgehog signaling: a tale of two lipids. *Science*, 294, 1879-1881.
- Ipsen, J. H., Mouritsen, O. G., Bloom, M. (1990) Relationships between lipid membrane area, hydrophobic thickness, and acyl-chain orientational order. The effects of cholesterol. *Biophys J*, 57, 405-412.
- Ipsen, J. H., Mouritsen, O. G. and Zuckermann, M. J. (1989) Theory of thermal anomalies in the specific heat of lipid bilayers containing cholesterol. *Biophys J*, 56, 661-667.
- Ipsen, J. H. K., G.; Mouritsen, O. G.; Wennerstrom, H.; Zuckermann, M. J. (1987) Phase equilibria in the phosphatidylcholine-cholesterol system. *Biochim Biophys Acta*, 905, 162-172.
- Janowski, B. A., Willy, P. J., Devi, T. R., Falck, J. R., Mangelsdorf, D. J. (1996) An oxysterol signalling pathway mediated by the nuclear receptor LXR alpha. *Nature*, 383, 728-731.
- Jepson, C. A. and Yeaman, S. J. (1992) Inhibition of hormone-sensitive lipase by intermediary lipid metabolites. *FEBS Lett*, 310, 197-200.

- Ji, Y., Jian, B., Wang, N., Sun, Y., Moya, M. L., Phillips, M. C., Rothblat, G. H., Swaney, J. B., Tall, A. R. (1997) Scavenger receptor BI promotes high density lipoprotein-mediated cellular cholesterol efflux. *J Biol Chem*, 272, 20982-20985.
- Jian, Bo, de la Llera-Moya, Margarita, Ji, Yong; Wang, Nan, Phillips, Michael C., Swaney, John B., Tall, Alan R., Rothblat, George H. (1998) Scavenger Receptor Class B Type I as a Mediator of Cellular Cholesterol Efflux to Lipoproteins and Phospholipid Acceptors. *Journal of Biological Chemistry*, 273, 5599-5606.
- Jorgensen, J. S. and Nilson, J. H. (2001) AR suppresses transcription of the LHbeta subunit by interacting with steroidogenic factor-1. *Mol Endocrinol*, 15, 1505-1516.
- Jump, D. B. (2004) Fatty Acid Regulation of Gene Transcription. In: *Critical reviews in clinical laboratory sciences*, Vol. 41 pp. 41-78.
- Jump, D. B. and Clarke, S. D. (1999) Regulation of gene expression by dietary fat. In: *Annual Review of Nutrition*, Vol. 19, pp. 63-90.
- Kabbaj, O., Holm, C., Vitale, M. L., Pelletier, R. M. (2001) Expression, activity, and subcellular localization of testicular hormone-sensitive lipase during postnatal development in the guinea pig. *Biol Reprod*, 65, 601-612.
- Kabbaj, O., Yoon, S. R., Holm, C., Rose, J., Vitale, M. L. and Pelletier, R. M. (2003) Relationship of the hormone-sensitive lipase-mediated modulation of cholesterol metabolism in individual compartments of the testis to serum pituitary hormone and testosterone concentrations in a seasonal breeder, the mink (*Mustela vison*). *Biol Reprod*, 68, 722-734.
- Kanatsu-Shinohara, M. M., H., Inoue, K., Ogonuki, N.; Toyokuni, S., Ogura, A., Shinohara, T. (2005) Germline niche transplantation restores fertility in infertile mice. *Hum Reprod*, 20, 2376-2382.
- Kanatsu-Shinohara, M. O., N.; Inoue, K.; Ogura, A.; Toyokuni, S.; Shinohara, T. (2003) Restoration of fertility in infertile mice by transplantation of cryopreserved male germline stem cells. *Hum Reprod*, 18, 2660-2667.
- Kastner, P., Mark, M., Leid, M. et al. (1996) Abnormal spermatogenesis in RXR beta mutant mice. *Genes Dev*, 10, 80-92.
- Kaur, B. C., Sarah M.; Sandberg, Eric M.; Devi, Narra S.; Zhang, Zhaobin; Klenotic, Philip A.; Febbraio, MariaLShim, Hyunsuk; Mao, Hui; Tucker-Burden, Carol; Silverstein, Roy L.; Brat, Daniel J.; Olson, Jeffrey J.; Van Meir, Erwin G. (2009) Vasculostatin Inhibits Intracranial Glioma Growth and Negatively Regulates In vivo Angiogenesis through a CD36-Dependent Mechanism. *Cancer Research*, 69, 1212-1220.
- Khoo, J. C., Aquino, A. A. and Steinberg, D. (1974) The mechanism of activation of hormone-sensitive lipase in human adipose tissue. *J Clin Invest*, 53, 1124-1131.
- Khoo, J. C., Reue, K., Steinberg, D. and Schotz, M. C. (1993) Expression of hormone-sensitive lipase mRNA in macrophages. *J Lipid Res*, 34, 1969-1974.
- Kierszenbaum, A. L. and Tres, L. L. (2004) The acrosome-acroplaxome-manchette complex and the shaping of the spermatid head. *Arch Histol Cytol*, 67, 271-284.
- Kimmins, S., Kotaja, N., Davidson, I. and Sassone-Corsi, P. (2004) Testis-specific transcription mechanisms promoting male germ-cell differentiation. *Reproduction*, 128, 5-12.
- Kimura, T., Tomura, H.; Mogi, C., Kuwabara, A.; Damirin, A., Ishizuka, T., Sekiguchi, A., Ishiwaru, M., Im, D. S., Sato, K.; Murakami, M., Okajima, F. (2006) Role of scavenger receptor class B type I and sphingosine 1-phosphate receptors in high density lipoprotein-induced inhibition of adhesion molecule expression in endothelial cells. *J Biol Chem*, 281, 37457-37467.
- Klein S., Peters EJ., Shangraw RE., Wolfe RR. (1991) Lipolytic response to metabolic stress in critically ill patients. *Crit Care Med*, 19, 776-779.
- Kluin PM. and de Rooij DG. (1981) A comparison between the morphology and cell kinetics of gonocytes and adult type undifferentiated spermatogonia in the mouse. *Int J Androl*, 4, 475-493.

- Kocher O., Yesilaltay A., Cirovic C., Pal R, Rigotti A., Krieger M. (2003) Targeted disruption of the PDZK1 gene in mice causes tissue-specific depletion of the high density lipoprotein receptor scavenger receptor class B type I and altered lipoprotein metabolism. *J Biol Chem*, 278, 52820-52825.
- Komori H., Arai H., Kashima T., Huby T., Kita T., Ueda Y. (2008) Coexpression of CLA-1 and human PDZK1 in murine liver modulates HDL cholesterol metabolism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 28, 1298-1303.
- Kozarsky, K. F., Donahee, M. H., Rigotti, A., Iqbal, S. N., Edelman, E. R., Krieger, M. (1997) Overexpression of the HDL receptor SR-BI alters plasma HDL and bile cholesterol levels. *Nature*, 387, 414-417.
- Kraemer, F. B. (2007) Adrenal cholesterol utilization. *Mol Cell Endocrinol*, 265-266, 42-45.
- Kraemer, F. B., Patel, S., Saedi, M. S., Sztalryd, C. (1993) Detection of hormone-sensitive lipase in various tissues. I. Expression of an HSL/bacterial fusion protein and generation of anti-HSL antibodies. *J Lipid Res*, 34, 663-671.
- Kraemer, F. B. and Shen, W. J. (2002) Hormone-sensitive lipase: control of intracellular tri-(di)acylglycerol and cholesteryl ester hydrolysis. *J Lipid Res*, 43, 1585-1594.
- Kraemer, F. B. and Shen, W. J. (2006) Hormone-sensitive lipase knockouts. *Nutr Metab (Lond)*, 3, 12.
- Kraemer, F. B., Tavangar, K. and Hoffman, A. R. (1991) Developmental regulation of hormone-sensitive lipase mRNA in the rat: changes in steroidogenic tissues. *J Lipid Res*, 32, 1303-1310.
- Kraemer FB., Shen WJ., Harada K., Patel S., Osuga J., Ishibashi S., Azhar S. (2004) Hormone-Sensitive Lipase Is Required for High-Density Lipoprotein Cholesteryl Ester-Supported Adrenal Steroidogenesis. *Molecular Endocrinology*, 18, 549-557.
- Krutzfeldt, J. R., N., Braich, R., Rajeev, K. G., Tuschl, T., Manoharan, M.M, Stoffel, M. (2005) Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs'. *Nature*, 438, 685-689.
- Ladha, S. (1998) Lipid heterogeneity and membrane fluidity in a highly polarized cell, the mammalian spermatozoon. *J Membr Biol*, 165, 1-10.
- Lampidonis, A. D., Argyrokastritis, A., Stravopodis, D. J., Voutsinas, G. E., Ntouroupi, T. G., Margaritis, L. H., Bizelis, I. and Rogdakis, E. (2008) Cloning and functional characterization of the ovine Hormone Sensitive Lipase (HSL) full-length cDNAs: an integrated approach. *Gene*, 416, 30-43.
- Lampidonis, A. D., Rogdakis, E., Voutsinas, G. E. and Stravopodis, D. J. (2011) The resurgence of Hormone-Sensitive Lipase (HSL) in mammalian lipolysis. *Gene*.
- Landschulz, K. T., Pathak, R. K., Rigotti, A., Krieger, M. and Hobbs, H. H. (1996) Regulation of scavenger receptor, class B, type I, a high density lipoprotein receptor, in liver and steroidogenic tissues of the rat. *J Clin Invest*, 98, 984-995.
- Lange, Y., Echevarria, F. and Steck, T. L. (1991) Movement of zymosterol, a precursor of cholesterol, among three membranes in human fibroblasts. *Journal of Biological Chemistry*, 266, 21439-21443.
- Langin, D., Laurell, H., Holst, L. S., Belfrage, P. and Holm, C. (1993) Gene organization and primary structure of human hormone-sensitive lipase: possible significance of a sequence homology with a lipase of *Moraxella* TA144, an antarctic bacterium. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90, 4897-4901.
- Lauber ME., Kagawa N., Waterman MR., Simpson ER. (1993) cAMP-dependent and tissue-specific expression of genes encoding steroidogenic enzymes in bovine luteal and granulosa cells in primary culture. *Mol Cell Endocrinol*, 93, 227-233.
- Lazar, T. (2004) Lipid biochemistry: an introduction, 5th edn. M. Gurr, J. Harwood and K. Frayn, Blackwell Science, 320 pp, ISBN 0-6320-5409-3 (hardback) (2002)\par. In: *Cell Biochemistry and Function*, Vol. 22, pp. 399. - John Wiley & Sons, Ltd..

- Le, P. U., Guay, G., Altschuler, Y. and Nabi, I. R. (2002) Caveolin-1 is a negative regulator of caveolae-mediated endocytosis to the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*, 277, 3371-3379.
- Leat, W. M., Northrop, C. A., Harrison, F. A. and Cox, R. W. (1983) Effect of dietary linoleic and linolenic acids on testicular development in the rat. In: *Quarterly journal of experimental physiology (Cambridge, England)*, Vol. 68, pp. 221-231. ENGLAND.
- Leblond, C. P. and Clermont, Y. (1952) Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. *Ann N Y Acad Sci*, 55, 548-573.
- Lee, F. T., Adams, J. B., Garton, A. J., Yeaman, S. J. (1988) Hormone-sensitive lipase is involved in the hydrolysis of lipoidal derivatives of estrogens and other steroid hormones. *Biochim Biophys Acta*, 963, 258-264.
- Lee, F. Y., Lee, H., Hubbert, M. L., Edwards, P. A., Zhang, Y. (2006) FXR, a multipurpose nuclear receptor. *Trends Biochem Sci*, 31, 572-580.
- Lee, R. C., Feinbaum, R. L.; Ambros, V. (1993) The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 75, 843-854.
- Lenzi, A., Gandini, L., Maresca, V., Rago, R., Sgro, P., Dondero, F. and Picardo, M. (2000) Fatty acid composition of spermatozoa and immature germ cells. In: *Molecular human reproduction*, Vol. 6, pp. 226-231. ENGLAND
- Lepage, G., Levy, E., Ronco, N., Smith, L., Galéano, N., Roy, C. C. (1989) Direct transesterification of plasma fatty acids for the diagnosis of essential fatty acid deficiency in cystic fibrosis. *Journal of Lipid Research*, 30, 1483-1490.
- Lessig, J. and Fuchs, B. (2009) Plasmalogens in biological systems: their role in oxidative processes in biological membranes, their contribution to pathological processes and aging and plasmalogen analysis. *Curr Med Chem*, 16, 2021-2041.
- Levine, T. (2004) SSD: sterol-sensing direct. *Dev Cell*, 7, 152-153.
- Li, X. A., Titlow, W. B., Jackson, B. A., Giltiy, N., Nikolova-Karakashian, M., Uittenbogaard, A., Smart, E. J. (2002) High density lipoprotein binding to scavenger receptor, Class B, type I activates endothelial nitric-oxide synthase in a ceramide-dependent manner. *J Biol Chem*, 277, 11058-11063.
- Li, Z., Sumida, M., Birchbauer, A., Schotz, M. C., Reue, K. (1994) Isolation and characterization of the gene for mouse hormone-sensitive lipase. *Genomics*, 24, 259-265.
- Liadaki KN, Liu T, Xu S, Ishida BY, Duchateaux PN, Krieger JP, Kane J, Krieger M, Zannis VI. (2000) Binding of high density lipoprotein (HDL) and discoidal reconstituted HDL to the HDL receptor scavenger receptor class B type I. Effect of lipid association and APOA-I mutations on receptor binding. *J Biol Chem*, 275, 21262-21271.
- Lindenthal, B., Bertsch, T., Fassbender, K., Stroick, M., Kuhl, S., Lutjohann, D., von Bergmann, K. (2002) Influence of simvastatin, pravastatin, and BM 15.766 on neutral sterols in liver and testis of guinea pigs. *Metabolism*, 51, 492-499.
- Lindenthal B., Holleran AL., Aldaghtas TA., Ruan B., Schroepfer GJ. Jr, Wilson WK., Kelleher JK. (2001) Progestins block cholesterol synthesis to produce meiosis-activating sterols. *FASEB J*, 15, 775-784.
- Lisanti, M. P., Scherer, P. E., Vidugiriene, J., Tang, Z., Hermanowski-Vosatka, A., Tu, Y. H., Cook, R. F. and Sargiacomo, M. (1994) Characterization of caveolin-rich membrane domains isolated from an endothelial-rich source: implications for human disease. *J Cell Biol*, 126, 111-126.
- Liu, L. and Severson, D. L. (1995) Myocardial lipoprotein lipase activity: regulation by diabetes and fructose-induced hypertriglyceridemia. *Can J Physiol Pharmacol*, 73, 369-377.
- Liu, P., Ying, Y., Ko, Y. G., Anderson, R. G. (1996) Localization of platelet-derived growth factor-stimulated phosphorylation cascade to caveolae. *J Biol Chem*, 271, 10299-10303.
- Livera, G., Rouiller-Fabre, V., Durand, P., Habert, R. (2000) Multiple effects of retinoids on the development of Sertoli, germ, and Leydig cells of fetal and neonatal rat testis in culture. *Biol Reprod*, 62, 1303-1314.

- Lobo, M. V., Huerta, L., Arenas, M. I., Busto, R., Lasuncion, M. A., Martin-Hidalgo, A. (2009) Hormone-sensitive lipase expression and IHC localization in the rat ovary, oviduct, and uterus. *J Histochem Cytochem*, 57, 51-60.
- Londos, C., Brasaemle, D. L., Schultz, C. J., Adler-Wailes, D. C., Levin, D. M., Kimmel, A. R., Rondinone, C. M. (1999) On the control of lipolysis in adipocytes. *Ann N Y Acad Sci*, 892, 155-168.
- Londos, C., Honnor, R. C., Dhillon, G. S. (1985) cAMP-dependent protein kinase and lipolysis in rat adipocytes. III. Multiple modes of insulin regulation of lipolysis and regulation of insulin responses by adenylate cyclase regulators. *J Biol Chem*, 260, 15139-15145.
- Lufkin, T., Lohnes, D., Mark, M., Dierich, A., Gorry, P., Gaub, M. P., LeMeur, M., Chambon, P. (1993) High postnatal lethality and testis degeneration in retinoic acid receptor alpha mutant mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90, 7225-7229.
- Lund-Katz, S., Liu, L., Thuahnai, S. T., Phillips, M. C. (2003) High density lipoprotein structure. *Front Biosci*, 8, d1044-1054.
- MacDonald, M. L., Rogers, Q. R., Morris, J. G. and Cupps, P. T. (1984) Effects of linoleate and arachidonate deficiencies on reproduction and spermatogenesis in the cat. *J Nutr*, 114, 719-726.
- Mairal, A., Melaine, N., Laurell, H., Grober, J., Holst, L. S., Guillaudoux, T., Holm, C., Jegou, B., Langin, D. (2002) Characterization of a novel testicular form of human hormone-sensitive lipase. *Biochem Biophys Res Commun*, 291, 286-290.
- Majdalawieh, A., Ro, H. S. (2010) PPARgamma1 and LXRalpha face a new regulator of macrophage cholesterol homeostasis and inflammatory responsiveness, AEBP1. *Nucl Recept Signal*, 8, e004.
- Mankidy, R., Ahiahonu, P. W., Ma, H., Jayasinghe, D., Ritchie, S. A., Khan, M. A., Su-Myat, K. K., Wood, P. L., Goodenowe, D. B. (2010) Membrane plasmalogen composition and cellular cholesterol regulation: a structure activity study. *Lipids Health Dis*, 9, 62.
- Marin Bivens, C. L., Grondahl, C.; Murray, A.; Blume, T.; Su, Y. Q. Eppig, J. J. (2004) Meiosis-activating sterol promotes the metaphase I to metaphase II transition and preimplantation developmental competence of mouse oocytes maturing in vitro. *Biol Reprod*, 70, 1458-1464.
- Marquart TJ., Allen RM., Ory DS., Baldán A. (2010) miR-33 links SREBP-2 induction to repression of sterol transporters. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 12228-12232.
- Marsh, J. M. (1976) The Role of Cyclic AMP in Gonadal Steroidogenesis. *Biology of Reproduction*, 14, 30-53.
- Martin-Hidalgo, A., Holm, C., Belfrage, P., Schotz, M. C., Herrera, E. (1994) Lipoprotein lipase and hormone-sensitive lipase activity and mRNA in rat adipose tissue during pregnancy. *Am J Physiol*, 266, E930-935.
- Martin-Hidalgo, A., Huerta, L., Alvarez, N., Alegria, G., Del Val Toledo, M., Herrera, E. (2005) Expression, activity, and localization of hormone-sensitive lipase in rat mammary gland during pregnancy and lactation. *J Lipid Res*, 46, 658-668.
- Martín-Hidalgo, M. A., Ramos, P.; Herrera, E. (1996) Cambios en la actividad y la expresión (mRNA) de la lipoproteína lipasa y lipasa sensible a las hormonas en tejidos de ratas vírgenes y preñadas infundidas con glucosa., (Molecular ed.).
- Martinez-Botas, J., Suarez, Y., Ferruelo, A. J., Gomez-Coronado, D., Lasuncion, M. A. (1999) Cholesterol starvation decreases p34(cdc2) kinase activity and arrests the cell cycle at G2. *Faseb J*, 13, 1359-1370.
- Marzouki, Z. M. and Coniglio, J. G. (1982) Effect of essential fatty acid deficiency on lipids of rat Sertoli and germinal cells. *Biol Reprod*, 27, 312-315.
- Mascrez, B., Ghyselinck, N. B., Watanabe, M., Annicotte, J. S., Chambon, P., Auwerx, J., Mark, M. (2004) Ligand-dependent contribution of RXRbeta to cholesterol homeostasis in Sertoli cells. *EMBO Rep*, 5, 285-290.

- Mashima, T., Seimiya, H., Tsuruo, T. (2009) De novo fatty-acid synthesis and related pathways as molecular targets for cancer therapy. In: *British journal of cancer*, Vol. 100, pp. 1369-1372. England.
- Matsuzaka T., Shimano H., Yahagi N., Amemiya-Kudo M., Yoshikawa T., Hasty AH, Tamura Y., Osuga J., Okazaki H., Iizuka Y., Takahashi A., Sone H., Gotoda T., Ishibashi S., Yamada N. (2002) Dual regulation of mouse Delta(5)- and Delta(6)-desaturase gene expression by SREBP-1 and PPARalpha. In: *Journal of lipid research* Vol. 43, pp. 107-114 United States.
- Mauch, D. H., Nagler, K., Schumacher, S., Goritz, C., Muller, E. C., Otto, A., Pfrieder, F. W. (2001) CNS synaptogenesis promoted by glia-derived cholesterol. *Science*, 294, 1354-1357.
- McCarrey, J. (1993) Development of the germ cell. In: *Cell and molecular biology of the testis*, (E. L. Desjardins C., editors ed.), pp. 58-89. NY: Oxford University Press, New York.
- McKenna, T. J., Fearon, U., Clarke, D., Cunningham, S. K. (1997) A critical review of the origin and control of adrenal androgens. *Baillieres Clin Obstet Gynaecol*, 11, 229-248.
- Megha, Bakht, O., London, E. (2006) Cholesterol precursors stabilize ordinary and ceramide-rich ordered lipid domains (lipid rafts) to different degrees. Implications for the Bloch hypothesis and sterol biosynthesis disorders. *J Biol Chem*, 281, 21903-21913.
- Mellon SH, Vaudry H. (2001) Biosynthesis of neurosteroids and regulation of their synthesis. *Int Rev Neurobiol*, 46, 33-78.
- Meng, X., Lindahl, M., Hyvonen, M. E., Parvinen, M, de Rooij, D. G.; Hess, M. W.; Raatikainen-Ahokas, A.; Sainio, K.; Rauvala, H.; Lakso, M.; Pichel, J. G.; Westphal, H.; Saarma, M.; Sariola, H. (2000) Regulation of cell fate decision of undifferentiated spermatogonia by GDNF. *Science*, 287, 1489-1493.
- Miao, L., Nielsen, M., Thewalt, J., Ipsen, J. H., Bloom, M., Zuckermann, M. J. and Mouritsen, O. G. (2002) From Lanosterol to Cholesterol: Structural Evolution and Differential Effects on Lipid Bilayers. *Biophysical journal*, 82, 1429-1444.
- Miller, W. L. (2002) Androgen biosynthesis from cholesterol to DHEA. *Mol Cell Endocrinol*, 198, 7-14.
- Miller, W. L. (2008) Steroidogenic enzymes. *Endocr Dev*, 13, 1-18.
- Mineo, C., James, G. L., Smart, E. J., Anderson, R. G. (1996) Localization of epidermal growth factor-stimulated Ras/Raf-1 interaction to caveolae membrane. *J Biol Chem*, 271, 11930-11935.
- Mineo, C. and Shaul, P. W. (2003) HDL stimulation of endothelial nitric oxide synthase: a novel mechanism of HDL action. *Trends Cardiovasc Med*, 13, 226-231.
- Mineo, C. and Shaul, P. W. (2007) Role of high-density lipoprotein and scavenger receptor B type I in the promotion of endothelial repair. *Trends Cardiovasc Med*, 17, 156-161.
- Mineo, C., Yuhanna, I. S., Quon, M. J., Shaul, P. W. (2003) High density lipoprotein-induced endothelial nitric-oxide synthase activation is mediated by Akt and MAP kinases. *J Biol Chem*, 278, 9142-9149.
- Mohammed, B. S., Sankarappa, S., Geiger, M., Sprecher, H. (1995) Reevaluation of the pathway for the metabolism of 7,10,13, 16-docosatetraenoic acid to 4,7,10,13,16-docosapentaenoic acid in rat liver. In: *Archives of Biochemistry and Biophysics*, Vol. 317, pp. 179-184. UNITED STATES.
- Monesi, V. (1962) Autoradiographic study of DNA synthesis and the cell cycle in spermatogonia and spermatocytes of mouse testis using tritiated thymidine. *The Journal of Cell Biology*, 14, 1-18.
- Monier S., Parton RG., Vogel F., Behlke J., Henske A., Kurzchalia TV. (1995) VIP21-caveolin, a membrane protein constituent of the caveolar coat, oligomerizes in vivo and in vitro. *Mol Biol Cell*, 6, 911-927.
- Moore CC., and Miller WL. (1991) The role of transcriptional regulation in steroid hormone biosynthesis. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 40, 517-525.

- Mori, M. and Marsh, J. M. (1982) The site of luteinizing hormone stimulation of steroidogenesis in mitochondria of the rat corpus luteum. *J Biol Chem*, 257, 6178-6183.
- Morimoto, H., Kanatsu-Shinohara, M., Takashima, S., Chuma, S., Nakatsuji, N., Takehashi, M., Shinohara, T. (2009) Phenotypic plasticity of mouse spermatogonial stem cells. *PLoS One*, 4, e7909.
- Morita, K.; Sasaki, H.; Furuse, M.; Tsukita, S. (1999) Endothelial claudin: claudin-5/TMVCF constitutes tight junction strands in endothelial cells. *J Cell Biol*, 147, 185-194.
- Mouritsen, O. G. and Jorgensen, K. (1994) Dynamical order and disorder in lipid bilayers. *Chem Phys Lipids*, 73, 3-25.
- Mouritsen, O. G. and Jorgensen, K. (1998) A new look at lipid-membrane structure in relation to drug research. *Pharm Res*, 15, 1507-1519.
- Mouritsen, O. G. and Zuckermann, M. J. (2004) What's so special about cholesterol? *Lipids*, 39, 1101-1113.
- Mruk, D. D. and Cheng, C. Y. (2004) Sertoli-Sertoli and Sertoli-germ cell interactions and their significance in germ cell movement in the seminiferous epithelium during spermatogenesis. *Endocr Rev*, 25, 747-806.
- Munn, N. J., Arnio, E., Liu, D., Zoeller, R. A. and Liscum, L. (2003) Deficiency in ethanolamine plasmalogen leads to altered cholesterol transport. *J Lipid Res*, 44, 182-192.
- Munro, S. (2003) Lipid rafts: elusive or illusive? *Cell*, 115, 377-388.
- Murao K., Terpstra V., Green SR., Kondratenko N., Steinberg D., Quehenberger O. (1997) Characterization of CLA-1, a Human Homologue of Rodent Scavenger Receptor BI, as a Receptor for High Density Lipoprotein and Apoptotic Thymocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 272, 17551-17557.
- Murata, M., Peranen, J., Schreiner, R., Wieland, F., Kurzchalia, T. V., Simons, K. (1995) VIP21/caveolin is a cholesterol-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 10339-10343.
- Najafi-Shoushtari SH., Kristo F., Li Y., Shioda T., Cohen DE., Gerszten RE., Näär AM. (2010) MicroRNA-33 and the SREBP host genes cooperate to control cholesterol homeostasis. *Science*, 328, 1566-1569.
- Nakamura, M. T. and Nara, T. Y. (2004) Structure, function, and dietary regulation of delta6, delta5, and delta9 desaturases. *Annu Rev Nutr*, 24, 345-376.
- Nilsson, S., Holm, C. and Belfrage, P. (1989) Rapid purification of detergent-solubilized bovine hormone-sensitive lipase by high performance hydrophobic interaction chromatography. *Biomed Chromatogr*, 3, 82-87.
- Ntambi, J. M. (1999) Regulation of stearoyl-CoA desaturase by polyunsaturated fatty acids and cholesterol. In: *Journal of lipid research*, Vol. 40, pp. 1549-1558. UNITED STATES
- Oakberg, E. F. (1956) A description of spermiogenesis in the mouse and its use in analysis of the cycle of the seminiferous epithelium and germ cell renewal. *Am J Anat*, 99, 391-413.
- Oakberg, E. F. (1971) Spermatogonial stem-cell renewal in the mouse. *Anat Rec*, 169, 515-531.
- Oatley JM, Avarbock MR, Brinster RL. (2007) Glial cell line-derived neurotrophic factor regulation of genes essential for self-renewal of mouse spermatogonial stem cells is dependent on SRC family kinase signaling. *J.Biol.Chem.*, 282, 842-851.
- Ohgami N, Nagai R, Miyazaki A, Ikemoto M, Arai H, Horiuchi S, Nakayama H (2001) Scavenger Receptor Class B Type I-mediated Reverse Cholesterol Transport Is Inhibited by Advanced Glycation End Products. *Journal of Biological Chemistry*, 276, 13348-13355.
- Ohvo-Rekila, H., Ramstedt, B., Leppimäki, P., Slotte, J. P. (2002) Cholesterol interactions with phospholipids in membranes. *Prog Lipid Res*, 41, 66-97.
- Okajima F, Sato K, Kimura T. (2009) Anti-atherogenic Actions of High-density Lipoprotein through Sphingosine 1-Phosphate Receptors and Scavenger Receptor Class B Type I. *Endocrine Journal*, 56, 317-334.

- Okazaki H, Igarashi M, Nishi M, Tajima M, Sekiya M, Okazaki S, Yahagi N, Ohashi K, Tsukamoto K, Amemiya-Kudo M, Matsuzaka T, Shimano H, Yamada N, Aoki J, Morikawa R, Takanezawa Y, Arai H, Nagai R, Kadowaki T, Osuga J, Ishibashi S. (2006) Identification of a novel member of the carboxylesterase family that hydrolyzes triacylglycerol: a potential role in adipocyte lipolysis. *Diabetes*, 55, 2091-2097.
- Olsson, H. and Belfrage, P. (1987) The regulatory and basal phosphorylation sites of hormone-sensitive lipase are dephosphorylated by protein phosphatase-1, 2A and 2C but not by protein phosphatase-2B. *Eur J Biochem*, 168, 399-405.
- Ollila, S., Hyvonen, M. T., Vattulainen, I. (2007) Polyunsaturation in lipid membranes: dynamic properties and lateral pressure profiles. *J Phys Chem B*, 111, 3139-3150.
- Ortega, S., Prieto, I., Odajima, J., Martin, A., Dubus, P., Sotillo, R., Barbero, J. L., Malumbres, M. and Barbacid, M. (2003) Cyclin-dependent kinase 2 is essential for meiosis but not for mitotic cell division in mice. *Nat Genet*, 35, 25-31.
- Ory, D. S. (2004) Nuclear receptor signaling in the control of cholesterol homeostasis: have the orphans found a home? *Circ Res*, 95, 660-670.
- Osada, Y., Sunatani, T., Kim, I. S., Nakanishi, Y. and Shiratsuchi, A. (2009) Signalling pathway involving GULP, MAPK and Rac1 for SR-BI-induced phagocytosis of apoptotic cells. *J Biochem*, 145, 387-394.
- Osterlund, T., Beussman, D. J., Julenius, K. et al. (1999) Domain identification of hormone-sensitive lipase by circular dichroism and fluorescence spectroscopy, limited proteolysis, and mass spectrometry. *J Biol Chem*, 274, 15382-15388.
- Osterlund, T., Contreras, J. A. and Holm, C. (1997) Identification of essential aspartic acid and histidine residues of hormone-sensitive lipase: apparent residues of the catalytic triad. *FEBS Lett*, 403, 259-262.
- Osterlund, T., Danielsson, B., Degerman, E., Contreras, J. A., Edgren, G., Davis, R. C., Schotz, M. C., Holm, C. (1996) Domain-structure analysis of recombinant rat hormone-sensitive lipase. *Biochem J*, 319 (Pt 2), 411-420.
- Osuga J, Ishibashi S, Oka T, Yagyu H, Tozawa R, Fujimoto A, Shionoiri F, Yahagi N, Kraemer FB, Tsutsumi O, Yamada N. (2000) Targeted disruption of hormone-sensitive lipase results in male sterility and adipocyte hypertrophy, but not in obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 787-792.
- Owicki JC., McConnell HM. (1980) Lateral diffusion in inhomogeneous membranes. Model membranes containing cholesterol. *Biophys J*, 30, 383-397.
- Parker KL. and Schimmer BP. (1995) Transcriptional regulation of the genes encoding the cytochrome P-450 steroid hydroxylases. *Vitam Horm*, 51, 339-370.
- Parks, J. E. and Hammerstedt, R. H. (1985) Development changes occurring in the lipids of ram epididymal spermatozoa plasma membrane. *Biol Reprod*, 32, 653-668.
- Patel, H. H. and Insel, P. A. (2009) Lipid Rafts and Caveolae and Their Role in Compartmentation of Redox Signaling. *Antioxidants & Redox Signaling*, 11, 1357-1372.
- Paton CM. and Ntambi JM. (2009) Biochemical and physiological function of stearoyl-CoA desaturase. In: *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, Vol. 297, pp. E28-37. United States.
- Patten, R. L. (1970) The Reciprocal Regulation of Lipoprotein Lipase Activity and Hormone-sensitive Lipase Activity in Rat Adipocytes *Journal of Biological Chemistry* 245 5577-5584
- Pawar, A. and Jump, D. B. (2003) Unsaturated fatty acid regulation of peroxisome proliferator-activated receptor alpha activity in rat primary hepatocytes. In: *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 278, pp. 35931-35939.
- Pawar, A., Xu, J., Jerks, E., Mangelsdorf, D. J., Jump, D. B. (2002) Fatty acid regulation of liver X receptors (LXR) and peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) in HEK293 cells In: *Journal of Biological Chemistry* Vol. 277 pp. 39243-39250.

- Payne AH. and Hales DB. (2004) Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol to active steroid hormones. *Endocr Rev*, 25, 947-970.
- Payne AH and Youngblood GL. (1995) Regulation of expression of steroidogenic enzymes in Leydig cells. *Biol Reprod*, 52, 217-225.
- Peet DJ, Janowski BA, Mangelsdorf DJ. (1998) The LXRs: a new class of oxysterol receptors. *Curr Opin Genet Dev*, 8, 571-575.
- Peluffo, R. O., Ayala, S., Brenner, R. R. (1970) Metabolism of fatty acids of the linoleic acid series in testicles of diabetic rats. *Am J Physiol*, 218, 669-673.
- Pelletier, R. M. and Friend, D. S. (1983) Development of membrane differentiations in the guinea pig spermatid during spermiogenesis. *Am J Anat*, 167, 119-141.
- Pfriege, F. W. (2003) Cholesterol homeostasis and function in neurons of the central nervous system. *Cell Mol Life Sci*, 60, 1158-1171.
- Phillips BT., Gassei K., Orwig KE. (2010) Spermatogonial stem cell regulation and spermatogenesis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 365, 1663-1678.
- Pike, L. J. (2003) Lipid rafts: bringing order to chaos. *J Lipid Res*, 44, 655-667.
- Pike, L. J. (2004) Lipid rafts: heterogeneity on the high seas. *Biochem J*, 378, 281-292.
- Pike, L. J. (2006) Rafts defined: a report on the Keystone Symposium on Lipid Rafts and Cell Function. *J Lipid Res*, 47, 1597-1598.
- Pike, L. J., Han, X., Chung, K. N., Gross, R. W. (2002) Lipid rafts are enriched in arachidonic acid and plasmenylethanolamine and their composition is independent of caveolin-1 expression: a quantitative electrospray ionization/mass spectrometric analysis. *Biochemistry*, 41, 2075-2088.
- Pikuleva, I. A. (2006) Cholesterol-metabolizing cytochromes P450. *Drug Metab Dispos*, 34, 513-520.
- Pilon A, Briand O, Lestavel S, Copin C, Majd Z, Fruchart JC, Castro G, Clavey V. (2000) Apolipoprotein AII Enrichment of HDL Enhances Their Affinity for Class B Type I Scavenger Receptor but Inhibits Specific Cholesteryl Ester Uptake. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 20, 1074-1081.
- Pownall, H. J. (2006) Detergent-mediated phospholipidation of plasma lipoproteins increases HDL cholesterophilicity and cholesterol efflux via SR-BI. *Biochemistry*, 45, 11514-11522.
- Prinetti, A., Chigorno, V., Tettamanti, G. and Sonnino, S. (2000) Sphingolipid-enriched membrane domains from rat cerebellar granule cells differentiated in culture. A compositional study. *J Biol Chem*, 275, 11658-11665.
- Privalle CT, Crivello JF, Jefcoate CR. (1983) Regulation of intramitochondrial cholesterol transfer to side-chain cleavage cytochrome P-450 in rat adrenal gland. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 80, 702-706.
- Raclot, T., Holm, C., Langin, D. (2001) A role for hormone-sensitive lipase in the selective mobilization of adipose tissue fatty acids. *Biochim Biophys Acta*, 1532, 88-96.
- Radhakrishnan, A., Sun, L. P., Kwon, H. J., Brown, M. S., Goldstein, J. L. (2004) Direct binding of cholesterol to the purified membrane region of SCAP: mechanism for a sterol-sensing domain. *Mol Cell*, 15, 259-268.
- Rana, A. P., Majumder, G. C., Misra, S., Ghosh, A. (1991) Lipid changes of goat sperm plasma membrane during epididymal maturation. *Biochim Biophys Acta*, 1061, 185-196.
- Ratnayake, W. M. and Galli, C. (2009) Fat and fatty acid terminology, methods of analysis and fat digestion and metabolism: a background review paper. In: *Annals of Nutrition & Metabolism*, Vol. 55, pp. 8-43. Switzerland.
- Rayner KJ, Suárez Y, Dávalos A, Parathath S, Fitzgerald ML, Tamehiro N, Fisher EA, Moore KJ, Fernández-Hernando C. (2010) MiR-33 contributes to the regulation of cholesterol homeostasis. *Science*, 328, 1570-1573.

- Reaven, E., Zhan, L., Nomoto, A., Leers-Sucheta, S., Azhar, S. (2000) Expression and microvillar localization of scavenger receptor class B, type I (SR-BI) and selective cholesteryl ester uptake in Leydig cells from rat testis. *J Lipid Res*, 41, 343-356.
- Retterstol, K., Haugen, T. B., Christophersen, B. O. (2000) The pathway from arachidonic to docosapentaenoic acid (20:4n-6 to 22:5n-6) and from eicosapentaenoic to docosahexaenoic acid (20:5n-3 to 22:6n-3) studied in testicular cells from immature rats. *Biochim Biophys Acta*, 1483, 119-131.
- Retterstol, K., Haugen, T. B., Tran, T. N., Christophersen, B. O. (2001) Studies on the metabolism of essential fatty acids in isolated human testicular cells. In: *Reproduction (Cambridge, England)* Vol. 121, pp. 881-887. England
- Rhainds, D., Bourgeois, P., Bourret, G., Huard, K., Falstraalt, L. and Brissette, L. (2004) Localization and regulation of SR-BI in membrane rafts of HepG2 cells. *J Cell Sci*, 117, 3095-3105.
- Rigotti, A., Edelman, E. R., Seifert, P., Iqbal, S. N., DeMattos, R. B., Temel, R. E., Krieger, M., Williams, D. L. (1996) Regulation by adrenocorticotrophic hormone of the in vivo expression of scavenger receptor class B type I (SR-BI), a high density lipoprotein receptor, in steroidogenic cells of the murine adrenal gland. *J Biol Chem*, 271, 33545-33549.
- Rigotti, A., Miettinen, H. E., Krieger, M. (2003) The role of the high-density lipoprotein receptor SR-BI in the lipid metabolism of endocrine and other tissues. *Endocr Rev*, 24, 357-387.
- Rigotti, A., Trigatti, B. L., Penman, M., Rayburn, H., Herz, J. and Krieger, M. (1997) A targeted mutation in the murine gene encoding the high density lipoprotein (HDL) receptor scavenger receptor class B type I reveals its key role in HDL metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94, 12610-12615.
- Rodriguez, C. G.-D., M.; Badimon, L., Martinez-Gonzalez, J. (2009) Sphingosine-1-phosphate: A bioactive lipid that confers high-density lipoprotein with vasculoprotection mediated by nitric oxide and prostacyclin. *Thromb Haemost*, 101, 665-673.
- Roosen-Runge, E. C. G., L. O., Jr. (1950) Quantitative studies on spermatogenesis in the albino rat. *Am J Anat*, 87, 1-30.
- Ross. A. W. and Pawlina, M. H. (2006) *Histology, A Text and Atlas* Williams and Wilkins
- Rosenberg, M. P., Aversa, C. R., Wallace, R. and Propst, F. (1995) Expression of the v-Mos oncogene in male meiotic germ cells of transgenic mice results in metaphase arrest. *Cell Growth Differ*, 6, 325-336.
- Rothberg, K. G., Heuser, J. E., Donzell, W. C., Ying, Y. S., Glenney, J. R. and Anderson, R. G. (1992) Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. *Cell*, 68, 673-682.
- Rozman, D. S., M.; Cotman, M.; Fink, M. (2005) Pre-cholesterol precursors in gametogenesis. *Mol Cell Endocrinol*, 234, 47-56.
- Ruwanpura SM, McLachlan RI, Meachem SJ. (2010) Hormonal regulation of male germ cell development. *J Endocrinol*, 205, 117-131.
- Saddar, S. Mineo, C.; Shaul, P. W. (2010) Signaling by the high-affinity HDL receptor scavenger receptor B type I. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 30, 144-150.
- Saether, T., Tran, T. N., Rootwelt, H., Christophersen, B. O. and Haugen, T. B. (2003) Expression and regulation of delta5-desaturase, delta6-desaturase, stearoyl-coenzyme A (CoA) desaturase 1, and stearoyl-CoA desaturase 2 in rat testis. In: *Biology of reproduction* Vol. 69, pp. 117-124. United States.
- Saether, T., Tran, T. N., Rootwelt, H., Grav, H. J., Christophersen, B. O., Haugen, T. B. (2007) Essential fatty acid deficiency induces fatty acid desaturase expression in rat epididymis, but not in testis. In: *Reproduction (Cambridge, England)* Vol. 133, pp. 467-477 England.
- Saez Lancellotti, T. E., Boarelli, P. V., Monclus, M. A. et al. (2010) Hypercholesterolemia impaired sperm functionality in rabbits. *PLoS One*, 5, e13457.

- Sakai, J., Nohturfft, A., Cheng, D., Ho, Y. K., Brown, M. S. and Goldstein, J. L. (1997) Identification of complexes between the COOH-terminal domains of sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs) and SREBP cleavage-activating protein. *J Biol Chem*, 272, 20213-20221.
- Sanborn BM., Heindel JJ., Robison GA. (1980) The role of cyclic nucleotides in reproductive processes. *Annu Rev Physiol*, 42, 37-57.
- Sanchez-Martin, C. C., Davalos, A., Martin-Sanchez, C., de la Pena, G., Fernandez-Hernando, C. and Lasuncion, M. A. (2007) Cholesterol starvation induces differentiation of human leukemia HL-60 cells. *Cancer Res*, 67, 3379-3386.
- Sanchez-Wandelmer, J. D., A., Herrera, E., Giera, M.;Cano, S.; de la Pena, G., Lasuncion, M. A., Busto, R. (2009) Inhibition of cholesterol biosynthesis disrupts lipid raft/caveolae and affects insulin receptor activation in 3T3-L1 preadipocytes. *Biochim Biophys Acta*, 1788, 1731-1739.
- Sanderson, J. T. (2006) The Steroid Hormone Biosynthesis Pathway as a Target for Endocrine-Disrupting Chemicals. *Toxicological Sciences*, 94, 3-21.
- Sandhoff R, Geyer R, Jennemann R, Paret C, Kiss E, Yamashita T, Gorgas K, Sijmonsma TP, Iwamori M, Finaz C, Proia RL, Wiegandt H, Gröne HJ. (2005) Novel class of glycosphingolipids involved in male fertility\par. In: *The Journal of biological chemistry*, Vol. 280, pp. 27310-27318. United States.
- Sargiacomo, M., Sudol, M., Tang, Z., Lisanti, M. P. (1993) Signal transducing molecules and glycosyl-phosphatidylinositol-linked proteins form a caveolin-rich insoluble complex in MDCK cells. *J Cell Biol*, 122, 789-807.
- Sattler K. and Levkau B. (2009) Sphingosine-1-phosphate as a mediator of high-density lipoprotein effects in cardiovascular protection. *Cardiovasc Res*, 82, 201-211.
- Schwencke C, Braun-Dullaeus RC, Wunderlich C, Strasser RH. (2006) Caveolae and caveolin in transmembrane signaling: Implications for human disease. *Cardiovasc Res*, 70, 42-49.
- Seetharam D, Mineo C, Gormley AK, Gibson LL, Vongpatanasin W, Chambliss KL, Hahner LD, Cummings ML, Kitchens RL, Marcel YL, Rader DJ, Shaul PW. (2006) High-density lipoprotein promotes endothelial cell migration and reendothelialization via scavenger receptor-B type I. *Circ Res*, 98, 63-72.
- Sekiya M, Osuga J, Yahagi N, Okazaki H, Tamura Y, Igarashi M, Takase S, Harada K, Okazaki S, Iizuka Y, Ohashi K, Yagyu H, Okazaki M, Gotoda T, Nagai R, Kadowaki T, Shimano H, Yamada N, Ishibashi S. (2008) Hormone-sensitive lipase is involved in hepatic cholesteryl ester hydrolysis. *J Lipid Res*, 49, 1829-1838.
- Seo JB, Moon HM, Kim WS, Lee YS, Jeong HW, Yoo EJ, Ham J, Kang H, Park MG, Steffensen KR, Stulnig TM, Gustafsson JA, Park SD, Kim JB. (2004) Activated liver X receptors stimulate adipocyte differentiation through induction of peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression. *Mol Cell Biol*, 24, 3430-3444.
- Shen, W. J., Patel, S., Hong, R., Kraemer, F. B. (2000) Hormone-sensitive lipase functions as an oligomer. *Biochemistry*, 39, 2392-2398.
- Shepherd, R. E., Noble, E. G., Klug, G. A., Gollnick, P. D. (1981) Lipolysis and cAMP accumulation in adipocytes in response to physical training. *J Appl Physiol*, 50, 143-148.
- Sheriff, D. S. p. (1980) Influence of hormones on testicular lipids of adult rats. In: *Hormone research*, Vol. 13, pp. 165-173. SWITZERLAND.
- Shibata, H., Robinson, F. W., Soderling, T. R., Kono, T. (1991) Effects of okadaic acid on insulin-sensitive cAMP phosphodiesterase in rat adipocytes. Evidence that insulin may stimulate the enzyme by phosphorylation. *J Biol Chem*, 266, 17948-17953.
- Silver, D. L. (2002) A Carboxyl-terminal PDZ-interacting Domain of Scavenger Receptor B, Type I Is Essential for Cell Surface Expression in Liver. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 34042-34047.

- Simoni, M., Gromoll, J., Nieschlag, E. (1997) The follicle-stimulating hormone receptor: biochemistry, molecular biology, physiology, and pathophysiology. *Endocr Rev*, 18, 739-773.
- Simons, K. and Ikonen, E. (2000) How Cells Handle Cholesterol. *Science*, 290, 1721-1726.
- Simons, K. Ikonen, E. (1997) Functional rafts in cell membranes. *Nature*, 387, 569-572.
- Simpson, E. R., McCarthy, J. L.; Peterson, J. A. (1978) Evidence that the cycloheximide-sensitive site of adrenocorticotrophic hormone action is in the mitochondrion. Changes in pregnenolone formation, cholesterol content, and the electron paramagnetic resonance spectra of cytochrome P-450. *Journal of Biological Chemistry*, 253, 3135-3139.
- Simpson ER, Waterman MR. (1983) Regulation by ACTH of steroid hormone biosynthesis in the adrenal cortex. *Can J Biochem Cell Biol*, 61, 692-707.
- Simpson, E. R. Waterman, M. R. (1988) Regulation of the synthesis of steroidogenic enzymes in adrenal cortical cells by ACTH. *Annu Rev Physiol*, 50, 427-440.
- Singer, S. J. and Nicolson, G. L. (1972) The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*, 175, 720-731.
- Skinner, M. K., McLachlan, R. I., Bremner, W. J. (1989) Stimulation of Sertoli cell inhibin secretion by the testicular paracrine factor PModS. *Mol Cell Endocrinol*, 66, 239-249.
- Skinner, M. K., Norton, J. N., Mullaney, B. P., Rosselli, M., Whaley, P. D. and Anthony, C. T. (1991) Cell-cell interactions and the regulation of testis function. *Ann N Y Acad Sci*, 637, 354-363.
- Sluka, P., O'Donnell, L., Bartles, J. R., Stanton, P. G. (2006) FSH regulates the formation of adherens junctions and ectoplasmic specialisations between rat Sertoli cells in vitro and in vivo. *J Endocrinol*, 189, 381-395.
- Small, C. A., Garton, A. J., Yeaman, S. J. (1989) The presence and role of hormone-sensitive lipase in heart muscle. *Biochem J*, 258, 67-72.
- Smart, E. J., Graf, G. A., McNiven, M. A., Sessa, W. C., Engelman, J. A., Scherer, P. E., Okamoto, T., Lisanti, M. P. (1999) Caveolins, liquid-ordered domains, and signal transduction. *Mol Cell Biol*, 19, 7289-7304.
- Smith, A. J., Thompson, B. R., Sanders, M. A. and Bernlohr, D. A. (2007) Interaction of the adipocyte fatty acid-binding protein with the hormone-sensitive lipase: regulation by fatty acids and phosphorylation. *J Biol Chem*, 282, 32424-32432.
- Smith, C. J., Vasta, V., Degerman, E., Belfrage, P., Manganiello, V. C. (1991) Hormone-sensitive cyclic GMP-inhibited cyclic AMP phosphodiesterase in rat adipocytes. Regulation of insulin- and cAMP-dependent activation by phosphorylation. *J Biol Chem*, 266, 13385-13390.
- Smith LM, Rubenstein JL, Parce JW, McConnell HM. (1980) Lateral diffusion of M-13 coat protein in mixtures of phosphatidylcholine and cholesterol. *Biochemistry*, 19, 5907-5911.
- Song, B. L., Javitt, N. B., DeBose-Boyd, R. A. (2005) Insig-mediated degradation of HMG CoA reductase stimulated by lanosterol, an intermediate in the synthesis of cholesterol. *Cell Metab*, 1, 179-189.
- Song, K. S., Li, S., Okamoto, T., Quilliam, L. A., Sargiacomo, M., Lisanti, M. P. (1996) Co-purification and direct interaction of Ras with caveolin, an integral membrane protein of caveolae microdomains. Detergent-free purification of caveolae microdomains. *J Biol Chem*, 271, 9690-9697.
- Souza SC., Muliro KV., Liscum L., Lien P., Yamamoto MT., Schaffer JE., Dallal GE., Wang X., Kraemer FB., Obin M., Greenberg AS. (2002) Modulation of hormone-sensitive lipase and protein kinase A-mediated lipolysis by perilipin A in an adenoviral reconstituted system. *J Biol Chem*, 277, 8267-8272.
- Steinberg, D. and Khoo, J. C. (1977) Hormone-sensitive lipase of adipose tissue. *Fed Proc*, 36, 1986-1990.
- Stocco, D. M. and Clark, B. J. (1996) Regulation of the acute production of steroids in steroidogenic cells. *Endocr Rev*, 17, 221-244.

- Stocco, D. M., Wang, X., Jo, Y., Manna, P. R. (2005) Multiple signaling pathways regulating steroidogenesis and steroidogenic acute regulatory protein expression: more complicated than we thought. In: *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, Vol. 19, pp. 2647-2659 United States
- Stoffel W, Holz B, Jenke B, Binczek E, Günter RH, Kiss C, Karakesisoglou I, Thevis M, Weber AA, Arnhold S, Addicks K. (2008) Delta6-desaturase (FADS2) deficiency unveils the role of omega3- and omega6-polyunsaturated fatty acids. In: *The EMBO journal*, Vol. 27, pp. 2281-2292. England.
- Stralfors, P. (1987) Isoproterenol and insulin control the cellular localization of ATP citrate-lyase through its phosphorylation in adipocytes. *J Biol Chem*, 262, 11486-11489.
- Stralfors, P., Bjorgell, P., Belfrage, P. (1984) Hormonal regulation of hormone-sensitive lipase in intact adipocytes: identification of phosphorylated sites and effects on the phosphorylation by lipolytic hormones and insulin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 81, 3317-3321.
- Stralfors, P. and Honnor, R. C. (1989) Insulin-induced dephosphorylation of hormone-sensitive lipase. Correlation with lipolysis and cAMP-dependent protein kinase activity. *Eur J Biochem*, 182, 379-385.
- Strauss, J. F., 3rd, Golos, T. G., Silavin, S. L.; Soto, E. A., Takagi, K. (1988) Involvement of cyclic AMP in the functions of granulosa and luteal cells: regulation of steroidogenesis. *Prog Clin Biol Res*, 267, 177-200.
- Strauss, J. F., 3rd; Martinez, F., Kiriakidou, M. (1996) Placental steroid hormone synthesis: unique features and unanswered questions. *Biol Reprod*, 54, 303-311.
- Strom, K., Hansson, O., Lucas, S. et al. (2008) Attainment of brown adipocyte features in white adipocytes of hormone-sensitive lipase null mice. *PLoS One*, 3, e1793.
- Stromstedt, M. W., M. R.; Haugen, T. B., Tasken, K., Parvinen, M., Rozman, D. (1998) Elevated expression of lanosterol 14alpha-demethylase (CYP51) and the synthesis of oocyte meiosis-activating sterols in postmeiotic germ cells of male rats. *Endocrinology*, 139, 2314-2321.
- Stroud CK, Nara TY, Roqueta-Rivera M, Radlowski EC, Lawrence P, Zhang Y, Cho BH, Segre M, Hess RA, Brenna JT, Haschek WM, Nakamura MT. (2009) Disruption of FADS2 gene in mice impairs male reproduction and causes dermal and intestinal ulceration. *J Lipid Res*, 50, 1870-1880.
- Su, C. L., Sztalryd, C., Contreras, J. A., Holm, C., Kimmel, A. R., Londos, C. (2003) Mutational analysis of the hormone-sensitive lipase translocation reaction in adipocytes. *J Biol Chem*, 278, 43615-43619.
- Suarez, Y., Fernandez, C., Ledo, B., Martin, M., Gomez-Coronado, D., Lasuncion, M. A. (2005) Sterol stringency of proliferation and cell cycle progression in human cells. *Biochim Biophys Acta*, 1734, 203-213.
- Sugraroek, P., Kates, M., Leader, A., Tanphaichitr, N. (1991) Levels of cholesterol and phospholipids in freshly ejaculated sperm and Percoll-gradient-pelleted sperm from fertile and unexplained infertile men. *Fertil Steril*, 55, 820-827.
- Sztrolovics, R., Wang, S. P., Lapierre, P., Chen, H. S., Robert, M. F., Mitchell, G. A. (1997) Hormone-sensitive lipase (Lipe): sequence analysis of the 129Sv mouse Lipe gene. *Mamm Genome*, 8, 86-89.
- Tabas, I. (2002) Consequences of cellular cholesterol accumulation: basic concepts and physiological implications. *J Clin Invest*, 110, 905-911.
- Tansey, J. T., Huml, A. M., Vogt, R., Davis, K. E., Jones, J. M., Fraser, K. A., Brasaemle, D. L., Kimmel, A. R., Londos, C. (2003) Functional studies on native and mutated forms of perilipins. A role in protein kinase A-mediated lipolysis of triacylglycerols. *J Biol Chem*, 278, 8401-8406.
- Tegelenbosch, R. A. de Rooij, D. G. (1993) A quantitative study of spermatogonial multiplication and stem cell renewal in the C3H/101 F1 hybrid mouse. *Mutat Res*, 290, 193-200.

- Thai, T. P., Rodemer, C., Jauch, A., Hunziker, A., Moser, A., Gorgas, K., Just, W. W. (2001) Impaired membrane traffic in defective ether lipid biosynthesis. *Hum Mol Genet*, 10, 127-136.
- Thorn, H., Stenkula, K. G., Karlsson, M., Ortegren, U., Nystrom, F. H., Gustavsson, J. and Stralfors, P. (2003) Cell surface orifices of caveolae and localization of caveolin to the necks of caveolae in adipocytes. *Mol Biol Cell*, 14, 3967-3976.
- Thuahnai, S. T. Lund-Katz, S., Dhanasekaran, P., de la Llera-Moya, M., Connelly, M. A., Williams, D. L., Rothblat, G. H., Phillips, M. C. (2004) Scavenger receptor class B type I-mediated cholesteryl ester-selective uptake and efflux of unesterified cholesterol. Influence of high density lipoprotein size and structure. *J Biol Chem*, 279, 12448-12455.
- Tilbrook AJ, Clarke IJ. (2001) Negative feedback regulation of the secretion and actions of gonadotropin-releasing hormone in males. *Biol Reprod*, 64, 735-742.
- Toaff ME, Strauss JF 3rd, Flickinger GL, Shattil SJ. (1979) Relationship of cholesterol supply to luteal mitochondrial steroid synthesis. *J Biol Chem*, 254, 3977-3982.
- Töhönen V., Ritzén EM, Nordqvist K, Wedell A (2003) Male sex determination and prenatal differentiation of the testis. *Endocr Dev*, 5, 1-23.
- Tontonoz P and Mangelsdorf DJ. (2003) Liver X receptor signaling pathways in cardiovascular disease. *Mol Endocrinol*, 17, 985-993.
- Tornqvist, H. and Belfrage, P. (1976) Purification and some properties of a monoacylglycerol-hydrolyzing enzyme of rat adipose tissue. *J Biol Chem*, 251, 813-819.
- Tsutsui, K. (2008) Progesterone Biosynthesis and Action in the Developing Neuron. *Endocrinology*, 149, 2757-2761.
- Tung PS, Skinner MK, Fritz IB. (1984) Cooperativity between Sertoli Cells and Peritubular Myoid Cells in the Formation of the Basal Lamina in the Seminiferous Tubule. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 438, 435-446.
- Uittenbogaard, A. S., Philip W., Yuhanna, Ivan S., Blair, Alison, Smart, Eric J. (2000) High Density Lipoprotein Prevents Oxidized Low Density Lipoprotein-induced Inhibition of Endothelial Nitric-oxide Synthase Localization and Activation in Caveolae. *Journal of Biological Chemistry*, 275, 11278-11283.
- Vainio, S., Jansen, M., Koivusalo, M., Róg, T., Karttunen, M., Vattulainen, I. and Ikonen, E. (2006) Significance of Sterol Structural Specificity. *Journal of Biological Chemistry*, 281, 348-355.
- Vallet-Erdtmann, V., Tavernier, G., Contreras, J. A., Mairal, A., Rieu, C., Touzalin, A. M., Holm, C., Jegou, B., Langin, D. (2004) The testicular form of hormone-sensitive lipase HSLtes confers rescue of male infertility in HSL-deficient mice. *J Biol Chem*, 279, 42875-42880.
- van Berkel TJ, Out R, Hoekstra M, Kuiper J, Biessen E, van Eck M (2005) Scavenger receptors: friend or foe in atherosclerosis? *Curr Opin Lipidol*, 16, 525-535.
- van der Velde, A. E. (2010) Reverse cholesterol transport: from classical view to new insights. *World J Gastroenterol*, 16, 5908-5915.
- Vaughan, M., Berger, J. E., Steinberg, D. (1964) Hormone-Sensitive Lipase and Monoglyceride Lipase Activities in Adipose Tissue. *J Biol Chem*, 239, 401-409.
- Vega, M. A., Segui-Real, B., Garcia, J. A., Cales, C., Rodriguez, F., Vanderkerckhove, J., Sandoval, I. V. (1991) Cloning, sequencing, and expression of a cDNA encoding rat LIMP II, a novel 74-kDa lysosomal membrane protein related to the surface adhesion protein CD36. *J Biol Chem*, 266, 16818-16824.
- Vernon, R. G., Clegg, R.A. (1985) The metabolism of white adipose tissue in vivo and in vitro. In: *New Perspectives in Adipose Tissue: Structure, Function and Development.*, (V. R. e. Cryer A ed.), pp. 65-86. Butterworths, Boston (MA).
- Visconti PE, Westbrook VA, Chertihin O, Demarco I, Sleight S, Diekman AB. (2002) Novel signaling pathways involved in sperm acquisition of fertilizing capacity. *Journal of reproductive immunology*, 53, 133-150.

- Volle, D. H., Mouzat, K., Duggavathi, R., Siddeek, B., Dechelotte, P., Sion, B., Veysiere, G., Benahmed, M., Lobaccaro, J. M. (2007) Multiple roles of the nuclear receptors for oxysterols liver X receptor to maintain male fertility. *Mol Endocrinol*, 21, 1014-1027.
- von Eckardstein, A. N., J. R., Assmann, G. (2001) High density lipoproteins and arteriosclerosis. Role of cholesterol efflux and reverse cholesterol transport. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 21, 13-27.
- von Haller, P. D., Donohoe, S., Goodlett, D. R., Aebersold, R., Watts, J. D. (2001) Mass spectrometric characterization of proteins extracted from Jurkat T cell detergent-resistant membrane domains. *Proteomics*, 1, 1010-1021.
- Voss, A., Reinhart, M., Sankarappa, S., Sprecher, H. (1991) The metabolism of 7,10,13,16,19-docosapentaenoic acid to 4,7,10,13,16,19-docosahexaenoic acid in rat liver is independent of a 4-desaturase. In: *The Journal of biological chemistry*, Vol. 266, pp. 19995-20000 UNITED STATES.
- Wahlstrom, T., Huhtaniemi, I., Hovatta, O., Seppala, M. (1983) Localization of luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone, prolactin, and their receptors in human and rat testis using immunohistochemistry and radioreceptor assay. *J Clin Endocrinol Metab*, 57, 825-830.
- Wahrenberg, H., Lonnqvist, F., Arner, P. (1989) Mechanisms underlying regional differences in lipolysis in human adipose tissue. *J Clin Invest*, 84, 458-467.
- Walker, W. H. and Cheng, J. (2005) FSH and testosterone signaling in Sertoli cells. *Reproduction*, 130, 15-28.
- Wanders, R. J. and Waterham, H. R. (2006) Biochemistry of mammalian peroxisomes revisited. In: *Annual Review of Biochemistry*, Vol. 75, pp. 295-332. United States.
- Wang, S. P., Chung, S., Soni, K., Bourdages, H., Hermo, L., Trasler, J., Mitchell, G. A. (2004) Expression of human hormone-sensitive lipase (HSL) in postmeiotic germ cells confers normal fertility to HSL-deficient mice. *Endocrinology*, 145, 5688-5693.
- Warden, C. H., Davis, R. C., Yoon, M. Y., Hui, D. Y., Svenson, K., Xia, Y. R., Diep, A., He, K. Y. and Lusic, A. J. (1993) Chromosomal localization of lipolytic enzymes in the mouse: pancreatic lipase, colipase, hormone-sensitive lipase, hepatic lipase, and carboxyl ester lipase. *J Lipid Res*, 34, 1451-1455.
- Waterman MR, Keeney DS. (1996) Signal transduction pathways combining peptide hormone and steroidogenesis. *Vit Horm.*, 52, 129-148.
- Wathes, D. C., Abayasekara, D. R. E., Aitken, R. J. (2007) Polyunsaturated Fatty Acids in Male and Female Reproduction, In: *Biology of reproduction*, Vol. 77, pp. 190-201.
- Webb, N. R., Connell, P. M., Graf, G. A., Smart, E. J., de Villiers, W. J., de Beer, F. C. and van der Westhuyzen, D. R. (1998) SR-BII, an isoform of the scavenger receptor BI containing an alternate cytoplasmic tail, mediates lipid transfer between high density lipoprotein and cells. *J Biol Chem*, 273, 15241-15248.
- Webb, N. R., de Villiers, W. J., Connell, P. M., de Beer, F. C. and van der Westhuyzen, D. R. (1997) Alternative forms of the scavenger receptor BI (SR-BI). *J Lipid Res*, 38, 1490-1495.
- Wei, S., Lai, K., Patel, S., Piantedosi, R., Shen, H., Colantuoni, V., Kraemer, F. B., Blaner, W. S. (1997) Retinyl ester hydrolysis and retinol efflux from BFC-1beta adipocytes. *J Biol Chem*, 272, 14159-14165.
- Wiebe JP, Tilbe KS (1979) De novo synthesis of steroids (from acetate) by isolated rat Sertoli cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 89, 1107-1113.
- Wightman B, Ha I, Ruvkun G (1993) Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell*, 75, 855-862.
- Wilson, B. E., Deeb, S. and Florant, G. L. (1992) Seasonal changes in hormone-sensitive and lipoprotein lipase mRNA concentrations in marmot white adipose tissue. *Am J Physiol*, 262, R177-181.

- Wolfe RR, Klein S, Herndon DN, Jahoor F (1990) Substrate cycling in thermogenesis and amplification of net substrate flux in human volunteers and burned patients. *J Trauma*, 30, S6-9.
- Wood, S. L., Emmison, N., Borthwick, A. C., Yeaman, S. J. (1993) The protein phosphatases responsible for dephosphorylation of hormone-sensitive lipase in isolated rat adipocytes. *Biochem J*, 295 (Pt 2), 531-535.
- Wouters-Tyrou, D., Martinage, A., Chevaillier, P., Sautiere, P. (1998) Nuclear basic proteins in spermiogenesis. *Biochimie*, 80, 117-128.
- Yamauchi, Y., Reid, P. C., Sperry, J. B., Furukawa, K., Takeya, M., Chang, C. C, Chang, T. Y. (2007) Plasma membrane rafts complete cholesterol synthesis by participating in retrograde movement of precursor sterols. *J Biol Chem*, 282, 34994-35004.
- Yancey PG, de la Llera-Moya M, Swarnakar S, Monzo P, Klein SM, Connelly MA, Johnson WJ, Williams DL, Rothblat GH (2000) High Density Lipoprotein Phospholipid Composition Is a Major Determinant of the Bi-directional Flux and Net Movement of Cellular Free Cholesterol Mediated by Scavenger Receptor BI. *Journal of Biological Chemistry*, 275, 36596-36604.
- Yang C, McDonald JG, Patel A, Zhang Y, Umetani M, Xu F, Westover EJ, Covey DF, Mangelsdorf DJ, Cohen JC, Hobbs HH (2006) Sterol intermediates from cholesterol biosynthetic pathway as liver X receptor ligands. *J Biol Chem*, 281, 27816-27826.
- Yang, T. E., P. J., Wright, M. E., Yabe, D., Gong, Y., Abersold, R., Goldstein, J. L., Brown, M. S. (2002) Crucial step in cholesterol homeostasis: sterols promote binding of SCAP to INSIG-1, a membrane protein that facilitates retention of SREBPs in ER. *Cell*, 110, 489-500.
- Yeagle, P. L. (1985) Cholesterol and the cell membrane. *Biochim Biophys Acta*, 822, 267-287.
- Yeaman, S. J. (1990) Hormone-sensitive lipase--a multipurpose enzyme in lipid metabolism. *Biochim Biophys Acta*, 1052, 128-132.
- Yeaman, S. J. (2004) Hormone-sensitive lipase--new roles for an old enzyme. *Biochem J*, 379, 11-22.
- Yesilaltay A, Kocher O, Pal R, Leiva A, Quiñones V, Rigotti A, Krieger M (2006) PDZK1 Is Required for Maintaining Hepatic Scavenger Receptor, Class B, Type I (SR-BI) Steady State Levels but Not Its Surface Localization or Function. *Journal of Biological Chemistry*, 281, 28975-28980.
- Yip, R. G.-C. and Goodman, H. M. (1999) Growth Hormone and Dexamethasone Stimulate Lipolysis and Activate Adenylyl Cyclase in Rat Adipocytes by Selectively Shifting Gi α 2 to Lower Density Membrane Fractions. *Endocrinology*, 140, 1219-1227.
- Yonezawa, T., Haga, S. , Kobayashi, Y. , Katoh, K. and Obara, Y. (2008) Unsaturated fatty acids promote proliferation via ERK1/2 and Akt pathway in bovine mammary epithelial cells. In: *Biochemical and biophysical research communications*, Vol. 367, pp. 729-735. United States.
- Yoshida S, Nabeshima Y, Nakagawa T. (2007) Stem cell heterogeneity: actual and potential stem cell compartments in mouse spermatogenesis. *Ann N Y Acad Sci*, 1120, 47-58.
- Yoshida, S. S., Mamiko; Nakagawa, Toshinori; Ohbo, Kazuyuki; Nagamatsu, Go; Suda, Toshio; Nabeshima, Yo-ichi (2006) The first round of mouse spermatogenesis is a distinctive program that lacks the self-renewing spermatogonia stage. *Development*, 133, 1495-1505.
- Yuan, L., Liu, J. G., Zhao, J., Brundell, E., Daneholt, B., Hoog, C. (2000) The murine SCP3 gene is required for synaptonemal complex assembly, chromosome synapsis, and male fertility. *Mol Cell*, 5, 73-83.
- Zadavec, D., Tvrdik, P., Guillou, H., Haslam, R., Kobayashi, T., Napier, J. A., Capecchi, M. R. and Jacobsson, A. (2011) ELOVL2 controls the level of n-6 28:5 and 30:5 fatty acids in testis, a prerequisite for male fertility and sperm maturation in mice. *J Lipid Res*, 52, 245-255.
- Zeng, L., Liao, H., Liu, Y., Lee, T. S., Zhu, M., Wang, X., Stemerman, M. B., Zhu, Y. and Shyy, J. Y. (2004) Sterol-responsive element-binding protein (SREBP) 2 down-regulates ATP-binding cassette transporter A1 in vascular endothelial cells: a novel role of SREBP in regulating cholesterol metabolism. *J Biol Chem*, 279, 48801-48807.

- Zhang, H. H., Souza, S. C., Muliro, K. V., Kraemer, F. B., Obin, M. S. and Greenberg, A. S. (2003) Lipase-selective functional domains of perilipin A differentially regulate constitutive and protein kinase A-stimulated lipolysis. *J Biol Chem*, 278, 51535-51542.
- Zhang, Y., Ahmed, A. M., McFarlane, N., Capone, C., Boreham, D. R., Truant, R., Igdoura, S. A., Trigatti, B. L. (2007) Regulation of SR-BI-mediated selective lipid uptake in Chinese hamster ovary-derived cells by protein kinase signaling pathways. *J Lipid Res*, 48, 405-416.
- Zhu K, Zhang YM, Rock CO (2009) Transcriptional Regulation of Membrane Lipid Homeostasis in *Escherichia coli*. In: *Journal of Biological Chemistry* Vol. 284, pp. 34880-34888.
- Zhu W, Saddar S, Seetharam D, Chambliss KL, Longoria C, Silver DL, Yuhanna IS, Shaul PW, Mineo C. (2008) The Scavenger Receptor Class B Type I Adaptor Protein PDZK1 Maintains Endothelial Monolayer Integrity. *Circ Res*, 102, 480-487.
- Zimmermann R, Strauss JG, Haemmerle G, Schoiswohl G, Birner-Gruenberger R, Riederer M, Lass A, Neuberger G, Eisenhaber F, Hermetter A, Zechner R. (2004) Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase. *Science*, 306, 1383-1386.
- van Zonneveld P, Scheffer GJ, Broekmans FJ, Blankenstein MA, de Jong FH, Looman CW, Habbema JD, te Velde ER. (2003) Do cycle disturbances explain the age-related decline of female fertility? Cycle characteristics of women aged over 40 years compared with a reference population of young women. *Human Reproduction* 18 495-501