

ROL DE LA ISOFORMA 2 DE LA GLICEROL- 3-FOSFATO ACILTRANSFERASA (GPAT 2) EN EL METABOLISMO LIPÍDICO TESTICULAR



Tesis Doctoral

Universidad Nacional de La Plata

Facultad de Ciencias Exactas

Departamento de Ciencias Biológicas

- 2011 -

Tesista: Bioq. Elizabeth R Cattáneo

Director: Dr. Rodolfo R Brenner

Asesor Académico: Dra. María R Gonzalez-Baro

El presente trabajo de tesis, para optar al grado de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata, fue realizado en el Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata (INIBIOLP), Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de La Plata, bajo la dirección del Dr. Rodolfo R Brenner y la asesoría académica de la Dra. María del Rosario Gonzalez-Baró.

AA	Ácido araquidónico, 20:4n6
ACSL	AcilCoA-sintetasa de cadena larga
AG	Ácido graso
AGPAT	Acilglicerolfosfato- aciltransferasa
AR	Receptor de andrógenos
BSA	Albúmina sérica bovina
CE	Ésteres de colesterol
Células control	Células transfectadas con el plásmido pcDNA3.1 vacío
Células G2	Células transfectadas con el cDNA correspondiente a GPAT2
CR	Cuerpos residuales
c.s.p	Cantidad suficiente para
DAG	1,2-diacilglicérido
DGAT	AcilCoA-diacilglicerolaciltransferasa
DMEM	Medio de cultivo esencial mínimo modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
dNTPs	Desoxirribonucleotidos trifosfato
DPA	Ácido docosapentaenoico, 22:5n6
Éter-DAG	1-O-alkil-2,3-diacilglicérido
FBS	Suero fetal bovino
FSH	Hormona folículo estimulante
GLC	Cromatografía gas-líquido
GnRH	Hormona liberadora de gonadotrofinas
GPAT	Glicerol-3-fosfato aciltransferasa
GPL	Glicerofosfolípidos
G3P	sn-glicerol-3-fosfato
HIS	Hibridización <i>in situ</i>
IgG	Inmunoglobulina G
LB	Medio de cultivo Luria Bertani
LD	Lipid droplets (gotas de lípidos citoplasmáticos)
LH	Hormona Luteinizante
LPA	Ácido lisofosfatídico
MEM	Medio de cultivo esencial mínimo
NEM	N-etilmaleimida
PA	Ácido fosfatídico
PBS	Buffer fosfato salino
PUFA	Ácidos grasos poliinsaturados
qRT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa medida en tiempo real
RE	Retículo endoplasmático
SDS	Dodecilsulfato de sodio
TAG	Triacilgliceroles
TLC	Cromatografía en capa delgada
VLCPUFA	Ácidos grasos poliinsaturados de muy larga cadena

INTRODUCCIÓN	1
1. Conceptos generales	1
2. Espermatogénesis	2
2.1. Conceptos generales	2
2.2. Control hormonal	5
2.3. Primera espermatogénesis	6
3. Metabolismo de triacilgliceroles (TAG)	8
3.1. Síntesis de TAG en mamíferos	8
3.2. Glicerol-3-fosfato aciltransferasas	8
3.3. Glicerol-3-fosfato aciltransferasa 2	9
4. Metabolismo de TAG en testículo	11
HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS	15
MATERIALES Y MÉTODOS	16
1. Modelos experimentales	16
1.1. <i>Rattus norvegicus</i>	16
1.2. Cultivos celulares	16
2. Obtención de fracciones subcelulares de testículo de rata	17
2.1. Obtención de homogenatos, mitocondrias crudas y microsomas	17
2.2. Obtención de mitocondrias puras	17
3. Obtención de la fracción membranas totales de células en cultivo	18
4. Obtención de diferentes tipos celulares a partir de testículo de rata	19
4.1. Obtención de células de Leydig y de una fracción enriquecida en túbulos seminíferos	19
4.2. Obtención de células de Sertoli	19
5. Determinación de actividades enzimáticas	20
5.1. Medida de la actividad Glicerol-3-fosfato aciltransferasa	20
5.2. Medida de la actividad NADPH citocromo c reductasa	20
6. Protocolos generales de trabajo con proteínas	21
6.1. Cuantificación	21
6.2. Identificación de proteínas por la técnica de Western blot	21
6.2.1. Anticuerpos utilizados	21
6.2.2. Separación de proteínas	23
6.2.3. Transferencia	23

6.2.4. Incubación de la membrana con los anticuerpos	24
6.2.5. Revelado por quimioluminiscencia	24
6.3. Identificación de proteínas por la técnica de inmunofluorescencia	24
6.3.1. Preparación de las muestras	25
6.3.2. Incubación con los anticuerpos	25
7. Protocolos generales de trabajo con ADN	25
7.1. Cuantificación	25
7.2. Cepas bacterianas	26
7.3. Medios de cultivo	26
7.4. Preparación de bacterias competentes	26
7.5. Transformación de bacterias competentes con ADN plasmídico	26
7.6. Preparación de ADN plasmídico a baja escala (miniprep)	27
7.7. Preparación de ADN plasmídico a gran escala (maxiprep)	27
7.8. Digestión con enzimas de restricción	27
7.9. Electroforesis en geles de agarosa	28
7.10. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	28
7.11. Transfección de ADN plasmídico en células en cultivo	28
8. Protocolos generales de trabajo con ARN	29
8.1. Cuantificación	29
8.2. Aislamiento de ARN total	29
8.3. Control del ARN obtenido	30
8.4. Identificación de ARN mensajeros (ARNm) por Northern blot	30
8.4.1. Separación electroforética y transferencia	30
8.4.2. Preparación de sondas marcadas con deoxicitidina 5' trifosfato [α 32 P] e hibridización	31
8.4.3. Revelado	32
8.4.4. <i>Stripping</i> de membranas	32
8.5. Identificación de ARNm por Hibridización <i>in situ</i>	32
8.6. Cuantificación de ARNm por PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR)	33
8.6.1. Diseño y preparación de los cebadores	34
8.6.2. Obtención de los cDNA	34
8.6.3. Reacción de amplificación	34
9. Protocolos generales de trabajo con lípidos	35
9.1. Extracción de lípidos por el método de Folch	35
9.1.1. Extracción de lípidos de cultivos celulares	35

9.1.2. Extracción de lípidos de muestras de tejidos	35
9.2. Separación de lípidos por cromatografía en capa delgada (TLC)	36
9.3. Obtención de Ácidos Grasos Libres (AGL) por Saponificación	36
9.4. Esterificación de los AGL	37
9.5. Identificación de AG por GLC	37
9.6. Cuantificación de TAG por TLC	38
9.7. Esterificación de [1- ¹⁴ C]araquidonato y análisis de los productos mediante TLC	38
9.8. Tinción de Células con <i>Oil Red-O</i>	38
10. Análisis estadístico de resultados	39
RESULTADOS	40
1. Resultados obtenidos en cultivos celulares	40
1.1. Expresión de GPAT2 en células en cultivo	40
1.2. La sobreexpresión de GPAT2 estimula la síntesis y almacenamiento de TAG	41
1.3. La sobreexpresión de GPAT2 modifica la composición en AG de los TAG	42
1.4. GPAT2 muestra mayor afinidad por el araquidonil-CoA que por otros acilgraso-CoAs	44
2. Resultados obtenidos en tejidos animales	47
2.1. Medida de la actividad GPAT-NEM sensible en mitocondrias obtenidas a partir de testículo de rata	48
2.1.1. Pureza de la fracción mitocondrial	48
2.1.2. Medida de actividad GPAT	49
2.2. Localización celular de GPAT2	50
2.2.1. Detección del ARNm correspondiente a <i>Gpat2</i> por Northern blot	50
2.2.1.1. Optimización de los aislamientos de las distintas células de testículo de rata	50
2.2.1.2. Optimización de la obtención de una sonda radiactiva para detectar el ARNm correspondiente a <i>Gpat2</i>	51
2.2.1.3. Northern blot	51
2.2.2. Detección del ARNm correspondiente a <i>Gpat2</i> por Hibridización <i>in situ</i>	52
2.2.3. Detección de GPAT2 por inmunofluorescencia	53
2.3. Estudio de la expresión de GPAT2 durante el desarrollo postnatal	54
2.3.1. Detección del ARNm correspondiente a <i>Gpat2</i> en función de la edad por qRT-PCR	54
2.3.2. Detección de GPAT2 en función de la edad por Western blot	55
2.3.2.1. Control de especificidad del anticuerpo anti GPAT2	56
2.3.2.2. Western blot	56
2.3.3. Medida de la actividad GPAT2 en función de la edad	57

2.3.4. Medida del contenido de TAG y de su composición en AG en función de la edad	59
3. Resultados obtenidos in silico	61
3.1. Gene expression omnibus. Localización tisular de Gpat2	61
3.2. Array express. Localización celular de Gpat2	62
DISCUSIÓN	63
CONCLUSIONES	74
BIBLIOGRAFÍA	75
ANEXOS	81
1. Alineamiento por homología de las secuencias proteicas de GPAT2 de rata y ratón	81
2. Buffers y soluciones	83

INTRODUCCIÓN

1. Conceptos generales

La capacidad reproductiva del hombre adulto está condicionada, esencialmente, por el proceso de espermatogénesis. La producción continua de un número adecuado de espermatozoides funcionalmente competentes depende de múltiples factores, y la alteración parcial o total de este proceso representa alrededor del 80% de las causas de subfertilidad o esterilidad masculina (Serio M y Forti G, 1997).

Los defectos en la producción de espermatozoides pueden tener un origen genético o estar ligados a factores extrínsecos. Desde principios de los años noventa se han empezado a identificar los genes que intervienen en la regulación de algunos de los pasos críticos de la espermatogénesis (Vogt PH, 1997), y esta información sugiere que por lo menos un 30% de las alteraciones en la producción de espermatozoides podrían tener una base genética. Entre los factores extrínsecos de defectos en la producción de espermatozoides se encuentran los de origen nutricional, tóxico o los asociados a distintas patologías de origen no genético (Poirot C y Cherruau B, 2005).

En occidente los problemas de fertilidad afectan a 1 de cada 25 hombres, y en varios países los niños concebidos por medio de técnicas de reproducción asistida representan alrededor del 3% de los nacimientos anuales; aproximadamente el 50% de estos casos se originan, al menos en parte, por problemas de fertilidad masculina (Borg CL y col, 2010).

Si bien desde el punto de vista de la biología de la reproducción los aspectos de la espermatogénesis que pueden tener mayor interés son aquellos que relacionan los conocimientos básicos con las aplicaciones terapéuticas propias de la especialidad, como son los tratamientos de la subfertilidad, la reproducción asistida y el control de la natalidad, la investigación básica a nivel metabólico o de regulación de la expresión génica puede ayudar a comprender el origen molecular de estos desarreglos y contribuir al desarrollo exitoso de nuevas formas de tratamiento, como son los cultivos *in vitro* o el trasplante de células germinales. Conocer los mecanismos que regulan la espermatogénesis normal podría facilitar la interpretación de las relaciones observadas entre un genotipo determinado y su fenotipo, permitiendo el desarrollo de nuevas herramientas de diagnóstico y tratamiento.

2. Espermatogénesis

2.1. Conceptos generales

La espermatogénesis se define como el proceso por el cual se producen las gametas masculinas o espermatozoides a partir de las células germinales más indiferenciadas, las espermatogonias. Este proceso ocurre en la gónada masculina o testículo e implica secuencias de divisiones mitóticas y meióticas, y procesos de diferenciación celular. La espermatogénesis está sujeta a regulación hormonal y depende de la interacción entre las células germinales y las células somáticas presentes en las gónadas.

En el testículo podemos encontrar dos tipos de células:

- **células somáticas:** dentro de ellas están las células de Leydig, las células de Sertoli y las células mioideas, y
- **células germinales o de la línea espermática:** constituidas por las espermatogonias, espermatoцитos primarios y secundarios, espermátides y espermatozoides.

Los testículos tienen una doble función, por un lado producen las gametas masculinas o espermatozoides, y por otro, producen la hormona masculina testosterona. Histológicamente están constituidos por un parénquima rodeado por una cápsula de tejido conectivo o túnica, el parénquima está formado a su vez por los túbulos seminíferos y el tejido intersticial. El tejido intersticial contiene a las células de Leydig, y vasos sanguíneos y linfáticos, esenciales para el transporte de hormonas y nutrientes hacia el testículo. Los túbulos seminíferos están formados por una membrana basal rodeada por 3 ó 4 capas de células mioideas. Por dentro de la membrana basal los túbulos seminíferos están revestidos por el epitelio productor de espermatozoides o epitelio seminífero, que contiene dos tipos de células, las células de Sertoli y las células de la línea espermática, de las cuales solo las espermatogonias y las células de Sertoli se encuentran en contacto con la membrana basal.

Las **células de Leydig** representan la parte endócrina del testículo dado que sintetizan y secretan principalmente la hormona masculina testosterona. Estas células se ubican en el tejido intersticial que rodea los túbulos seminíferos.

Las **células de Sertoli** tienen forma irregular y se ubican sobre la membrana basal extendiéndose hacia la luz del tubo seminífero. Son las encargadas de proveer a las células germinales de un soporte físico, nutritivo y de factores reguladores, los cuales son esenciales para que estas proliferen y progresen a través de las distintas fases de su

desarrollo (Borg CL y col, 2010). Las células de Sertoli se encuentran unidas entre sí por medio de puentes citoplasmáticos originando la barrera hematotesticular que divide al epitelio seminífero en dos zonas, una basal y otra luminal. En la zona basal se encuentran las células germinales en división mitótica, mientras que en la zona luminal se encuentran las células germinales en las fases meiótica y postmeiótica. El desarrollo de las células germinales depende de su interacción con las células de Sertoli, y en cortes histológicos se ha podido observar que cada célula de Sertoli está en contacto simultáneo con tres o cuatro capas de células germinales (unas 30 a 50 células en total en la rata) que se encuentran en diferentes estadios de la espermatogénesis (Mruk DD y Cheng CY, 2004). Las células de Sertoli adultas son capaces además de fagocitar a las células germinales apoptóticas y a los cuerpos residuales (CR), que son estructuras que se generan durante la diferenciación de las células germinales (Wang H y col, 2006).

Las **espermatogonias** se originan por diferenciación a partir de las células germinales primordiales, las cuales llegan a la gónada en formación durante las primeras etapas del desarrollo embrionario. Son las células germinales más inmaduras del testículo, se encuentran localizadas sobre la membrana basal, y permanecen en un estado de reposo hasta la pubertad, momento a partir del cual comienzan a proliferar por mitosis. Este proceso es esencial dado que la producción continua de espermatozoides en el animal adulto depende de una renovación constante de la población de espermatogonias. Luego de su última mitosis las espermatogonias se diferencian en espermatoцитos primarios. En el epitelio seminífero puede haber más de un tipo de espermatogonias, las cuales se diferencian entre sí por sus características histológicas y funcionales; el número de espermatogonias diferentes presentes depende de la especie estudiada (Donnell LO y col, 2001; Borg CL y col, 2010).

Los **espermatoцитos primarios** son células de gran tamaño que rápidamente comienzan a dividirse por meiosis para dar origen a los espermatoцитos secundarios. La profase de la primera división meiótica es muy prolongada, en consecuencia en los cortes histológicos de testículo suelen observarse abundantes espermatoцитos primarios en distintos estadios de la profase I.

Los **espermatoцитos secundarios** son más pequeños que los primarios y entran rápidamente en la segunda división meiótica por lo que son difíciles de detectar en los cortes histológicos. Esta segunda división meiótica de los espermatoцитos secundarios da origen a las espermátides redondas haploides.

Las **espermátides** redondas experimentan una diferenciación morfológica, denominada espermiogénesis, que las transforma en **espermátides elongadas**. Esta diferenciación es un proceso complejo e implica varias etapas entre las que se encuentran la formación del acrosoma y el flagelo, la condensación de la cromatina, la elongación del núcleo, y la remoción de parte del citoplasma bajo la forma de CR. Las espermátides elongadas se separan de las células de Sertoli y son liberados a la luz del túbulo seminífero en un proceso denominado espermiación dando origen a los **espermatozoides**. Los espermatozoides que salen del testículo son inmóviles e incapaces de unirse al ovocito y penetrarlo, al atravesar el epidídimo los espermatozoides adquieren progresivamente movilidad y la capacidad de unirse, penetrar y fertilizar al ovocito.

Mediante técnicas de microscopía electrónica pudo demostrarse que durante la espermatogénesis la división citoplasmática de las células es incompleta, y ya desde la etapa de espermatogonias las células hijas se mantienen unidas entre sí por medio de puentes citoplasmáticos. Así una única espermatogonia da origen a un grupo de espermátides que se separan recién cuando son liberadas a la luz de los túbulos seminíferos (Donnell LO y col, 2001).

La espermatogénesis puede por lo tanto ser dividida en los mamíferos en cuatro grandes fases:

- a) La primera implica la diferenciación y renovación por mitosis de las espermatogonias.
- b) La segunda es una fase de divisiones meióticas, que reduce la dotación cromosómica a la mitad, para dar lugar a células haploides. Se inicia con la duplicación, recombinación del material genético paterno y materno y división de los espermatocitos primarios para dar origen a los espermatocitos secundarios, y finaliza con una nueva división meiótica para formar las espermátides redondas.
- c) La tercera etapa implica la diferenciación y maduración de las espermátides redondas para originar las espermátides elongadas, en un proceso conocido como espermiogénesis.
- d) La última etapa o espermiación consiste en la liberación de las espermátides elongadas a la luz del túbulo seminífero dando origen a los espermatozoides, los cuales completan su maduración fuera de los túbulos seminíferos (Amann RP, 2008).

La duración de la espermatogénesis depende de la especie estudiada, en el hombre dura aproximadamente 74 días (Heller CG, Clermont Y, 1963), mientras que en la rata y el ratón el tiempo necesario es de 55 y 35 días respectivamente (Eddy EM, 2002; Amann RP, 2008).

Dentro del túbulo seminífero el desarrollo de las células espermatogénicas ocurre de forma direccional, con las espermatogonias ubicadas sobre la membrana basal de los túbulos, seguidas por los espermatocitos y espermátides hacia la parte luminal (Eddy EM, 2002). Por lo tanto en los cortes transversales de túbulos seminíferos siempre pueden observarse espermatogonias en un cierto estadio evolutivo, junto con espermatocitos y espermátides también en un dado estadio evolutivo. A estas agrupaciones fijas y bien definidas de células germinales en determinados estadios evolutivos se las denomina **asociaciones celulares o estadios**. Para cada especie animal existe un número finito y constante de asociaciones celulares, en el hombre pueden observarse 6, mientras que en la rata y el ratón pueden observarse 14 y 12 asociaciones celulares diferentes respectivamente; estas asociaciones celulares se designan por convención con números romanos. (Franca LR y col, 1998).

Cada una de estas asociaciones celulares representa un estadio de un proceso cíclico, y a lo largo de un túbulo seminífero aparecen en una determinada secuencia. En ratas, ratones y otros mamíferos cada estadio ocupa un espacio determinado, a menudo milimétrico dentro del túbulo seminífero. Cada segmento contiene así esa única asociación de células característica de ese estadio, y limita con otros dos segmentos, correspondientes a un estadio anterior y a uno posterior. Toda la hilera de segmentos, con sus sucesivos estadios celulares se denomina onda del epitelio seminífero. En el hombre cada estadio ocupa una pequeña zona cuneiforme, por lo que en un corte transversal se pueden ver tres o más estadios simultáneamente. En consecuencia en el hombre no pueden definirse ondas del epitelio seminífero (Mc Lachlan RI y col, 2002).

2.2. Control hormonal

La producción de espermatozoides y la secreción de testosterona por el testículo dependen de que éste sea estimulado por dos hormonas de origen hipofisario, la hormona Luteinizante (LH) y la hormona folículo estimulante (FSH), ambas liberadas a su vez en respuesta a la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) producida en el hipotálamo (Mc Lachlan RI y col, 2002).

Tanto la LH como la FSH tienen sus receptores en la membrana plasmática de las células somáticas del testículo sobre las que actúan modulando su metabolismo y la expresión de genes, afectando así el microambiente dentro del cual las células germinales se desarrollan, e influenciando de manera indirecta la expresión de genes en las mismas (Eddy EM, 2002).

La **testosterona** es esencial para el inicio y mantenimiento de la espermatogénesis, y para el desarrollo de los caracteres sexuales secundarios. Es secretada por las células de Leydig en respuesta a la LH, su síntesis se incrementa durante la pubertad y ejerce su acción interactuando con el receptor intracelular de andrógenos (AR) presente principalmente en las propias células de Leydig, en las células de Sertoli y en las células peritubulares mioideas. Los datos acerca de la expresión del AR en las células de la línea germinal son contradictorios, y dependen de la especie estudiada y de la técnica utilizada para detectarlo (Wang R y col, 2009).

La **FSH** actúa sobre receptores de superficie acoplados a proteínas G presentes solo en las células de Sertoli. La FSH es importante para el desarrollo del testículo inmaduro donde promueve la proliferación de estas células, y para la estimulación de la mitosis y diferenciación de las espermatogonias (McLachlan RI y col, 2002; Meachem SJ y col, 2005).

Los estudios de supresión hormonal permitieron demostrar que tanto la FSH como la testosterona son necesarias para mantener la viabilidad de las células germinales y para el proceso de espermiación, mientras que la testosterona es necesaria también para la transformación de las espermátides redondas en elongadas (Mc Lachlan RI y col, 2002; Cameron DF y Muffly KE, 1993).

2.3. Primera espermatogénesis

En los animales jóvenes se denomina primera espermatogénesis o primera ola espermatogénica al proceso por el cual el primer grupo de espermatogonias se diferencia en espermatozoides. Esta primera espermatogénesis se caracteriza por la aparición secuencial de células germinales cada vez más maduras y durante la misma cada célula germinal se encuentra en estrecho contacto con una célula de Sertoli, la cual la provee de nutrientes, le proporciona un medio de adhesión y determina su destino mediante la producción de diferentes moléculas de señalización (Print CG y Loveland KL, 2000).

En las ratas la maduración de los testículos comienza inmediatamente después del nacimiento. Entre los 3 y los 8 días de vida pueden observarse espermatogonias en mitosis. A los 18 días pueden encontrarse células germinales transitando la meiosis I, mientras que a los 28-35 días aparecen las primeras espermátides, y alrededor de los 55 días pueden observarse espermatozoides en los vasos eferentes, completándose así la primera espermatogénesis. Este proceso de maduración continua y a partir de los 55-60

días puede observarse que la espermatogénesis ocurre ya en todos los túbulos seminíferos (Jahnukainen K y col, 2004; Marty MS y col, 2003). Las células de Sertoli proliferan desde el nacimiento y alcanzan su máximo valor alrededor del día 16, momento a partir del cual dejan de proliferar y comienza su diferenciación y maduración. Las células de Leydig muestran dos períodos de proliferación luego del nacimiento: uno entre los días 14 y 28, y otro entre los días 28 y 56. Luego de estos períodos estas células dejan de dividirse y su número se mantiene aproximadamente constante a lo largo de la vida adulta (Marty MS y col, 2003).

En el ratón la primera espermatogénesis ocurre de manera similar, las espermatogonias proliferan entre el nacimiento y los 5 días de vida, y aproximadamente a los 10 días se diferencian en espermatoцитos primarios y comienzan la meiosis. Las primeras espermátides haploides aparecen alrededor del día 20 y los primeros espermatozoides pueden verse en la luz de los túbulos a partir del día 35 (Print CG y Loveland KL, 2000). En cuanto a las células somáticas las células de Sertoli proliferan en promedio hasta el día 17 post-nacimiento, y las de Leydig hasta los días 21-33 (Marty MS y col, 2003).

En humanos las espermatogonias proliferan y se diferencian hasta los seis meses de edad pero la meiosis de las células germinales no comienza hasta la pubertad, momento a partir del cual ocurre un aumento en los niveles de las gonadotrofinas y andrógenos que permiten el inicio de la espermatogénesis y participan de la diferenciación de los espermatoцитos en espermátides (Print CG y Loveland KL, 2000).

Por lo tanto, el desarrollo postnatal del testículo implica la aparición secuencial de los distintos tipos de células constituyentes. El número de células de Leydig y de Sertoli aumenta desde el nacimiento hasta la adolescencia, momento a partir del cual dejan de proliferar y se diferencian en sus formas maduras, estableciéndose así el valor normal encontrado en animales adultos. En cambio, debido a que la espermatogénesis es un proceso continuo en el cual la primera división meiótica se produce en la pubertad y continúa luego a través de la vida adulta, el mayor número de células de la línea espermática se alcanza en los animales adultos.

La gran mayoría de los genes y procesos necesarios para el desarrollo de la espermatogénesis se encuentran conservados entre humanos y roedores (Borg CL y col, 2010), y teniendo en cuenta tanto la producción de células como los efectos hormonales puede observarse que existen varias similitudes entre el desarrollo del sistema

reproductivo humano y el de roedores, lo que nos permite utilizar a estos animales como modelos de estudio de la espermatogénesis (Marty MS y col, 2003).

3. Metabolismo de triacilgliceroles (TAG)

3.1. Síntesis de TAG en mamíferos

La principal vía de síntesis de TAG en mamíferos es la síntesis *de novo* a partir de *sn*-glicerol-3-fosfato (G3P). Esta vía comienza con la activación de los ácidos grasos (AG) de cadena larga a sus correspondientes tioésteres de la coenzima A (acilgraso-CoAs), reacción catalizada por las acilCoA-sintetasas de cadena larga (ACSL). Luego estos acilgraso-CoAs son esterificados de manera secuencial en las posiciones *sn*-1 y *sn*-2 del G3P para dar ácido lisofosfatídico (LPA) y ácido fosfatídico (PA). Estas reacciones de acilación están catalizadas respectivamente por las enzimas glicerol-3-fosfato aciltransferasa (GPAT) y acilglicerolfosfato- aciltransferasa (AGPAT). Por último, el grupo fosfato del PA es hidrolizado por la fosfatidato fosfohidrolasa para dar un 1,2-diacilglicérido (DAG), el cual es esterificado en la posición 3 por las acilCoA-diacilglicerolaciltransferasas (DGAT) para dar el TAG. En varios tejidos de mamíferos, incluido el testículo, han sido descritas múltiples isoenzimas encargadas de catalizar cada uno de los pasos de esta vía metabólica.

3.2. Glicerol-3-fosfato aciltransferasas

Las GPATs [EC 2.3.1.15] son las enzimas que catalizan el primer paso de la vía de síntesis *de novo* de TAG y glicerofosfolípidos (GPL). En células de mamíferos han sido descritas hasta el momento cuatro isoenzimas las cuales presentan diferente distribución tisular, diferentes localizaciones subcelulares y diferente sensibilidad al tratamiento con sustancias que reaccionan con los grupos sulfhidrilo como la *N*-etilmaleimida (NEM), esto permite clasificarlas como isoformas sensibles al NEM o resistentes al NEM según su actividad sea inhibida o no por esta sustancia. A continuación se realiza una breve descripción de las isoformas GPAT1, 3 y 4, una descripción detallada de la isoforma GPAT2 se realiza en el apartado 3.3.

GPAT1 (Genebank # NP_032175), se localiza en la mitocondria, es resistente al NEM y esterifica principalmente acilgraso-CoAs saturados como el 16:0-CoA y el 18:0-CoA. GPAT1 se expresa principalmente en hígado y tejido adiposo, y numerosos estudios realizados tanto *in vivo* como *in vitro* la asocian con la síntesis de TAG (Gonzalez-Baró MR

y col, 2007; Coleman RA y Lee DP, 2004). Su expresión en hígado se encuentra estimulada por la insulina a través del factor de transcripción *sterol regulatory element binding protein-1c* (SRBP-1c), el cual se encuentra involucrado en la transactivación de varios genes necesarios para la síntesis de AG y TAG (Wendel AA y col, 2008).

Las isoformas **GPAT3** (previamente reportada como AGPAT8, Genebank # NP_766303) y **GPAT4** (previamente reportada como AGPAT6, Genebank # NM_018743), se localizan en el retículo endoplasmático (RE), son sensibles al NEM y tienen igual preferencia por los sustratos acilgraso-CoAs saturados e insaturados. GPAT3 se expresa principalmente en tejido adiposo epididimal y en intestino delgado en ratones, y en riñón, testículo, corazón, músculo esquelético y tiroides en humanos. La sobreexpresión de GPAT3 en cultivos celulares incrementa la esterificación de [¹⁴C]18:1n9 en los TAG, sugiriendo que estaría involucrada en la síntesis de los mismos. El ARNm de GPAT4 se expresa principalmente en hígado y tejido adiposo de ratón, así como también en epitelio mamario y testículo. Los ratones nulos para GPAT4 muestran una reducción del 45% en el contenido de TAG hepáticos sugiriendo que esta isoforma estaría involucrada en su síntesis, sin embargo la sobreexpresión de GPAT4 en células COS-7 y HEK-293 no incrementa la síntesis de TAG, y además estimula la esterificación de [¹⁴C]18:1n9 en los GPL, en particular en el fosfatidilinositol (Wendel AA y col, 2008).

3.3. Glicerol-3-fosfato aciltransferasa 2

La isoenzima **GPAT2** (Genebank # XP_130488) fue identificada por primera vez al observar que las mitocondrias de hígado de ratones nulos para el gen que codifica para GPAT1 (Gpat1^{-/-}) conservaban una actividad GPAT.

Para caracterizar esta nueva enzima se midió la actividad GPAT en las mitocondrias de hígado de ratones Gpat1^{-/-} utilizando G3P radiactivo como sustrato, los productos de la reacción se separaron por cromatografía en capa fina (TLC) y fueron identificados como LPA (15%), PA (75%) y DAG (10%). Esta distribución de marca es similar a la descrita para GPAT1, lo que permitió concluir que se trataba de una enzima con actividad GPAT. Además, se realizaron electroforesis en una y dos dimensiones las cuales fueron reveladas utilizando un anticuerpo policlonal diseñado para GPAT1, y en las que pudo observarse la presencia de una proteína con un peso molecular similar a GPAT1 (~90 KDa) pero con distinto punto isoeléctrico.

Para confirmar que se trataba de una nueva isoforma de GPAT se realizaron estudios de cinética enzimática utilizando mitocondrias aisladas de hígado de ratones

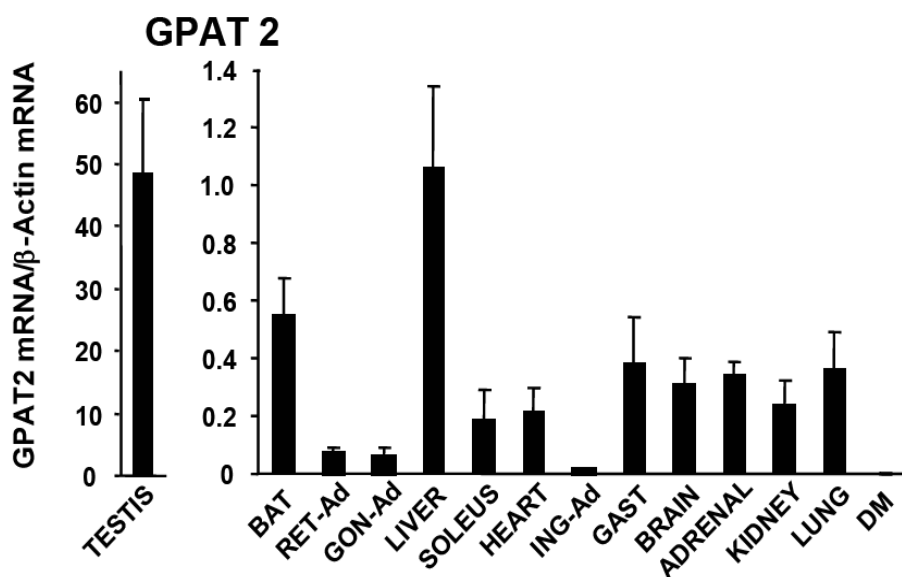
normales y de ratones *Gpat1*^{-/-}. Estos ensayos demostraron que la actividad GPAT presente en las mitocondrias de los ratones nulos era sensible al tratamiento con NEM, era inhibida por la dihidroxiacetona fosfato y por la polimixina B y era sensible a la temperatura. Por último, las medidas de actividad GPAT demostraron que esta nueva isoforma esterificaba con igual eficiencia al 16:0-CoA y al 18:1n9-CoA, usados como ejemplos de sustratos saturado e insaturado. Estos resultados permitieron diferenciar a esta nueva isoforma de la enzima conocida (GPAT1), y confirmaron que en las mitocondrias de hígado de los ratones *Gpat1*^{-/-} se expresaba una nueva isoforma de GPAT, que pasó a denominarse GPAT2 para diferenciarla de la primera isoforma mitocondrial clonada y caracterizada, la GPAT1. Esta isoforma GPAT2 no se expresa en el hígado de las cepas salvajes de ratones (Lewin TM y col, 2004).

Las diferencias a nivel fisiológico entre estas dos isoformas pudieron observarse al comparar los ratones normales con el *knock out* para GPAT1, y demostraron que aunque GPAT2 es activa en los ratones *Gpat1*^{-/-} no es capaz de suplir la falta de GPAT1, debido a que los ratones nulos presentan un menor peso corporal, un menor contenido de TAG en el plasma, un mayor contenido de acilgraso-CoAs y un menor contenido de TAG en el hígado, un incremento de la β -oxidación y diferente composición en AG de los GPL hepáticos, con respecto a los ratones normales (Hammond LE y col, 2002).

El cDNA que codifica para la isoforma GPAT2 de ratón fue clonado a partir del ARNm de ratones nulos para la isoforma GPAT1 y teniendo en cuenta su alta similitud de secuencia con esta proteína (identidad 27% y similitud 70%), este cDNA fue luego subclonado en un vector de expresión en células de mamífero al que se le adicionó un marcador epitópico FLAG (DYKDDDDK) en el extremo C-terminal (Wang S y col, 2007).

La sobreexpresión heteróloga de GPAT2 en células COS-7 incrementó tanto la actividad GPAT NEM sensible (30% mayor con respecto al control, usando palmitoil-CoA como sustrato), como la esterificación de [¹⁴C]18:1n9 en los TAG (84% mayor con respecto al control), y los estudios de co-localización confirmaron que se trataba de una proteína mitocondrial (Wang S y col, 2007).

Para determinar la distribución tisular de GPAT2 se realizaron estudios de q-Real Time-PCR (qRT-PCR) y esto permitió demostrar que en animales normales el ARNm correspondiente a *Gpat2* se encuentra principalmente en testículos, siendo su expresión relativa 50 veces mayor en este órgano que en el hígado o el tejido adiposo (Wang S y col, 2007).



La expresión relativa del ARNm de *Gpat2* en distintos tejidos de ratón se analizó por qRT-PCR. Los cambios en los niveles de expresión fueron determinados usando el método ΔC_t , normalizando la expresión a los niveles de β -actina. BAT: tejido adiposo marrón, RET-Ad: tejido adiposo retroperitoneal, GAST: músculo gastrocnemius, DM: mucosa duodenal (Wang S y col, 2007).

4. Metabolismo de TAG en testículo

Los testículos de los mamíferos adultos se caracterizan por poseer un alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados de 18 a 22 átomos de carbono (PUFA), y de ácidos grasos poliinsaturados de muy larga cadena (24 a 32 átomos de carbono, VLCPUFA). En testículo de rata y ratón predominan los PUFA de la serie n_6 , siendo los AG docosapentaenoico (DPA, 22:5 n_6) y araquidónico (AA, 20:4 n_6) los más abundantes en la rata, y el 18:2 n_6 el mayoritario en el ratón (Furland NE y col, 2003). En el testículo humano son abundantes los PUFA de la serie n_3 , predominando el 22:6 n_3 (Retterstol K y col, 2001 a y b).

Diversos experimentos que permiten eliminar selectivamente a las células germinales del testículo, como son la irradiación con rayos X, el criptoorquidismo experimental y el tratamiento con la droga antitumoral doxorubicina, permitieron determinar la localización celular de estos lípidos en el testículo (Zanetti SR y col, 2007; Oresti GM y col, 2010).

Los VLCPUFA representan aproximadamente el 5% de los AG en el testículo entero, y sólo están presentes además en retina y cerebro de vertebrados (Furland NE y col, 2003). Los VLCPUFA se encuentran principalmente formando parte de los esteres de colesterol (CE) y de los 1-O-alkil-2,3-diacilglicéridos (éter-DAG) presentes en las células de Sertoli, y de ciertas especies moleculares de esfingomielina y ceramida que son abundantes en las membranas de los espermatozoides maduros (Furland NE y col, 2007 a).

Los PUFA representan aproximadamente el 44,5 % de los AG en el testículo entero (Chanmugan PS y col, 1991), y se esterifican principalmente en los GPL y en los TAG. El AA y el 22:5n6 son los principales PUFA de los GPL y, por lo tanto, los AG mayoritarios en las células de la línea espermática tanto en la rata como en el ratón. Mientras que el 22:5n6 en la rata, y los AG 18:2n6 y 22:5n6 en el ratón, se esterifican principalmente en los TAG (Furland NE y col, 2007 b; Furland NE y col, 2003). Los TAG se localizan en las células germinales y pasan durante el proceso de diferenciación a ser el principal lípido neutro presente en los CR. Los CR son estructuras que se generan durante el proceso de espermiogénesis y contienen el material descartado por las espermátides, este material es luego fagocitado y reciclado por las células de Sertoli. Por lo tanto, una gran cantidad de AG provenientes de las células germinales, y compactados en los CR bajo la forma de TAG y GPL de membrana están destinados a ser incorporados y metabolizados por las células de Sertoli (Oresti GM y col, 2010); varios autores proponen que este material fagocitado sería reciclado para ser reutilizado luego por las células germinales en desarrollo (Wang H y col, 2006).

La composición en AG de los GPL debe estar controlada debido a que de ella dependen las propiedades de fluidez y permeabilidad de la membrana, así como también la actividad de diversas proteínas presentes en la misma. En este sentido se ha planteado que las propiedades físicas y la capacidad de fusión de la membrana plasmática de los espermatozoides maduros se deben probablemente a la particular composición en AG de sus lípidos constituyentes (Retterstol K y col, 2001 b).

Por otro lado, la continua formación de espermatozoides que ocurre en el testículo de los animales adultos requiere de un aporte continuo de GPL y colesterol para sintetizar sus membranas, y se ha propuesto que los TAG podrían cumplir el rol de intermediarios en los cuales se almacenarían de manera temporaria estos AG preformados, los cuales servirían también como precursores para la biosíntesis de los PUFA de 22 carbonos que forman parte de los GPL de membrana de las células de la línea germinal.

En este sentido, los efectos producidos por una dieta con alto contenido en AG de la serie n3 en los lípidos del testículo apoyan la idea de que los AG de los lípidos neutros pueden ser utilizados para la síntesis de los GPL de membranas, evitando que se produzcan cambios en la composición en AG de los mismos. Así, en testículos de ratones alimentados por 2 semanas con una dieta suplementada con aceite de pescado puede observarse que, mientras los niveles de GPL y CE no resultan afectados por la dieta, si ocurre una gran disminución en el contenido de TAG, con modificaciones en su

composición en AG. Estas modificaciones están dadas por una importante disminución en los niveles de 18:2n6, mientras que los niveles de AA, 22:5n6 y de otros PUFA minoritarios de la serie n6 de mayor longitud de cadena se mantienen estables o incluso tienden a aumentar con este tipo de dieta. Los TAG actuarían así no solo como aceptores de los PUFA (tanto de aquellos adicionados con la dieta, como del 22:5n6 sintetizado de manera endógena a partir del 18:2n6) sino también como dadores de estos AG para la síntesis de GPL, lo que puede inferirse de la disminución en el contenido de TAG inducida por este tipo de dieta. Por otro lado, los cambios producidos en la composición en AG permitieron mantener los niveles de PUFA de la serie n6 de mayor longitud de cadena a expensas de una disminución en el contenido de AG de menor longitud. Como consecuencia de esto, los principales GPL del testículo conservaron sus niveles de 22:5n6 a pesar de la importante reducción en la disponibilidad de PUFA de la serie n6 inducida por la dieta. Esto sugiere que, de todos los lípidos del testículo, son los TAG los que cumplen un rol especial en el metabolismo, almacenamiento y tráfico de PUFA (Furlan NE y col, 2003).

Si las células germinales en desarrollo sintetizan su propio 22:5n6 o dependen de las células de Sertoli para obtenerlo aun no ha sido establecido. La síntesis del 22:5n6 a partir de AA es un proceso complejo que implica dos elongaciones sucesivas en el RE para obtener el 24:4n6, seguidas de una desaturación realizada por la $\Delta 6$ desaturasa para obtener el AG 24:5n6, y por último una β -oxidación en peroxisomas para dar el 22:5n6. Las elongasas necesarias para este proceso (*elovl2* y *elovl5*) han sido descritas tanto en las células de la línea germinal como en las células de Sertoli (Oresti GM y col, 2010), mientras que la enzima $\Delta 6$ desaturasa se expresa en las células de Sertoli (Sæther T y col, 2003). Por lo tanto, aunque las células germinales presentan un mayor contenido de GPL con PUFA de 22C que las células de Sertoli, es en estas últimas donde se expresan principalmente las desaturasas y las elongasas necesarias para convertir los AG esenciales 18:2n6 y 18:3n6 en 22:5n6 y 22:6n3, respectivamente (Furland NE y col, 2007 a).

La importancia del metabolismo de TAG en la espermatogénesis también quedó demostrada en los trabajos realizados con ratones nulos para el gen que codifica para la enzima lipasa sensible a hormonas los cuales son estériles y presentan oligospermia con pérdida de espermatozoides maduros (Osuga J y col, 2000). Esta enzima cataliza la hidrólisis de los TAG y de los CE, y se expresa en los espermatocitos primarios y en las espermátides elongadas (Blaise R y col, 2001).

Por lo tanto, los TAG testiculares podrían cumplir así una importante función en la

espermatogénesis, funcionando como las moléculas encargadas de almacenar, y posiblemente transportar los AG necesarios para la continua síntesis de los GPL de membrana de las células de la línea espermática.

HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

1. Hipótesis de trabajo

Cada uno de los pasos de la vía de síntesis *de novo* de glicerolípidos en mamíferos puede ser catalizado por numerosas isoformas enzimáticas. El primer paso de esta vía, catalizado por la enzima glicerol-3-fosfato aciltransferasa, involucra al menos cuatro isoformas producto de distintos genes. Los estudios realizados hasta el momento indican que cada una de ellas presenta un patrón de expresión específico de tejido, diferentes localizaciones subcelulares y distintos modos de regulación. Esto sugiere que cada una de estas isoformas cumpliría una función específica en el tejido en el cual se expresa.

En este trabajo de tesis focalizamos nuestros estudios en la función de la isoforma 2 de GPAT (GPAT2), que es una proteína mitocondrial que se expresa principalmente en testículos. Como hipótesis planteamos que GPAT2 estaría involucrada en la síntesis de los triacilgliceroles con un alto contenido de PUFA característicos de este órgano, y necesarios para un normal desarrollo de la espermatogénesis.

2. Objetivos

Teniendo en cuenta la importancia del metabolismo de los TAG en testículo, y su particular composición en AG, nos planteamos los siguientes objetivos:

1. Estudiar la afinidad de la isoforma GPAT2 por diferentes sustratos *in vitro* y su función en la síntesis de TAG, para determinar si la misma podría estar involucrada en la síntesis de los TAG con alto contenido de PUFA presentes en este órgano.
2. Determinar si el producto del gen *Gpat2* es activo en testículo de rata.
3. Determinar la localización celular de *Gpat2* en el testículo.
4. Estudiar la expresión y actividad de *Gpat2* durante el desarrollo postnatal.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las composiciones de los buffers y soluciones nombrados en este capítulo se encuentran detalladas en el Anexo 2.

1. MODELOS EXPERIMENTALES

1.1. *Rattus norvegicus*

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar de 19, 30, 40 y 60 días de edad, provenientes del Bioterio General de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de La Plata.

Los animales se mantuvieron en el cuarto de cría con ciclos fijos de luz/oscuridad y a temperatura controlada (23°C). Fueron alimentados con un alimento comercial completo para roedores (Cargill). Tanto el alimento como el agua se les administraron *ad libitum*.

La eutanasia fue realizada por decapitación por personal experimentado del bioterio. Luego de la misma se extrajeron los testículos y se colocaron en buffer fosfato salino (PBS).

1.2. Cultivos celulares

Como modelo de célula eucariota se utilizó a la línea CHO-K1 (ATCC CCL-61), que es un sub-clon derivado de una línea parental obtenida a partir de una biopsia de ovario de hámster chino adulto. Esta línea de células se utiliza comúnmente para la expresión de proteínas heterólogas.

Las células fueron cultivadas rutinariamente en botellas T75 en medio esencial mínimo (MEM, GIBCO) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS), 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina (medio completo). Las botellas se mantuvieron en una estufa de cultivo a 37°C, en atmósfera con 5% de CO₂ y humedad controlada. Los subcultivos se realizaron en placas de Petri de 60 mm de diámetro. Para ello se retiró el medio de cultivo de las botellas, se enjuagó la superficie celular con 5 ml de buffer fosfato salino (PBS) estéril para remover completamente el suero, se agregaron 0,5 ml de solución de tripsina 0,25% (p/v) en EDTA 0,5 mM y se procedió a observar las células en un microscopio invertido. Una vez despegadas las células se agregó a la botella 5 ml de medio completo, se dispersaron las células y se agregaron alícuotas de 0,5 ml por placa

de 60 mm, en un volumen final de 3 ml de medio completo. Estas placas fueron incubadas en iguales condiciones a las descritas para las botellas.

2. OBTENCIÓN DE FRACCIONES SUBCELULARES DE TESTÍCULO DE RATA

Las técnicas descritas a continuación y utilizadas para obtener las distintas fracciones subcelulares fueron previamente utilizadas en nuestro laboratorio con muestras de hígado de rata (Pello-Maison y col, 2007).

2.1. Obtención de homogenatos, mitocondrias crudas y microsomas

Una vez extraído el órgano se enjuagó con PBS y se sumergió en 10 ml de buffer H enfriado en hielo y suplementado con un 0,002% v/v de cocktail inhibidor de proteasas (SIGMA), se pesó y se completo el volumen con buffer H de modo de obtener una relación de 5 ml de buffer H/gramo de testículo. En el caso de los testículos provenientes de ratas de 19 y 30 días se procesaron varios de ellos en simultáneo. Los órganos se cortaron en trozos pequeños utilizando tijeras de cirugía, se colocaron en un homogeneizador de vidrio/teflón tipo Potter, y se homogeneizó el tejido de manera mecánica utilizando un sistema motorizado (Tri-R Instruments, 1000 rpm). Este material se centrifugó por dos veces a 600 x g durante 5 minutos a 4°C en una centrífuga Sorvall RC-100 para eliminar los materiales más pesados (restos de tejidos, células enteras y núcleos). En esta tesis se va a denominar homogenato al sobrenadante obtenido luego de estas dos centrifugaciones.

Para obtener la fracción mitocondrias crudas y microsomas el homogenato se centrifugó a 10.000 x g durante 15 minutos a 4°C en una centrífuga Sorvall RC-10, obteniéndose un sobrenadante y un pellet. El pellet se resuspendió en 1 ml de buffer H/gramo de tejido, se colocó en un homogeneizador manual con vástago de vidrio y se procedió a su homogenización, de esta manera se obtuvo la fracción denominada mitocondrias crudas. El sobrenadante se centrifugó a 100.000 x g durante 1 hora a 4°C en una ultracentrífuga Beckman LE-80K utilizando el rotor 70.1 Ti, y el pellet obtenido se resuspendió en buffer H, obteniéndose así la fracción denominada microsomas.

2.2. Obtención de mitocondrias puras

Para obtener las mitocondrias puras se utilizó un método descrito previamente (Hovius R y col, 1990) modificado en nuestro laboratorio (Pellon-Maison y col, 2007). El procedimiento consiste en realizar una centrifugación isopícnica en un gradiente de

densidad generado utilizando el polímero sintético Percoll (GE Healthcare). El Percoll es una dispersión coloidal de partículas de sílica recubiertas con polivinilpirrolidona de 15 a 30 nm de diámetro, y puede utilizarse para generar gradientes continuos, discontinuos y gradientes generados *in situ* ya que cuando la dispersión se centrifuga a más de 10.000 x g en un rotor de ángulo fijo las partículas sedimentan formando un gradiente de densidad a lo largo del tubo. Como el Percoll tiene muy baja osmolaridad al formarse el gradiente de densidad no se genera un gradiente de osmolaridad.

En este método de purificación de mitocondrias se utilizó un gradiente generado *in situ*. Para ello se preparó una dispersión de Percoll al 30% v/v en un medio isotónico mezclando 3 ml de Percoll, 5 ml de buffer H 2X con inhibidor de proteasas y 2 ml de agua destilada. Se colocaron 9 ml de esta dispersión en un tubo de policarbonato (Beckman) y por encima de ella se colocó 1 ml de la suspensión de mitocondrias crudas. Los tubos se centrifugaron en una ultracentrífuga Beckman LE-80K a 95.000 x g durante 30 minutos a 4 °C en el rotor 70.1 Ti. Al finalizar esta centrifugación se obtienen dos bandas, una banda inferior de color marrón oscuro y una banda superior amarillenta.

La banda inferior se colectó con una jeringa Hamilton de 500 µl, se diluyó 4 veces con buffer H y se centrifugó a 10.000 x g durante 10 minutos a 4 °C. El pellet obtenido se lavó dos veces con buffer H para eliminar el Percoll y se resuspendió en este mismo buffer, esta es la fracción denominada mitocondrias puras.

3. OBTENCIÓN DE LA FRACCIÓN MEMBRANAS TOTALES DE CÉLULAS EN CULTIVO

Las monocapas de células CHO-K1 crecidas en placas de 60 mm de diámetro se colocaron sobre hielo y se retiró el medio de cultivo. En el caso de células cultivadas para realizar medidas de actividad enzimática las monocapas se enjuagaron dos veces con buffer PBS enfriado en hielo. En el caso de células cultivadas para realizar ensayos de composición lipídica las monocapas se lavaron una vez con buffer PBS enfriado en hielo, luego dos veces con una solución de albúmina libre de ácidos grasos esenciales (Sigma A6003) al 0.5% en buffer PBS y por último una vez más con buffer PBS. Una vez lavadas las monocapas se agregaron 500 µl de buffer H con inhibidor de proteasas y se rasparon las células utilizando una espátula plástica. Se enjuagó la placa con 500 µl del mismo buffer y ambos volúmenes fueron transferidos a un homogeneizador tipo Potter de vidrio/teflón de 1 ml de capacidad. Se homogenizó el material y se centrifugó a 16.000 x g en una microcentrífuga de mesa durante 15 minutos a 4 °C. El pellet se resuspendió en 200 µl de buffer H con inhibidor de proteasas por placa de 60 mm, a este material se lo denominó

fracción membranas totales. Estas fracciones fueron utilizadas inmediatamente o guardadas a -70°C hasta el momento de ser usadas.

4. OBTENCIÓN DE DIFERENTES TIPOS CELULARES A PARTIR DE TESTÍCULO DE RATA

Se utilizaron diferentes tratamientos enzimáticos para obtener células de Sertoli y de Leydig a partir de testículos de rata de 60 días, así como también, una fracción enriquecida en túbulos seminíferos.

4.1. Obtención de células de Leydig y de una fracción enriquecida en túbulos seminíferos

Las células de Leydig y la fracción enriquecida en túbulos seminíferos se obtuvieron incubando primero los testículos decapsulados (4 testículos) con 8 ml de solución de colagenasa (Worthington CLS1, 0.3 mg/ml en buffer Krebs Ringer Bicarbonato Glucosa-Albúmina, KRGB-A) por 30 minutos a 34°C con agitación suave. Luego se agregó buffer KRGB-A hasta completar 40 ml, se disgregó la muestra por pipeteo y se filtró por gasa doble. Del filtrado se separaron las células de Leydig por centrifugación a $100 \times g$ durante 15 minutos. Las células se lavaron tres veces con 20 ml cada vez de buffer KRGB-Mg⁺⁺, centrifugando a $100 \times g$ durante 15 minutos y eliminando el sobrenadante. Finalmente las células se resuspendieron en 3 ml de buffer KRGB-Mg⁺⁺, se fraccionaron y se guardaron a -70°C hasta su utilización (Hurtado de Catalfo GE y col, 1992).

El material no filtrado fue lavado 2 veces con buffer KRGB-A, decantado por centrifugación, resuspendido en 5 ml de buffer KRGB-Mg⁺⁺, fraccionado y guardado a -70°C para ser utilizado como fracción enriquecida en túbulos seminíferos.

4.2. Obtención de células de Sertoli

Las células de Sertoli se obtuvieron realizando sobre los testículos decapsulados y cortados con tijera 3 tratamientos enzimáticos sucesivos. Primero se incubaron a 34°C por 30 minutos con tripsina (Sigma T7409, 0.25% p/v en buffer HBSS) y DNAsa (Sigma DN25, 0.5 mg/ml), y se centrifugaron a $100 \times g$ durante 10 minutos. El pellet se lavó una vez con DMEM (medio esencial mínimo modificado por Dulbecco) 10% FBS y una vez con HBSS 1% FBS para inhibir la acción de la tripsina.

Luego el pellet se trató con colagenasa (1 mg/ml en buffer HBSS) y hialuronidasa (Sigma H2126, 1 mg/ml en buffer HBSS) por 30 minutos a 34°C ; transcurrido ese tiempo se centrifugó a $100 \times g$ por 10 minutos y se lavó una vez con buffer HBSS 1% FBS.

Por último el pellet se incubó con hialuronidasa (1 mg/ ml buffer HBSS) por 30 minutos a 34 °C, se centrifugó 100 x g durante 10 minutos y se lavó tres veces con HBSS 1% FBS. Finalmente las células de Sertoli se resuspendieron en buffer HBSS, se alicuotaron y se guardaron a – 70 °C hasta su utilización (Hurtado de Catalfo GE y col, 1992).

La pureza de las fracciones obtenidas se evaluó por Western blot, utilizando anticuerpos comerciales anti proteína Star (Santa Cruz Biotechnology), anti proteína SCP3 (Santa Cruz Biotechnology) y anti $\Delta 6$ desaturasa (obtenido por el Dr. Omar Rimoldi, INIBIOLP) como marcadores de células de Leydig, línea espermática y Sertoli respectivamente.

5. DETERMINACIÓN DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS

5.1. Medida de la actividad Glicerol-3-fosfato aciltransferasa

La actividad GPAT (EC2.3.1.15) se midió según un protocolo descrito previamente (Gonzalez-Baró y col, 2001) con modificaciones. La mezcla de reacción utilizada contiene: buffer Tris-HCl 75 mM pH 7,4; MgCl₂ 4 mM; albúmina sérica bovina (BSA) 2 mg/ml; NaF 8 mM; ditioneitol (DTT) 1 mM; glicerol-3-fosfato 0,8 mM (0,5 μ Ci [¹⁴C]glicerol-3-fosfato, GE Healthcare) y 60 μ M del acilgraso-CoA correspondiente. La reacción se inició con el agregado de 100 μ g de proteínas de la muestra disueltos en el volumen apropiado de una solución isotónica de modo de completar un volumen final de 200 μ l, y se incubó durante 10 minutos a 37°C. Transcurrido ese tiempo la reacción se frenó agregando 600 μ l de HClO₄ 1% y la radiactividad correspondiente a los productos de reacción solubles en cloroformo se determinó en un contador de centelleo líquido.

Para determinar la actividad GPAT NEM sensible se midió la actividad total (actividad GPAT), y la actividad resultante luego de incubar la muestra en hielo con 2 mM de NEM durante 30 minutos (actividad GPAT NEM resistente). La actividad GPAT NEM sensible se obtuvo calculando la diferencia entre estos dos valores.

Los valores medidos corresponden a velocidades iniciales.

5.2. Medida de la actividad NADPH citocromo c reductasa

La NADPH citocromo c reductasa (EC 1.6.2.4) es una flavoproteína que transfiere electrones desde el NADPH hacia diferentes oxigenasas. Se localiza en el RE por lo que se la utiliza como enzima marcadora de esta fracción celular. Para su determinación se utilizó un kit comercial colorimétrico (Sigma, número de catálogo CY0100) que permite

medir el aumento de absorbancia a 550 nm que ocurre cuando el citocromo c es reducido por la NADPH citocromo c reductasa. La mezcla de reacción utilizada contiene buffer fosfato de potasio 300 mM, pH: 7,8; EDTA 0,1 mM; BSA 0,5 mg/ml; citocromo c 36 μ M; y la cantidad apropiada de muestra. La reacción se inicia con el agregado de 100 μ l de la solución de NADPH 0,85 mg/ml, de modo de completar un volumen final de 1 ml, y se procede a medir la absorbancia a 550 nm cada 10 segundos, durante los primeros 90 segundos de reacción. Esto nos permite obtener la velocidad inicial de reacción, con lo que se calcula la actividad específica de las muestras. La unidad enzimática se define como la cantidad de enzima que reduce 1 μ mol de citocromo c oxidado, en presencia de 100 μ M de NADPH, por minuto, a 25 °C y pH: 7,8.

6. PROTOCOLOS GENERALES DE TRABAJO CON PROTEÍNAS

6.1. Cuantificación

El contenido de proteínas en las muestras se determinó utilizando la técnica de Lowry (Lowry OH y col, 1951). Esta técnica consiste en realizar una reacción colorimétrica en dos pasos. En el primero se forma un complejo cobre-proteína en un medio alcalino, y en el segundo se utiliza este complejo para reducir un reactivo fosfomolibdico-fosfotúngstico (reactivo de Folin), produciéndose así un compuesto de color azul intenso de manera proporcional a la cantidad de enlaces peptídicos presentes en la muestra. La intensidad de color se cuantificó a 750 nm en un espectrofotómetro modelo Ultrospec 2100 pro (Amersham Bioscience). En cada determinación se realizó una curva de calibración utilizando BSA como proteína patrón.

6.2. Identificación de proteínas por la técnica de Western blot

6.2.1. Anticuerpos utilizados

6.2.1.1. Anticuerpos primarios

6.2.1.1.1. Anticuerpo anti-VDAC: detecta la proteína denominada canal aniónico dependiente de voltaje o porina mitocondrial (VDAC, *voltaje-dependent anion channel*), que se localiza en la membrana mitocondrial externa. Existen dos isoformas de esta proteína, VDAC1 y VDAC2, y para su detección se utilizó el anticuerpo policlonal comercial obtenido en conejo (Affinity BioReagents, número de catálogo PA1-954), diluido 1/1000 en leche descremada al 1% en buffer PBS-T. El anticuerpo detecta ambas

isoformas, generando una banda doble a un peso aproximado de 30 KDa. Este anticuerpo se utilizó como marcador de membranas mitocondriales y como control interno de siembra (*housekeeping*) para las muestras de mitocondrias puras.

6.2.1.1.2. Anticuerpo anti-FLAG: reconoce la secuencia aminoacídica DYKDDDDK, que se adiciona como epitope antigénico en la construcción de proteínas de expresión heteróloga. Se utilizó el anticuerpo monoclonal comercial M2 (Sigma, código de producto F3165), diluido 1/2500 en leche descremada al 1% en buffer PBS-T.

6.2.1.1.3. Anticuerpo anti-SCP3: reconoce la proteína 3 del complejo sinaptonémico, complejo proteico involucrado en la separación de los cromosomas homólogos durante la meiosis. Se utilizó el anticuerpo policlonal comercial (Santa Cruz Biotechnology, número de catálogo sc-33195), diluido 1/1000 en leche descremada al 1% en PBS-T. Este anticuerpo se utilizó como marcador de células de la línea espermática (Parra MT y col, 2004).

6.2.1.1.4. Anticuerpo anti-Star: reconoce la proteína de 30 KDa denominada regulador agudo de la estereidogénesis, que participa en el transporte del colesterol hacia la membrana mitocondrial interna. Se utilizó el anticuerpo policlonal comercial (Santa Cruz Biotechnology, número de catálogo sc-25806), diluido 1/1000 en leche descremada al 1% en PBS-T. Este anticuerpo se utilizó como marcador de células de Leydig (Castilla RM y col, 2008; Masanori K y col, 1999).

6.2.1.1.5. Anticuerpo anti- $\Delta 6$ desaturasa: reconoce la enzima $\Delta 6$ desaturasa de rata. Esta enzima participa en la síntesis de PUFA a partir de ácidos grasos esenciales, y se localiza en el RE. El anticuerpo fue cedido por el Dr Omar Rimoldi, miembro del Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata, y para su obtención la enzima $\Delta 6$ desaturasa de rata fue sobre-expresada en bacterias de la cepa BL-21, purificada e inyectada en conejos para obtener un anticuerpo policlonal que se utilizó diluido 1/3000 en leche descremada al 1% en PBS-T. Este anticuerpo se utilizó como marcador de células de Sertoli. (Sæther T y col, 2003)

6.2.1.1.6. Anticuerpo anti-GPAT2: reconoce específicamente la isoforma 2 de la enzima glicerol-3-fosfatoaciltransferasa. Se utilizó el anticuerpo comercial anti-GPAT2 humana (Sigma, número de catálogo HPA036841), diluido 1/1000 en leche descremada al 1% en PBS-T.

6.2.2. Anticuerpos secundarios

6.2.1.2.1. Anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado a peroxidasa: se utilizó un anticuerpo policlonal comercial (Pierce, código de producto 31460), diluido de 1/3000 a 1/5000 en leche descremada al 1% en PBS-T.

6.2.1.2.2. Anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado a peroxidasa: se utilizó un anticuerpo policlonal comercial (Pierce, código de producto 31168), diluido de 1/3000 a 1/5000 en leche descremada al 1% en PBS-T.

6.2.2. Separación de proteínas

Para producir la separación de las proteínas presentes en las muestras se realizaron electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia del detergente dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE). Esta técnica fue descrita por Laemmli (Laemmli UK, 1970), y se trata de un tipo de electroforesis desnaturalizante en la que las proteínas de la muestra se desnaturalizan por calor en presencia de β -mercaptoetanol, que reduce los puentes disulfuro, y del detergente dodecilsulfato de sodio (SDS). Este detergente se une a las cadenas polipeptídicas desnaturalizadas en una relación aproximada de una molécula de SDS cada dos aminoácidos. Esto bloquea la carga propia de la molécula de proteína y le confiere al complejo una carga neta negativa que es proporcional a su masa, haciendo que todas las proteínas complejadas con SDS se desplacen hacia el ánodo. Debido a que la velocidad de migración de los complejos SDS-proteína es proporcional solo a la masa de la proteína, se puede entonces determinar el peso molecular aparente de cualquier proteína, por comparación con un patrón de proteínas de pesos moleculares conocidos.

Se utilizaron geles de poliacrilamida continuos (8% o 10% según corresponda) y para el armado de los mismos y la corrida electroforética se utilizó el sistema comercial Mini-Protean[®] III de BioRad, siguiendo las instrucciones del fabricante. Las corridas se realizaron a 120 V utilizando una fuente de poder modelo PowerPac Basic Power Supply de BioRad.

6.2.3. Transferencia

Las proteínas separadas por SDS-PAGE fueron trasferidas a membranas de difluoruro de polivililenedeno (PVDF, Immun-Blot PVDF membrane, BioRad) utilizando el sistema húmedo Mini Trans-Blot Cell de BioRad. Previo a la transferencia, tanto la

membrana como el gel y los papeles de filtro accesorios se equilibraron durante 10 minutos en buffer de transferencia. La transferencia se realizó durante 1 hora a 100 V.

6.2.4. Incubación de la membrana con los anticuerpos

Luego de la transferencia las membranas se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación suave, o toda la noche a 4°C, con una solución de bloqueo de leche descremada en polvo (marca Svelty, Nestlé) al 5% en buffer PBS-T.

A continuación se agregó el anticuerpo primario correspondiente a la dilución apropiada en leche descremada al 1% en PBS-T y se incubó por 1,5 hs a temperatura ambiente con agitación suave. Cumplido ese tiempo se realizaron seis lavados de 5 min cada uno con agitación, con buffer PBS-T. Luego la membrana se incubó con el anticuerpo secundario a la dilución apropiada en leche descremada al 1% en PBS-T y se incubó a temperatura ambiente durante 1,5 hs con agitación suave. Finalmente, se realizaron seis lavados con buffer PBS-T y se procedió al revelado.

6.2.5. Revelado por quimioluminiscencia

Para el revelado se prepararon la solución de revelado A (luminol 0,044 gr/ml (Sigma, número de catalogo A8511) en DMSO, 50 µl; ácido p-cumárico 0,015 gr/ml (Sigma, número de catalogo C9008) en DMSO, 22 µl; Tris-HCl 1,5 M pH 8,5, 335 µl; agua bidestilada c.s.p. 5 ml) y la solución de revelado B (H₂O₂ 110 volúmenes 6 µl; Tris-HCl 1,5 M, pH 8,5, 335 µl; agua bidestilada c.s.p. 5 ml). En el cuarto de revelado, se mezclaron las soluciones A y B, y se incubó la membrana con dicha mezcla durante 1,5 minutos. Posteriormente, se secó la membrana entre papeles de filtro, se colocó en un cassette de exposición (Kodak) y se expuso durante 1-5 minutos ante una placa radiográfica (Hyperfilm ECL, Amersham Biosciences). Luego se colocó la placa radiográfica en solución reveladora durante 1 min, o hasta la aparición de las bandas. A continuación la placa se retiró de la solución reveladora, se enjuagó rápidamente con agua corriente, y se sumergió en solución fijadora por 1 min. Por último, la placa revelada se dejó secar y se procedió al análisis de las bandas obtenidas. Para ello se digitalizó la placa radiográfica, y se analizó la imagen mediante el software Digital Science (Kodak).

6.3. Identificación de proteínas por la técnica de inmunofluorescencia

Para determinar la localización celular de la proteína GPAT2 se realizó una técnica de inmunolocalización utilizando testículos de ratas de 60 días de edad.

6.3.1. Preparación de las muestras.

Los tacos de parafina para realizar los cortes histológicos fueron preparados en la Cátedra de Histología de la Facultad de Ciencias Médicas de la UNLP. Brevemente, los testículos fueron fijados con solución de Bouin por 12 hs, lavados con agua y PBS, deshidratados por pasajes sucesivos por soluciones de etanol de graduación creciente y luego por xileno, embebidos en parafina y cortados en láminas de 4 μm de espesor que se colocaron sobre portaobjetos previamente silanizados.

6.3.2. Incubación con los anticuerpos

Las muestras fueron desparafinadas en xilol, rehidratadas por pasajes sucesivos en soluciones de etanol de graduación descendente y PBS. Luego fueron calentadas por 10 minutos a 100 °C en buffer citrato de sodio 10 mM, pH: 6 para mejorar la exposición de los epitopes antigénicos, y bloqueadas por 1 h a temperatura ambiente en una solución de suero normal de caballo (Natocor) al 10%, en BSA al 1% en PBS. Por último se incubaron con una dilución 1/100 del anticuerpo anti-GPAT2 en PBS, o con PBS (como control negativo) durante toda la noche a 4 °C, y luego con una dilución 1/150 del anticuerpo secundario (anti IgG de conejo marcado con Alexa-Fluor® 488, Thermo Pierce) durante 2 hs a temperatura ambiente, realizando lavados de 5 minutos con PBS entre ambas incubaciones y al final. Los núcleos fueron coloreados con Ioduro de propidio (Invitrogen) y las muestras se visualizaron en un microscopio de fluorescencia Olympus BX52.

7. PROTOCOLOS GENERALES DE TRABAJO CON ADN

7.1. Cuantificación

Para cuantificar las muestras de ADN (preparaciones de plásmidos, oligonucleótidos usados como cebadores, etc) se midió la absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro marca Ultrospec 2100 pro (Amersham Bioscience). Para calcular la concentración de ADN se tuvo en cuenta la posible contaminación de la muestra con proteínas (medida de absorbancia a 280 nm) y se realizó la corrección correspondiente.

Alternativamente la cuantificación del ADN se realizó utilizando el fluorómetro QuBit y los reactivos correspondientes (Invitrogen).

7.2. Cepas bacterianas

La cepa de bacterias empleada fue la JM109 de la bacteria *Escherichia coli*; esta cepa carece de los genes que codifican para la endonucleasa A y para la recombinasa A, por lo que resulta apropiada para las técnicas de clonado ya que facilita la estabilidad y la calidad de las preparaciones de plásmidos obtenidas a partir de la misma. Esta cepa es sensible al antibiótico ampicilina.

7.3. Medios de cultivo

Se utilizó el medio Luria Bertani (LB) como medio líquido, y el medio LB adicionado con 1,5% de agar-agar (LB agar) como medio de cultivo sólido. Ambos medios de cultivo se esterilizaron en autoclave.

7.4. Preparación de bacterias competentes

Se utilizó el método descrito por Sambrook (Sambrook J y col, 2001). Para ello se partió de un stock de bacterias *E. coli* de la cepa JM109 conservado a -70°C en medio LB adicionado con 15% v/v de glicerol, las cuales se crecieron por estría en placas de LB agar que fueron incubadas a 37°C durante una noche. Luego se transfirió una colonia aislada a 25 ml de medio LB, y se incubó durante 6-8 horas a 37°C . Se tomó 1 ml de este cultivo saturado y se lo usó para inocular 100 ml de medio LB, que se dejó creciendo toda la noche a $18-22^{\circ}\text{C}$ con agitación hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm de 0,5. Al día siguiente, las bacterias se enfriaron en hielo durante 10 minutos y se colectaron por centrifugación en tubos tipo Falcon estériles a $5.000 \times g$ durante 10 minutos a 4°C . Se descartó el sobrenadante, se resuspendió el pellet de bacterias en 32 ml de solución de competencia estéril enfriada en hielo, y se centrifugó nuevamente de la misma manera. El sobrenadante se descartó y el pellet de bacterias se resuspendió en 8 ml de solución de competencia adicionado con 7% v/v de dimetilsulfóxido (DMSO). Por último, las bacterias se fraccionaron de a 200 μl y se reservaron a -70°C hasta su uso.

7.5. Transformación de bacterias competentes con ADN plasmídico

Para realizar la transformación de las bacterias competentes se siguió el protocolo descrito por Sambrook (Sambrook, J y col, 2001). Para ello se adicionaron aproximadamente 10 ng de ADN plasmídico a 200 μl de la suspensión de bacterias competentes, y la mezcla se incubó en hielo durante 30 min. Luego el tubo se transfirió a un baño de agua a 42°C para realizar un shock térmico de 90 segundos de duración.

Transcurrido ese tiempo se colocó el tubo inmediatamente en hielo, se agregaron 0,8 ml de medio SOC y se incubó 1 h a 37°C. Luego de la incubación, las bacterias se sembraron en placas de LB agar con ampicilina (100 µg/ml), y se incubaron a 37°C durante una noche para que se desarrollen las colonias transformantes.

7.6. Preparación de ADN plasmídico a baja escala (miniprep)

Los fragmentos de ADN que codifican para las proteínas GPAT2 de ratón y GPAT1 de rata, conteniendo la secuencia de nucleótidos correspondiente al epítipo antigénico FLAG en su extremo 3', y clonados en el plásmido pcDNA3.1 (Invitrogen) fueron generosamente cedidos por la Dra Rosalind Coleman.

Para realizar la preparación de plásmidos a baja escala se transfirieron colonias individuales de las bacterias transformadas con el plásmido de interés a tubos Falcon de 50 ml conteniendo 5 ml de medio LB con 100 µg/ml de ampicilina, y se incubaron durante una noche a 37°C con agitación fuerte (175-200 rpm). A continuación, se transfirió aproximadamente 1,5 ml del cultivo en forma estéril a un tubo Eppendorf, se centrifugó a 12.000 x g durante 2 min a 4°C para obtener el pellet de bacterias; y el ADN plasmídico se purificó utilizando un kit comercial (GFX microplasmid kit, GE Healthcare, número de catálogo 27-9601-02, o Quia-spin miniprep de Quiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante.

7.7. Preparación de ADN plasmídico a gran escala (maxiprep)

Se inocularon 100 ml de medio LB conteniendo 100 µg/ml de ampicilina con 0,5 ml de un cultivo primario de las bacterias conteniendo el plásmido de interés, y se incubó el cultivo durante 12-16 hs a 37°C con agitación enérgica. Transcurrido ese tiempo se centrifugó el cultivo durante 10 min a 5.000 x g para separar las bacterias y la obtención del ADN plasmídico se realizó utilizando un kit comercial de la compañía Invitrogen (PureLink HiPure Plasmid DNA, número de catálogo K2100-04), siguiendo las instrucciones del fabricante.

7.8. Digestión con enzimas de restricción

Los cortes con enzimas de restricción se realizaron siguiendo estrictamente las instrucciones del fabricante (New England Biolabs). La mezcla de reacción típica para este protocolo contiene: buffer de reacción adecuado 10X (1µl), ADN a analizar (50–100 ng), la o las correspondientes enzimas de restricción (2-5 unidades), y agua libre de

nucleasas (c.s.p 10 μ l). La mezcla de reacción se incubó durante 1-2 hs a la temperatura correspondiente para la enzima que se esté utilizando. Finalizada la incubación se adicionan 2 μ l de buffer de siembra para ADN 6X (Sambrook, J y col, 2001).

7.9. Electroforesis en geles de agarosa

Para la preparación de los geles se utilizó Agarosa M (Amersham Bioscience) a una concentración de 0,8 a 1,5 % en peso según corresponda, disuelta en buffer TBE. Se sembraron las muestras y los estándares de peso molecular comerciales adecuados, y las corridas electroforéticas se realizaron en una cuba horizontal (Hoeffer HA 33, Amersham Bioscience) a 100 V, durante 45 a 60 minutos, utilizando TBE como buffer de corrida.

Los geles se tiñeron con solución de bromuro de etidio (0,5 μ g/ml) y las bandas de ADN se observaron por transiluminación UV (Hoefer MacroVue UV-20). Para realizar el análisis correspondiente, los geles se fotografiaron utilizando una cámara de fotos digital KD120 (Kodak) y se analizaron con el software Kodak Digital Science 1D (Kodak).

Alternativamente desde el año 2008 y por razones de bioseguridad los geles para la detección de ácidos nucleicos se tiñen utilizando el colorante Sybr-Safe (Invitrogen).

7.10. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para estos experimentos se utilizó un ciclador modelo PCR Express (Thermo-Hybaidd). Una mezcla de reacción típica para realizar esta técnica contiene: ADN molde (1-10 ng), buffer de reacción Pfu 1X (Stratagene); desoxirribonucleotidos trifosfato (dNTPs) 200 μ M, cebadores 2 μ M de cada uno, 2,5 unidades de Pfu polimerasa (Stratagene) y agua libre de nucleasas (c.s.p 50 μ l).

Para realizar la amplificación se programaron 30-35 ciclos con los siguientes pasos: 1 min a 94°C (temperatura de desnaturalización), 0,5-2 min a 55-62°C (temperatura de apareamiento) y 0,5-2 min a 72°C (temperatura de elongación), precedidos por una desnaturalización del ADN molde de 4-5 min a 94°C (Sambrook J y col, 2001). El producto de la PCR se utilizó inmediatamente, o se conservó a -20°C hasta su posterior análisis y utilización.

7.11. Transfección de ADN plasmídico a células en cultivo

Para la transfección transitoria de las distintas construcciones se utilizaron liposomas catiónicos comerciales (Lipofectamine 2000, Invitrogen), el ADN de interés (cDNA correspondiente a GPAT2 o a GPAT1) clonado en el vector de expresión eucariota

pcDNA3.1 de Invitrogen, que confiere resistencia al antibiótico geneticina, y células CHO-K1 crecidas al ~80-90% de confluencia en placas de Petri de 60 mm.

Se utilizó una mezcla de transfección con una relación 1 µg de ADN (pcDNA3.1 Invitrogen, con el inserto correspondiente):3 µl de lipofectamina2000, preparada de la siguiente manera:

Tubo 1: 6 µg de ADN + 500 µl de DMEM sin FBS ni antibiótico/antimicótico.

Tubo 2: 18 µl de lipofectamina2000 + 500 µl de DMEM sin SFB ni antibiótico/antimicótico.

Cada tubo fue incubado por separado a temperatura ambiente durante 5 min. Luego, se mezcló el contenido de ambos tubos, y se incubó a temperatura ambiente por 20 min. Durante ese tiempo se lavaron las monocapas de células por tres veces con 1 ml de PBS estéril cada vez, para asegurar la eliminación completa de suero y/o antibiótico/antimicótico. Luego de los 20 minutos, se agregó la totalidad de la mezcla de transfección a la placa de células, se adicionó 1 ml de DMEM y se incubó a 37°C durante 5 hs. Pasadas ese tiempo se eliminó el medio con la mezcla de transfección, se lo reemplazó por 2,5 ml de DMEM 10% FBS y se incubaron las células durante 24 hs.

8. PROTOCOLOS GENERALES DE TRABAJO CON ARN

Para preparar todos los buffers y soluciones de trabajo con ARN, así como para enjuagar el material se utilizó agua bidestilada estéril o agua tratada con dietilpirocarbonato (Sigma D5757) y posteriormente autoclavada.

8.1. Cuantificación

Para cuantificar las muestras de ARN se midió la absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro marca Ultrospec 2100 pro (Amersham Bioscience). Para calcular la concentración de ARN se tuvieron en cuenta las posibles contaminaciones de la muestra (medida de absorbancia a 230 y 280 nm, para fenol y proteínas, respectivamente) y se realizaron las correcciones correspondientes.

Alternativamente la cuantificación del ARN se realizó utilizando el fluorómetro QuBit y los reactivos correspondientes (Invitrogen).

8.2. Aislamiento de ARN total

El ARN total de las muestras se obtuvo utilizando el reactivo Trizol (Invitrogen) o el kit comercial Total RNA minikit (BioRad), siguiendo en ambos casos las instrucciones

especificadas por el fabricante. Brevemente, el reactivo Trizol consiste en una solución monofásica de fenol e isotiocianato de guanidinio, que mantiene la integridad del ARN durante la homogeneización. Para aislar el ARN se adiciona cloroformo y se realiza una centrifugación que separa la solución en dos fases, quedando el ARN en la fase acuosa, a partir de la cual se lo recupera por precipitación con isopropanol. En el caso del kit comercial el protocolo consta de una homogeneización del tejido en un buffer de lisis, de un tratamiento térmico suave del homogenato y de una purificación a través de columnas de afinidad con un paso intermedio de tratamiento con DNAsa. Una vez obtenido el ARN se separaron alícuotas para realizar la cuantificación y el control de la obtención.

Una vez cuantificado, se alicuotó en fracciones de 20 µg, se llevó a seco mediante evaporación en Speed Vac (Variant) y se almacenó a -70°C hasta su posterior utilización.

8.3. Control del ARN obtenido

Para controlar la integridad el ARN obtenido se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% p/v en buffer TBE estéril. La muestra se disolvió en buffer de siembra para ARN 6X y la corrida electroforética se realizó en una cuba horizontal (Pharmacia Biotech GNA100) a 100 V, durante 45 a 60 minutos, utilizando TBE estéril como buffer de corrida.

Luego los geles se tiñeron con solución de bromuro de etidio (0,5 µg/ml) y se observaron por transiluminación UV (Hoefler MacroVue UV-20). Para realizar el análisis correspondiente, los geles se fotografiaron utilizando una cámara de fotos digital KD120 (Kodak) y se analizaron con el software Kodak Digital Science 1D (Kodak). Se conservaron para realizar los experimentos aquellas muestras en las que se observaron claramente las bandas correspondientes a los ARN ribosómicos 28s y 18s en una relación de 2 a 1.

8.4. Identificación de ARN mensajeros (ARNm) por Northern blot

8.4.1. Separación electroforética y transferencia

El ARN seco (20 µg) se resuspendió en 10 µl de una mezcla desnaturante para ARN agitando en vórtex, se incubó a 95°C durante 2 min y se enfrió rápidamente en hielo. Luego se adicionaron 2 µl de buffer de siembra para ARN 6X y se sembró en un gel de agarosa 1% p/v - formaldehído 0,9% p/v. Las muestras sembradas se separaron electroforéticamente utilizando buffer de corrida MOPS 1X a 5 V/cm durante 3-3,5 hs. Al finalizar la corrida, el gel se lavó con agua bidestilada estéril y posteriormente con buffer

SSC 10X estéril. Las muestras se transfirieron por capilaridad a una membrana de nylon (Hybond-XL, Amersham Pharmacia Biotech) durante 12-18 hs a temperatura ambiente, utilizando buffer SSC 10X. Una vez finalizada la transferencia, la membrana se lavó con buffer SSC 6X durante 30 min dos veces, se secó parcialmente entre papeles de filtro y se realizó el cross-linking del ARN a la membrana por exposición de la misma a luz UV por 2 min. Finalmente, la membrana se secó al vacío durante 2 hs a 80°C, quedando preparada para la etapa de hibridización (Sambrook J y col, 2001).

8.4.2. Preparación de sondas marcadas con deoxicitidina 5' trifosfato [α 32 P] e hibridización

Se diseñó una sonda específica para Gpat2 eligiendo una región del gen que no presentaba homología con las otras isoformas de Gpat.

Para obtener la sonda se amplificó por PCR una región de 385 pares de bases comprendida entre los nucleótidos 2041 y 2425, usando como molde el cDNA clonado en el vector pcDNA3.1 y los siguientes primers:

directo: CAGCATCTGAGTGCAAAGC

reverso: ACAGGTGGAGCTGGGGTCCTG

Una vez obtenido este fragmento, se procedió a la preparación de la sonda marcada propiamente dicha. Para ello se utilizó el kit Prime a Gene Labeling System (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante, y utilizando 50 μ Ci de [α - 32 P]dCTP (Amersham Biosciences) cada 25 ng de ADN molde. La incubación se realizó durante 2 hs a 23°C en un baño termostático. Al finalizar la incubación, se purificó la sonda recién preparada mediante el kit Wizard DNA Clean-up System (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante. Durante la preparación de la sonda radiactiva se realizó la pre-hibridización de la membrana obtenida en 8.4.1. Para ello se incubó la misma en solución de pre-hibridización a 43°C durante 1,5 hs, en un horno de hibridización. Luego se descartó la solución de pre-hibridización, se reemplazó por solución de hibridización conteniendo la sonda marcada previamente desnaturalizada por calor (95-100 °C, 3 minutos), y se incubó la membrana en un horno de hibridización a 43°C durante 12-18 horas.

Para normalizar la cantidad de ARN sembrado para cada una de las muestras, se utilizó una sonda para β -actina.

8.4.3. Revelado

Para revelar las señales correspondientes a los distintos ARN, se sacó la membrana de la solución de hibridización, se lavó durante 30 min por vez, de manera sucesiva, con buffer SSC 2X/SDS 0,1% p/v, SSC 0,5X/SDS 0,1% p/v y SSC 0,1X/SDS 0,1% p/v y se colocó dentro de bolsas de nylon especialmente selladas. Así preparada, la membrana se colocó dentro del cassette de exposición del equipo PhosphorImager (Molecular Dynamics). Luego de un tiempo de exposición de entre 6 y 48 hs se escaneó la imagen utilizando el programa Image Quant, y se procedió a la cuantificación de la intensidad emitida por cada banda. Los resultados se expresaron como intensidades relativas normalizadas en base a la intensidad de señal para β -actina.

8.4.4. Stripping de membranas

Para poder incubar la membrana sucesivamente con las distintas sondas se debió realizar un *stripping* (remoción de la sonda utilizada previamente) de la misma. Para ello se procedió a lavarla por dos veces durante 30 minutos con 250 ml de solución de *stripping*, calentada a 95-100 °C.

8.5. Identificación de ARNm por Hibridización *in situ*

Para realizar la técnica de hibridización *in situ* (HIS) se eligió un método indirecto, en el cual la sonda a utilizar para detectar el ARNm de interés se marca con digoxigenina. La digoxigenina es un esteroide vegetal que presenta propiedades inmunogénicas, y que puede unirse químicamente al C5 de los nucleótidos de uridina. Esta uridina marcada puede ser incorporada durante la síntesis de las moléculas de ácidos nucleicos que van a ser usadas como sondas, por medio de las correspondientes ADN o ARN polimerasas. Luego de la reacción de hibridización, las sondas son detectadas usando anticuerpos anti-digoxigenina que pueden estar conjugados a enzimas (fosfatas alcalina, peroxidas) o a moléculas fluorescentes.

La síntesis de las sondas, la preparación de las muestras, y la reacción de hibridización fueron realizadas en la In Situ Hybridization Core Facility de la Universidad de Carolina del Norte, Chapel Hill, Estados Unidos (<http://www.med.unc.edu/neuroscience/core-facilities/in-situ-hybridization>).

Las construcciones para la síntesis de las sondas se obtuvieron digiriendo el plásmido pcDNA3.1-Gpat2 con las enzimas BamH1 y EcoR1 o BamH1 y Xba1 y subclonando los fragmentos obtenidos, de 1,5 y 2,6 Kpb respectivamente, en el vector

pGEM11z(f)+ (Promega). Para marcar las sondas se utilizó el RNA Labeling kit de Roche, siguiendo las instrucciones del fabricante (Roche Diagnosis). Brevemente, los plásmidos fueron linealizados con las enzimas correspondientes y usados luego como molde para realizar una transcripción in vitro en presencia de UTP-digoxigenina, usando la SP6 ARN polimerasa y la T7 ARN polimerasa para la síntesis de las sondas sentido y antisentido respectivamente.

Para realizar la HIS se utilizaron testículos de ratones adultos (60 días) provenientes de la UNC Animal Clinical Chemistry and Gene Expression Facility (Universidad de Carolina del Norte, EEUU), los cuales fueron fijados en paraformaldehído al 4% en PBS, embebidos en medio de congelación y cortados en piezas de 5-7 μm de ancho.

8.6. Cuantificación de ARNm por PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR)

La PCR cuantitativa en tiempo real o PCR cuantitativa (qRT-PCR) es una variación de la PCR estándar que permite la cuantificación de muestras de ADN o ARN utilizando primers específicos de secuencia que permiten establecer el número de copias de una determinada secuencia de ADN o ARN presente en la muestra.

En particular, para la cuantificación de un determinado ARNm se debe realizar primero una reacción de transcripción reversa y luego la reacción de cuantificación.

Para realizar la cuantificación se utilizan primers específicos y se mide en cada ciclo de PCR la cantidad de amplicón producido mediante el agregado de un fluorocromo (que puede ser un agente intercalante como el fluoróforo Sybr Green) a la mezcla de reacción de PCR. Este fluorocromo se une de manera cuantitativa al producto amplificado de forma tal que a mayor cantidad de producto, mayor fluorescencia emitirá. Los equipos de PCR en tiempo real permiten registrar el incremento de fluorescencia (proporcional al aumento de ADN) en cada ciclo. Esta información se refleja gráficamente en curvas de cinética de la reacción para cada una de las muestras y controles. Para cada muestra el programa calcula el número de ciclo en el que el lector comienza a detectar un incremento de fluorescencia significativo, con respecto a la señal de base. El ciclo en el que se empieza a detectar este aumento de fluorescencia se denomina ciclo umbral (C_t , de *threshold cycle*, o *ciclo umbral*) y es inversamente proporcional a la concentración inicial de ADN molde presente en la muestra. Este valor de C_t es el que se utiliza en los cálculos de cuantificación.

8.6.1. Diseño y preparación de los cebadores

Para cuantificar el ARN mensajero correspondiente a *Gpat2* por qRT-PCR se utilizaron los siguientes primers:

directo: ATCCTACTGCTGCTGCACCT

reverso: ACAGCAGCTTTGCACTCAGA

Los primers fueron diseñados sobre exones diferentes (15 y 17 respectivamente) y amplifican el fragmento localizado entre los nucleótidos 1789-1975 del marco de lectura abierto correspondiente a *Gpat2*, tanto de rata como de ratón.

8.6.2. Obtención del cDNA (ADN complementario)

La reacción de transcripción reversa para obtener el cDNA se realizó a partir de 1 µg de ARN total, utilizando el iScript cDNA synthesis kit (BioRad), y siguiendo las instrucciones del fabricante. La reacción de transcripción reversa típica contiene: 2 µl de random primers, 4 µl de mix 5X, 1 µl de transcriptasa reversa, 1 µg de ARN total y c.s.p. 20 µl de agua libre de nucleasas; y se incubó durante 5 minutos a 25 °C (unión de los random primers a los ARNm), seguidos de 30 minutos a 42 °C (síntesis del cDNA) y por último 5 minutos a 85 °C para inactivar la transcriptasa reversa, en un ciclador modelo PCR Express (Thermo-Hybaid).

8.6.3. Reacción de amplificación

La cuantificación se realizó a partir del cDNA (obtenido en 8.6.2) correspondiente a 100 ng de ARN total, utilizando el kit Brilliant SYBR Green QPCR Master Mix (Stratagene) y siguiendo las instrucciones del fabricante. La reacción de amplificación típica contiene: 12 µl de supermix (Taq polimerasa, Sybr green, Rox, buffer adecuado), 2,5 µl de primer directo 1,5 µM, 2,5 µl de primer reverso 1,5 µM, 2 µl de cDNA y 6 µl de agua libre de nucleasas. La incubación en el ciclador (Stratagene MX3000) se realizó por 10 minutos a 50°C, 5 minutos a 95 °C seguidos de 40 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 1 minuto a 60 °C y 30 segundos a 72 °C. Estos experimentos fueron realizados tres veces, incluyendo en cada uno de ellos cada muestra por triplicado, y la cuantificación se realizó utilizando una curva de calibración realizada en simultáneo (Lejona S y col, 2006).

Para realizar la curva de calibración se utilizó como muestra un fragmento de ADN correspondiente a *Gpat2* obtenido por PCR a partir del plásmido correspondiente, utilizando los primers indicados en 8.6.1. Este fragmento se purificó utilizando el GFX™ PCR DNA and gel band purification kit (Amersham Bioscience, número de catálogo 27-9602-

01) y se cuantificó utilizando el fluorómetro QuBit. Por último se prepararon diferentes diluciones del mismo en agua libre de nucleasas, que se utilizaron para realizar las reacciones de amplificación en idénticas condiciones que como se describió para los cDNA obtenidos a partir de las muestras. Para realizar el gráfico de Logaritmo del número de copias vs Ct (curva de calibración) se utilizó el programa <http://molbiol.ru/eng/scripts> que nos permite calcular el número de copias/tubo. Interpolando en esta curva los valores de Ct obtenidos para las muestras puede determinarse la cantidad de ARNm presente en las mismas.

En todos los ensayos realizados la pureza del producto obtenido fue confirmada analizando las curvas de disociación y se incluyeron los controles correspondientes (NTC: no template control o control negativo).

9. PROTOCOLOS GENERALES DE TRABAJO CON LÍPIDOS

9.1. Extracción de Lípidos por el Método de Folch

Para los experimentos de caracterización de lípidos, los mismos se extrajeron por el método de Folch, con algunas modificaciones (Folch J y col 1957).

9.1.1. Extracción de lípidos de cultivos celulares

Para realizar la extracción de lípidos de cultivos celulares las muestras de membranas totales de células resuspendidas en 200 µl de buffer H se colocaron en tubos de vidrio, a los que se agregaron 4 ml de solución de Folch (cloroformo : metanol 2:1). Los tubos fueron agitados en vortex e incubados toda la noche a -20 °C. Luego las muestras fueron filtradas con papel de filtro Whatman y lavadas una vez con 1,5 ml de NaCl 0,9% en agua, seguido de una vez con 3 ml de metanol: NaCl 0,9% en agua, 1:1, en ambos casos el tubo se centrifugó a velocidad media para optimizar la separación de fases y se descartó la fase acuosa superior.

La fase orgánica (cloroformo) inferior se evaporó en Speed Vac (Variant) y los lípidos así obtenidos, fueron resuspendidos en 0,5 ml de solución de Folch y almacenados a -20°C para su posterior análisis.

9.1.2. Extracción de lípidos de muestras de tejidos

Para realizar la extracción de lípidos de tejidos se pesaron las muestras y se homogeneizaron en 0,5 ml de PBS enfriado en hielo, se agregaron 20 ml de solución de

Folch por gramo de tejido homogeneizado, se agitó la mezcla con vortex, y se incubó toda la noche a -20°C . Luego se siguió la técnica igual que como se describió en 9.1.1, adaptando los volúmenes utilizados para los lavados.

9.2. Separación de lípidos por Cromatografía en Capa Delgada

Los lípidos extraídos de los cultivos celulares o de las muestras de tejidos por el método de Folch fueron luego separados por cromatografía en capa delgada (TLC= *thin layer chromatography*). Para ello se utilizaron placas de vidrio de 20 por 20 cm de sílica-gel G-60 (Merck, Darmstadt, Germany) como fase estacionaria, y el sistema de solventes para separar lípidos neutros compuesto por hexano:éter etílico:ácido acético (80:20:1,5 v/v) como fase móvil. Todos los solventes utilizados fueron de calidad analítica.

Para realizar la cromatografía se saturó la cuba con el sistema de solventes y en simultáneo se procedió a sembrar las muestras sobre la placa de TLC, junto con estándares adecuados. Luego se colocó la placa en la cuba, y se dejó desarrollar la corrida durante una hora. Se retiró la placa y una vez seca, se cubrieron las calles correspondientes a las muestras con un vidrio limpio y se procedió al revelado de los estándares por exposición a vapores de yodo. Para extraer los TAG y GPL correspondientes a las distintas muestras se raspó la sílica de la placa en la zona indicada por los estándares, se colocó en un tubo de vidrio y se realizaron sobre la misma tres extracciones seguidas agregando en cada una 1 ml de una mezcla Folch: hexano en relación 1:1, agitando con vortex, centrifugando para precipitar la sílica y trasvasando los solventes a un tubo limpio.

9.3. Obtención de Ácidos Grasos Libres (AGL) por Saponificación

Para analizar la composición en AG de los TAG y GPL presentes en las muestras de interés por cromatografía gas-líquido (GLC) es necesario que los mismos se encuentren como ésteres metílicos y para ello, a su vez, es necesario obtener previamente los AGL. Para obtener los AGL se evaporó la fase orgánica (Folch) de los lípidos extraídos por raspado de las placas de TLC por gaseado con nitrógeno, y luego se agregó al tubo 1 ml de hidróxido de potasio alcohólico (KOH en etanol 10% p/v) y 0,5 ml de agua bidestilada. Los tubos fueron gaseados con nitrógeno, tapados, e incubados a 80°C durante 45-60 min, para producir la saponificación. Transcurrido ese tiempo se agregaron 2 ml de hexano, se agitó el tubo en vortex y se descartó la fase superior, la cual contiene los lípidos que no se saponificaron disueltos en el hexano; este último paso se repitió para

optimizar la extracción de todos los lípidos no saponificados. A continuación se acidificaron las muestras agregando 0,3 ml de HCl puro (11M), se adicionaron 2 ml de hexano y se agitó el tubo en vortex. En estas condiciones la sal de potasio del ácido graso (AG-K⁺) se disocia para dar KCl y el AGL, que se obtiene en la fase superior orgánica (hexano). Por lo tanto, dicha fase superior conteniendo los AGL se trasvasó cuidadosamente a un tubo limpio, y se repitió otras dos veces la operación agregando sucesivamente 2 ml y 1 ml de hexano al tubo original, para optimizar la extracción de los AGL. Finalmente las muestras fueron gaseadas con nitrógeno para evitar su oxidación, y almacenadas a -20°C hasta su esterificación.

9.4. Esterificación de los AGL

Para realizar la reacción de esterificación se evaporó el hexano de los tubos que contenían los AGL, y se agregaron 0,5 ml de trifluoruro de Boro (BF₃ 20% e metanol) y 0,5 ml de metanol. Luego se gasearon los tubos con nitrógeno, se taparon y se incubaron a 64°C durante 1 h. A continuación se agregaron 3 ml de cloroformo y 2 ml de agua para particionar. Se agitó el tubo en vortex y luego se descartó la fase superior acuosa. Se repitió el procedimiento agregando 1 ml de agua, agitando en vortex y descartando completamente la fase superior. Finalmente se evaporó el cloroformo por gaseado con nitrógeno, y los ésteres metílicos de los AG así obtenidos, se resuspendieron en 0,5 ml de hexano y se almacenaron a -20°C hasta su análisis por GLC.

Todos los reactivos utilizados en la extracción, saponificación y esterificación de lípidos fueron de calidad analítica. Cada vez que las muestras fueron agitadas en vortex y previo a la eliminación de alguna de las fases, los tubos fueron centrifugados a velocidad media para favorecer la separación de dichas fases.

9.5. Identificación de AG por GLC

Los ésteres metílicos de los AG obtenidos de los lípidos extraídos de las muestras de interés, fueron resuspendidos en 10 µl de hexano filtrado e inyectados en una columna capilar Omega Wax 250 de 39 m, 0,25 mm diámetro interno y film de 0,25 µm (Supelco, Bellefonte, PA, USA) Se programó la temperatura para obtener un aumento lineal de 3°C/min, desde 175 hasta 230 °C. Los picos de los cromatogramas se identificaron por comparación con los tiempos de retención registrados a partir de la inyección de estándares auténticos.

9.6. Cuantificación de TAG por TLC

Para determinar el contenido de TAG en muestras de tejidos se procedió de la siguiente manera. Se realizó la extracción de lípidos totales de la muestra por el método de Folch y la separación de los mismos por TLC como se explicó en 9.1. y 9.2. pero sembrando además en la placa de TLC cantidades conocidas de un estándar de TAG para realizar en simultáneo una curva de calibración. Una vez terminada la cromatografía se procedió al revelado de la misma por la técnica de carbonización. Para esto se sumergió la placa en una solución de ácido sulfúrico al 5% en metanol (enfriada en hielo), y luego se la calcinó en estufa a 200°C, lo que permitió visualizar la corrida. Las manchas correspondientes a las distintas clases de lípidos se identificaron por comparación con las de estándares auténticos, y las placas se escanearon y se cuantificaron usando el programa Image Quant software (Amersham Biosciences, Piscataway, CA, USA).

9.7. Esterificación de [1-¹⁴C]araquidonato y análisis de los productos mediante TLC

Para determinar si GPAT2 favorece la esterificación de AA en algún lípido en particular se procedió a incubar células CHO-K1 que sobreexpresan GPAT2 de manera transitoria con trazas de este AG radiactivo. Para esto a las 24 hs post-transfección se reemplazó el medio de cultivo por 3 ml de DMEM con 10% de FBS, suplementado con 0,5% BSA y 0,25 µCi por placa de [1-¹⁴C] AA (Perkin-Elmer), y se incubaron las células por 3 hs más a 37 °C. Transcurrido ese tiempo se procedió a lavar la monocapa y a obtener las membranas totales como se indicó previamente. Los lípidos totales fueron extraídos por el método de Folch y separados por TLC utilizando el sistema de solventes hexano: éter etílico: ácido acético (80:20:1,5; v/v) para los lípidos neutros, y el sistema cloroformo: metanol: ácido acético: agua (50:37,5:3,5:1,5; v/v) para los lípidos polares. Las manchas correspondientes a las distintas clases de lípidos se identificaron por exposición a vapores de yodo y comparación con las de estándares auténticos. Finalmente la radiactividad correspondiente a cada fracción lipídica fue determinada analizando la placa en un escáner de radiactividad (Bioscan).

9.8. Tinción de Células con Oil Red-O

Este protocolo se utiliza para visualizar y cuantificar los lípidos neutros almacenados intracelularmente. Inicialmente se preparó una solución stock de Oil Red-O (Sigma, catálogo número 0-0625) al 0,5 % p/v en isopropanol. Se lavaron las monocapas de

células 2 veces con 1 ml de PBS, y se fijaron con paraformaldehído 10% en PBS durante 20-30 min a temperatura ambiente. Durante este tiempo se preparó la solución de trabajo (solución stock de Oil Red -O: agua bidestilada 3:2), y se filtró con papel de filtro Whatman nº1 para eliminar precipitados. Se retiró el formaldehído, se agregaron 5 ml de la solución de trabajo a cada placa de 60 mm, y se incubaron las placas a temperatura ambiente durante 1 h. transcurrido ese tiempo se eliminó el colorante, y se enjuagó cuidadosamente la placa varias veces con agua bidestilada para eliminar el exceso de colorante y cualquier precipitado que se pudiera haber formado. Finalmente las placas se observaron en un microscopio invertido y se cuantificaron el número y el tamaño de las gotas de lípidos utilizando el programa Image Pro Plus v5.1. (Wang H y col, 2006).

10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE RESULTADOS

Los resultados se expresan como la media \pm SE de dos o tres experimentos independientes (según se indica en cada caso), cada una de ellos realizada por duplicado. Las diferencias estadísticamente significativas entre condiciones experimentales se evaluaron utilizando el test de Student. Valores con un valor de $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos.

RESULTADOS

Para cumplir con los objetivos planteados en esta tesis utilizamos dos modelos experimentales, por un lado un modelo de células en cultivo, y por otro un modelo animal.

1. RESULTADOS OBTENIDOS EN CULTIVOS CELULARES

1.1. Expresión de GPAT2 en células en cultivo

Realizamos transfecciones transitorias de células CHO-K1 utilizando liposomas catiónicos y el cDNA correspondiente a GPAT2 conteniendo en su extremo 3' el epitope antigénico FLAG, clonado en el vector de expresión eucariota pcDNA3.1. En simultáneo realizamos transfecciones con el vector vacío (sin inserto) para descartar posibles variaciones debidas al proceso de transfección en sí.

A lo largo de esta tesis vamos a denominar como:

Control, a las células CHO-K1 transfectadas con el vector vacío.

G2, a las células CHO-K1 que sobreexpresan la proteína GPAT2.

A las 24 ó 48 hs según corresponda las células fueron procesadas para obtener las membranas totales, lípidos totales o células fijadas según corresponda. La eficiencia de la transfección la determinamos por Western blot utilizando un anticuerpo contra el epitope FLAG que permite reconocer a la proteína expresada de manera heteróloga (Fig 1.1).

Figura 1.1. Expresión de la proteína GPAT2 a las 24 hs post-transfección en células en cultivo

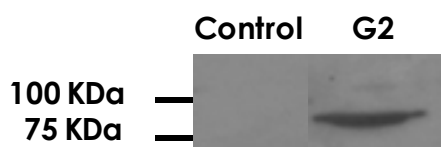


Figura 1.1. Se analizaron por Western blot, 100 µg de proteína total de células CHO-K1 transfectadas con el plásmido pcDNA3.1vacío (Control), o con el cDNA correspondiente a GPAT2 (G2) utilizando como anticuerpo primario el anticuerpo monoclonal antiFLAG.

En la figura 1.1. puede observarse claramente una banda con el PM esperado (~ 80 KDa) correspondiente a la expresión de la proteína GPAT2 en las células CHO-K1. Este resultado coincide con el obtenido al sobreexpresar GPAT2 en células COS-7 y HEK-293 (Wang S y col, 2007).

Todas las transfecciones transitorias utilizadas en los experimentos fueron controladas de esta manera. Se obtienen resultados equivalentes al realizar los controles a las 48 hs post-transfección.

1.2. La sobreexpresión de GPAT2 estimula la síntesis y almacenamiento de TAG

Para determinar el rol de GPAT2 en la síntesis de TAG realizamos una tinción diferencial de las células CHO-K1 que sobreexpresan GPAT2 con el colorante Oil Red-O, el cual interacciona específicamente con los lípidos neutros intracelulares, y evaluamos la capacidad de almacenamiento de TAG en estas células determinando la cantidad y el tamaño de las gotas de lípidos presentes en las mismas utilizando el programa Image Pro Plus v5.1 (Fig 1.2).

Figura 1.2. Acumulación intracelular de TAG en las células que sobreexpresan GPAT2

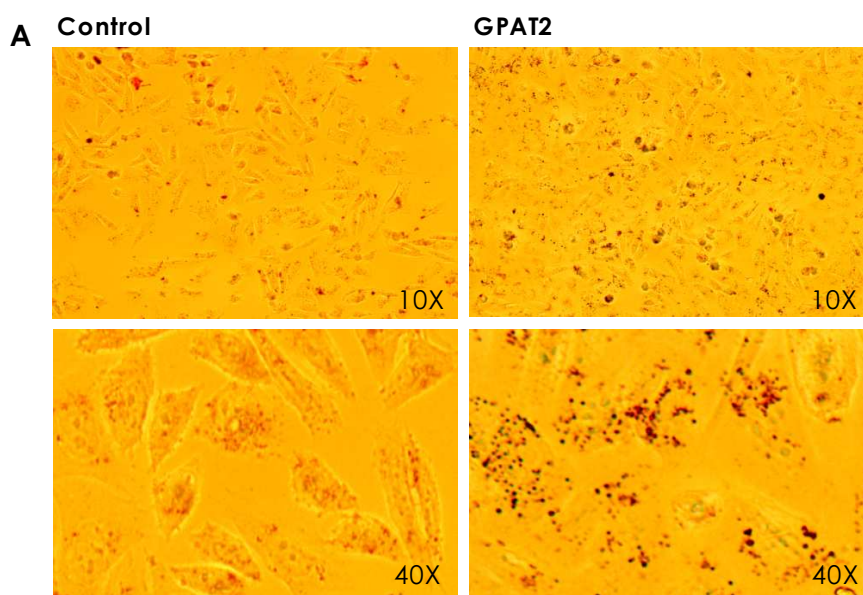


Figura 1.2.A. Se tiñeron con el reactivo Oil Red-O células CHO-K1 transfectadas con el vector vacío (Control) o con el cDNA que codifica para GPAT2 (GPAT2).

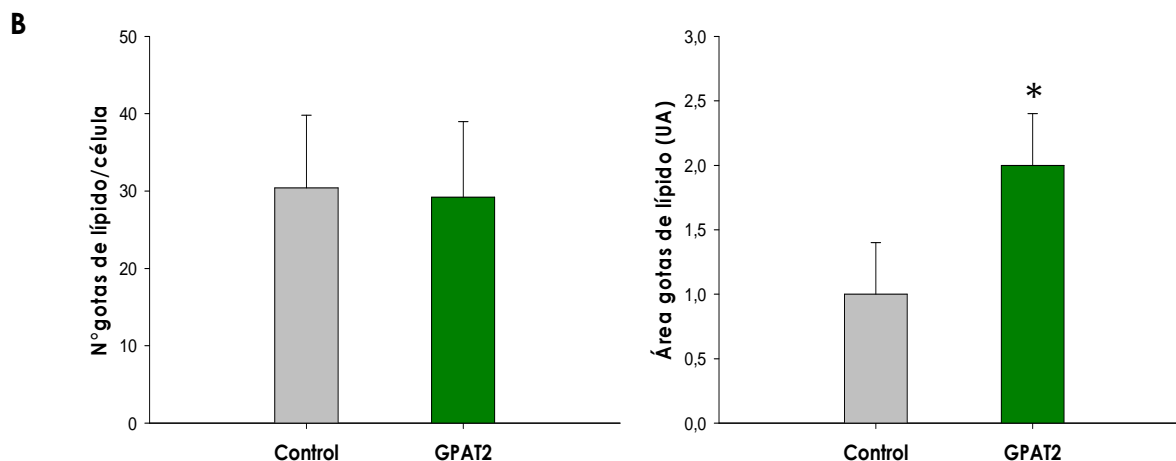


Figura 1.2.B. Se cuantificaron el número y el área de las gotas de lípidos en las células CHO-K1 transfectadas con el vector vacío (barra gris), o con el cDNA correspondiente a GPAT2 (barra verde) y teñidas con Oil Red-O utilizando el programa Image Pro Plus v5.1. Los resultados se expresan como el promedio \pm desvío estándar de tres experimentos independientes. * $p < 0,05$. UA: unidades arbitrarias.

A partir de estos experimentos pudimos observar que aunque la sobreexpresión de GPAT2 no produce un aumento en el número de gotas de lípidos intracelulares, si produce un aumento en el área de las mismas con respecto a las células control (área promedio de las gotas: $1,0 \pm 0,4$ vs $2,0 \pm 0,4$ para las células control y G2 respectivamente). Esto nos indica que se produjo un aumento en el almacenamiento de TAG, debido probablemente a un aumento de su síntesis. Teniendo en cuenta que para realizar estos experimentos las células fueron incubadas durante 24 hs en DMEM con 10% de FBS, sin el agregado de AG exógenos al medio de cultivo, esto nos permite inferir que este aumento en la síntesis de TAG se debe exclusivamente a la sobreexpresión de GPAT2.

De esta forma estudiamos la síntesis de TAG en presencia de las bajas concentraciones de AG ($21-27 \mu\text{M}$) aportadas exclusivamente por el FBS (Rosenthal MD, 1980).

1.3. La sobreexpresión de GPAT2 modifica la composición en AG de los TAG

Habiendo demostrado que GPAT2 promueve la síntesis de TAG en células en cultivo decidimos estudiar la composición en AG de esos TAG para poder determinar si la sobreexpresión de GPAT2 promueve la esterificación de algún AG en particular. Para ello utilizamos células control y G2 las cuales fueron incubadas durante 24 hs post-transfección en DMEM con 10% de FBS, sin el agregado de AG exógenos al medio de cultivo. Luego de ese tiempo se extrajeron los lípidos totales, se separaron por TLC y se

analizaron los AG presentes en los TAG por GLC. Los resultados se expresan como porcentaje del AG indicado presente en los TAG (Fig 1.3).

Figura 1.3. Composición en AG de los TAG de las células que sobreexpresan GPAT2

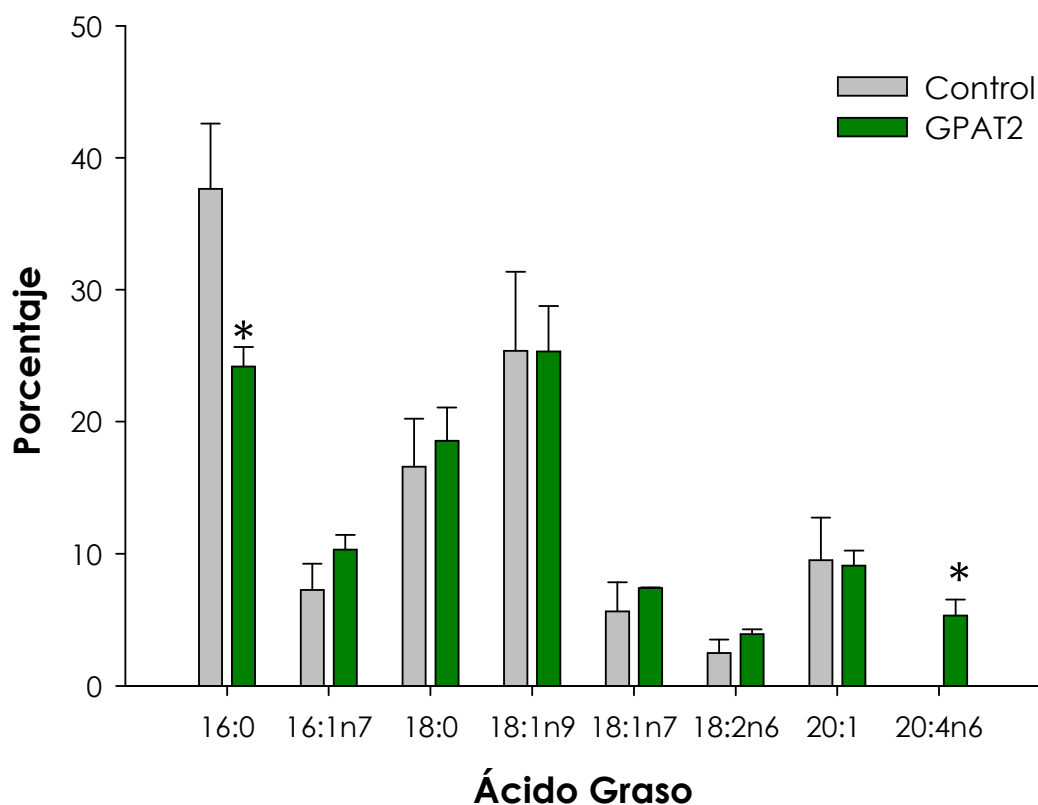


Figura 1.3. Se determinó la composición en AG de los TAG de células CHO-K1 transfectadas con el vector vacío (barras grises), o con el cDNA correspondiente a GPAT2 (barras verdes) incubadas durante 24 hs en DMEM con 10% de FBS. Los lípidos fueron extraídos por la técnica de Folch y separados por TLC. Los TAG fueron saponificados y los AGL se derivatizaron, se separaron y se identificaron por GLC. Los resultados se expresan como el promedio \pm desvío estándar de tres experimentos independientes. * $p < 0,05$.

A partir de estos experimentos pudimos observar que sólo las células transfectadas con GPAT2 esterificaron el ácido araquidónico (AA) aportado por el medio de cultivo en la fracción TAG. Este aumento en el contenido de AA en los TAG se vio compensado por una disminución en el contenido de ácido palmítico.

Teniendo en cuenta que las GPAT catalizan el primer paso de la vía de síntesis de glicerolípidos decidimos determinar también la composición en AG de los GPL de las células control y G2.

Tabla 1.1. Composición en AG de los GPL de células que sobreexpresan GPAT2

Ácido Graso	Control	GPAT2
16:0	30,7 ± 1,3	34,3 ± 4,2
16:1 n7	4,0 ± 1,0	6,2 ± 1,3
18:0	31,3 ± 6,4	30,1 ± 9,5
18:1 n9	23,2 ± 4,8	19,4 ± 3,2
18:1 n7	6,4 ± 0,9	5,0 ± 1,1
18:2 n6	3,2 ± 0,2	3,2 ± 1,1
20:4 n6	2,5 ± 0,5	1,7 ± 0,6

Tabla 1.1. Se determinó la composición en AG de los GPL de células CHO-K1 transfectadas con el vector vacío (Control), o con el cDNA correspondiente a GPAT2 (GPAT2) incubadas durante 24 hs en DMEM con 10% de FBS. Los lípidos fueron extraídos por la técnica de Folch y separados por TLC. Los GPL fueron saponificados y los AGL se derivatizaron, se separaron y se identificaron por GLC. Los resultados se expresan como el promedio ± desvío estándar de tres experimentos independientes.

A partir de estos experimentos pudimos observar que no existen diferencias significativas en el contenido de AA presente en los GPL entre las células control y las que sobreexpresan GPAT2. Este resultado es coherente con el rol atribuido a GPAT2 en la síntesis de TAG (Wang S y col, 2007).

1.4. GPAT2 muestra mayor afinidad por el araquidonil-CoA que por otros acilgraso-CoAs

Luego de observar los cambios producidos por la sobreexpresión de GPAT2 en la composición en AG de los TAG de las células CHO-K1 decidimos corroborar esta aparente especificidad de GPAT2 por el AA. Para ello medimos la actividad GPAT utilizando las membranas totales de células control y G2 y distintos acilgraso-CoAs como sustratos. Las medidas fueron realizadas como se describe en materiales y métodos, con y sin el agregado de NEM, y utilizando 60 µM del acilgraso-CoA indicado. Elegimos los acilgraso-CoAs a ensayar como sustratos basándonos en la información bibliográfica acerca de la composición en AG de los TAG de testículo de ratón, los cuales contienen mayoritariamente 18:1n9 y 18:2n6 (Furland NE y col, 2003); utilizamos además el 16:0 como modelo de AG saturado y el 20:4n6 por los resultados obtenidos en 1.3, y como modelo de PUFA de mayor longitud de cadena. Los resultados de la actividad GPAT se expresan en nmol/min mg proteína (Fig 1.4).

Figura 1.4. Actividad GPAT NEM sensible de células que sobreexpresan GPAT2 utilizando diferentes acilgraso-CoAs como sustratos

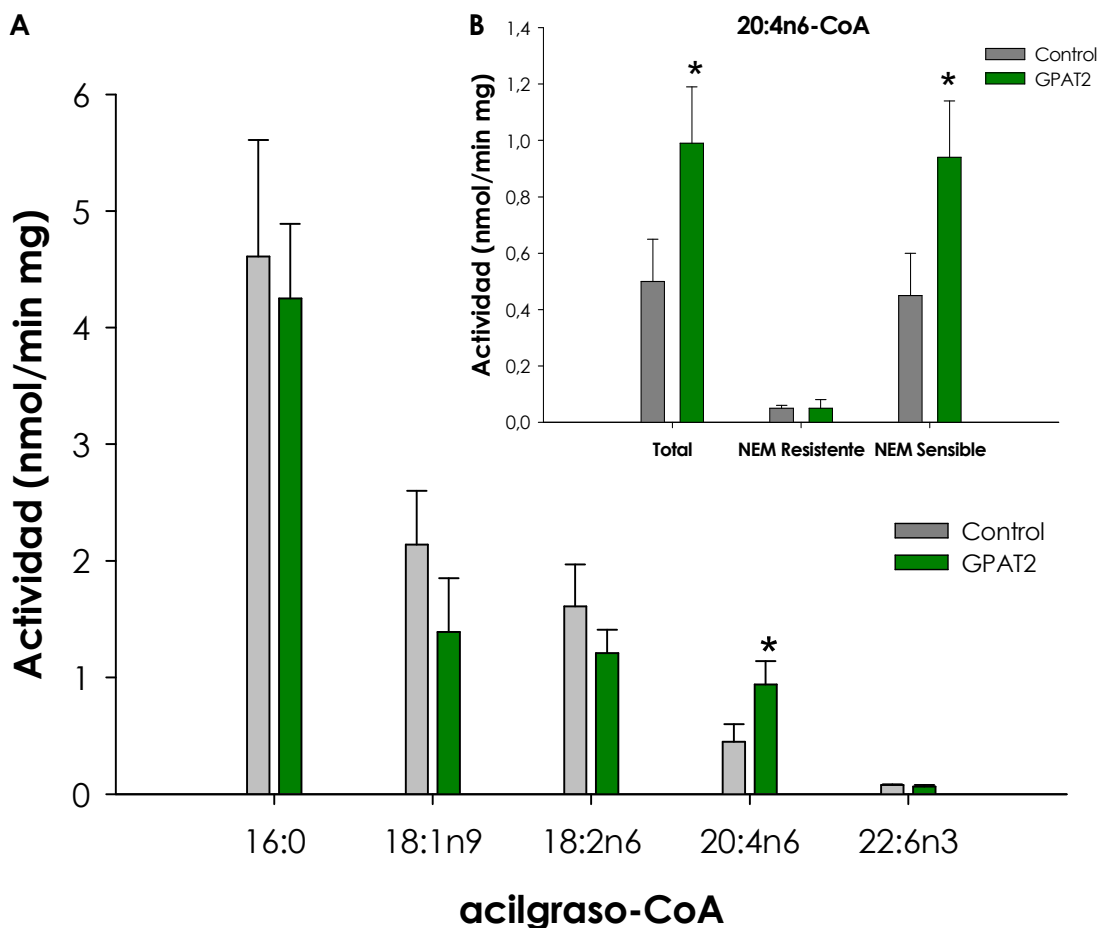


Figura 1.4.A. Actividad GPAT NEM sensible utilizando diferentes acilgraso-CoAs como sustratos: se midió la actividad GPAT (nmol/min mg) sin el agregado (actividad total) y con el agregado (actividad resistente) de NEM 2mM, y se calculó la actividad NEM sensible por diferencia entre estos valores. Se utilizaron 100 μ g de proteínas correspondientes a células CHO-K1 transfectadas con el vector vacío (barras grises) o con el cDNA correspondiente a GPAT2 (barras verdes), y diferentes acilgraso-CoAs como sustratos. Los resultados se expresan como el promedio \pm error estándar de dos experimentos independientes. * $p < 0,05$

Figura 1.4.B. Distribución de actividad GPAT utilizando 20:4n6-CoA: se midió la actividad GPAT (nmol/min mg) sin el agregado (actividad total) y con el agregado (actividad resistente) de NEM 2mM, y se calculó la actividad NEM sensible por diferencia entre estos valores utilizando araquidonil-CoA como sustrato y 100 μ g de proteínas correspondientes a células CHO-K1 transfectadas con el vector vacío (barras grises) o con el cDNA correspondiente a GPAT2 (barras verdes).

A partir de la Figura 1.4.A. podemos observar que no existen diferencias significativas en los valores de actividad GPAT NEM sensible entre las células control y las G2 cuando usamos como sustratos palmitoil-CoA, oleoil-CoA o linoleoil-CoA. En cambio la actividad específica es dos veces mayor para las células G2 cuando usamos araquidonil-CoA como sustrato, demostrando así una mayor afinidad de GPAT2 por este

sustrato poliinsaturado. Para determinar si este aumento de actividad con araquidonil-CoA era específico, medimos la actividad GPAT utilizando otro PUFA como sustrato, el docosahexanoil-CoA (22:6n3), pero los valores de actividad específica obtenidos fueron muy bajos y no hubo diferencias significativas entre las células control y las G2.

A partir de la Figura 1.4.B. podemos observar que al utilizar araquidonil-CoA como sustrato la actividad GPAT NEM sensible medida en las células G2 corresponde a un 95% de la actividad GPAT total; además, no se observan diferencias en los valores de actividad GPAT NEM resistente entre las células control y G2.

Teniendo en cuenta por un lado que las células que sobreexpresan GPAT2 presentan un mayor contenido de TAG que las células control, y por otro las diferencias observadas en la composición en AG de esos TAG, decidimos estudiar la capacidad de incorporación de [1-¹⁴C]AA a los distintos lípidos celulares. Para ello incubamos células control y G2 durante tres horas con trazas de [1-¹⁴C]AA. Transcurrido ese tiempo se extrajeron los lípidos totales, se separaron por TLC y se determinó la radiactividad correspondiente a cada fracción como se describe en materiales y métodos.

Los resultados se expresan como el porcentaje de radiactividad cuantificado en cada una de las fracciones lipídicas indicadas (Fig 1.5).

Figura 1.5. Esterificación de $[1-^{14}\text{C}]$ AA en los diferentes lípidos de células que sobreexpresan GPAT2

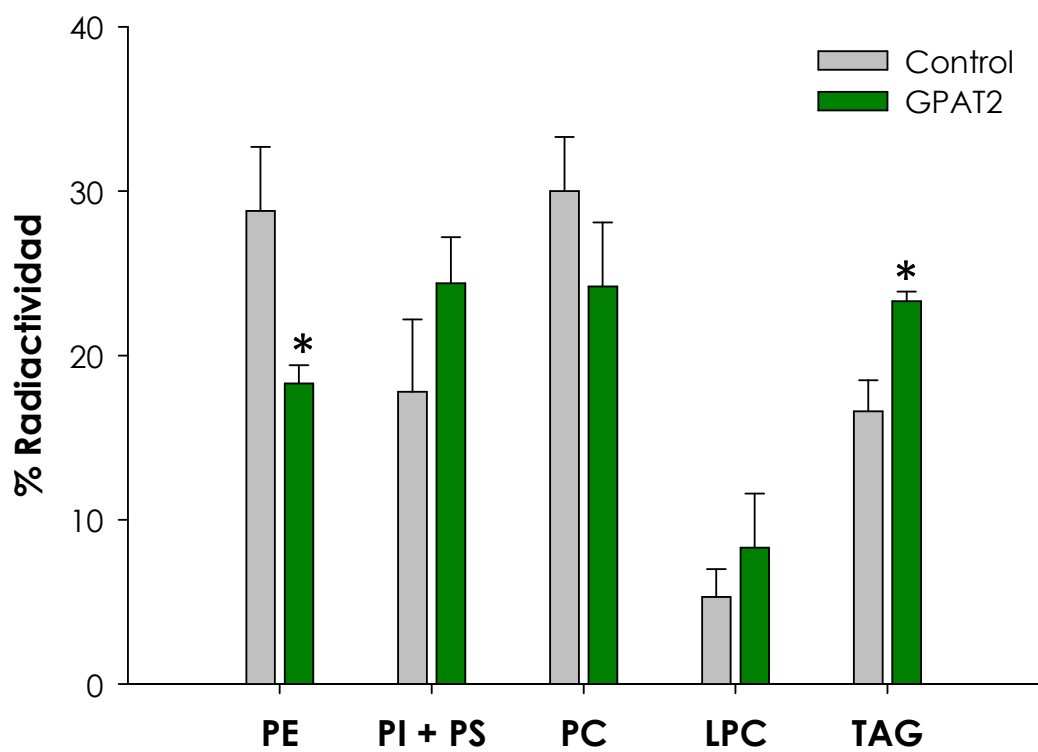


Figura 1.5. Se determinó el porcentaje de AA radiactivo esterificado en cada una de las fracciones lipídicas indicadas por las células CHO-K1 transfectadas con el vector vacío (barras grises), o con el cDNA correspondiente a GPAT2 (barras verdes) incubadas durante 3 hs en DMEM con 10% de FBS suplementado con 0,5% de BSA y 0,25 μCi de $[1-^{14}\text{C}]$ AA. Los lípidos fueron extraídos por la técnica de Folch, separados por TLC y cuantificados en un lector de radiactividad. Los resultados se expresan como el promedio \pm desvío estándar de tres experimentos independientes. * $p < 0,05$. PE: fosfatidiletanolamina, PI: fosfatidilinositol, PS: fosfatidilserina, PC: fosfatidilcolina, LPC: lisofosfatidilcolina, TAG: triacilglicéridos

A partir de la figura podemos observar que luego de 3 horas de incubación las células que sobreexpresan GPAT2 esterificaron un 40% más de $[1-^{14}\text{C}]$ AA en sus TAG que las células control, y disminuyeron la esterificación de $[1-^{14}\text{C}]$ AA en la fosfatidiletanolamina. Este resultado es coherente con la participación de GPAT2 en la vía de síntesis de TAG y con su preferencia por el araquidonil-CoA como sustrato.

2. RESULTADOS OBTENIDOS EN TEJIDOS ANIMALES

El modelo de células en cultivo nos permitió demostrar que GPAT2 esterifica preferentemente el AA en la fracción TAG. Teniendo en cuenta que el ARNm correspondiente a *Gpat2* se expresa principalmente en testículo (Wang S y col, 2007) y que una característica de las células testiculares es la presencia de PUFA en sus TAG

(Aveldaño MI y col, 1993), decidimos estudiar la expresión y actividad de GPAT2 en testículos de rata, y correlacionar estos resultados con la composición en AG de los TAG del testículo y con la funcionalidad de este órgano.

2.1. Medida de la actividad GPAT-NEM sensible en mitocondrias obtenidas a partir de testículo de rata

La detección de la expresión de un determinado gen mediante la medida de su ARN mensajero es una técnica ampliamente utilizada, sin embargo para comprender su función es importante demostrar que el producto de ese gen es biológicamente activo.

Para realizar las medidas de actividad GPAT purificamos mitocondrias a partir de un homogenato total de testículo de animales adultos por un método optimizado en nuestro laboratorio (Pellon-Maison y col, 2007). La purificación la realizamos para eliminar los restos de RE en el cual se localizan las isoformas 3 y 4 de GPAT las cuales, al igual que GPAT2, son sensibles al NEM.

2.1.1. Pureza de la fracción mitocondrial

Para evaluar el nivel de pureza de la preparación de mitocondrias utilizamos la actividad de la enzima NADPH-citocromo c reductasa como proteína marcadora de RE, y la expresión de la proteína VDAC como marcadora de mitocondrias (Fig 2.1).

Figura 2.1. Actividad y expresión de proteínas marcadoras de las distintas fracciones subcelulares de testículo

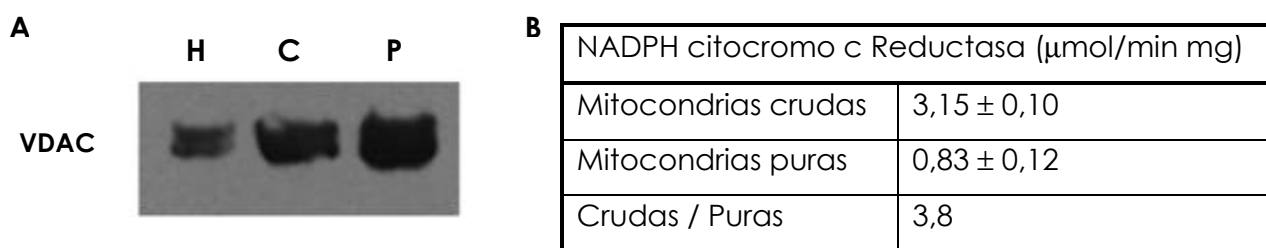


Figura 2.1.A. Se analizaron por Western blot, 100 μg de proteína total de homogenato (H), mitocondrias sin purificar (C) y mitocondrias puras (P) de testículo de rata utilizando el anticuerpo primario que reconoce la proteína mitocondrial VDAC (30 KDa).

Figura 2.1.B. Se midió la actividad NADPH citocromo c reductasa ($\mu\text{mol}/\text{min mg}$) en mitocondrias crudas y puras obtenidas a partir de testículo de rata. Los resultados se expresan como el promedio \pm desvío estándar de tres aislamientos independientes.

En la figura A podemos observar que se produce un aumento de 1,3 veces en los niveles de expresión de la proteína mitocondrial VDAC a medida que la preparación de mitocondrias se va purificando.

En la figura B podemos observar que se produce una disminución de 3,8 veces en la actividad de la enzima NADPH-citocromo c reductasa marcadora de RE a medida que la preparación de mitocondrias se va purificando.

Estos resultados nos permiten asegurar la pureza de las mitocondrias obtenidas por este método y determinar en forma precisa la contaminación residual debida a componentes del RE en la fracción de mitocondrias puras.

2.1.2. Medida de actividad GPAT

Medimos la actividad GPAT aplicando una técnica estándar y utilizando como muestras mitocondrias puras obtenidas a partir de homogenato de testículo de rata. Teniendo en cuenta la mayor afinidad de GPAT2 por el araquidonil-CoA, decidimos utilizar este acilgraso-CoA como sustrato. Los resultados se expresan en nmol/min mg (Fig 2.2).

Figura 2.2. Actividad GPAT en mitocondrias puras de testículo de rata

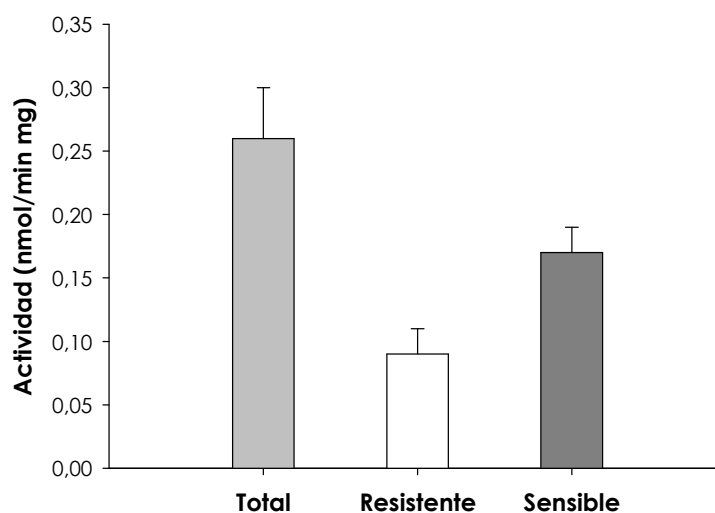


Figura 2.2. Se midió la actividad GPAT (nmol/min mg) en mitocondrias puras obtenidas a partir de testículo de ratas adultas utilizando araquidonil-CoA como sustrato. Los resultados se expresan como el promedio \pm desvío estándar de tres aislamientos independientes.

A partir de esta figura podemos observar que la actividad GPAT NEM sensible medida en las mitocondrias puras, utilizando araquidonil-CoA como sustrato,

corresponde a un 65% de la actividad GPAT total. Debido a que la única isoforma mitocondrial de GPAT NEM sensible y localizada en testículo conocida es la GPAT2, inferimos que en este gráfico la actividad GPAT NEM-sensible corresponde a GPAT2.

Para descartar que las medidas de actividad GPAT NEM sensible se deban a una contaminación con membranas del RE, en simultáneo con estos ensayos medimos también la actividad GPAT NEM sensible en mitocondrias crudas ($0,25 \pm 0,02$ nmol/min mg). Dado que las mitocondrias puras retienen un 68% de la actividad GPAT NEM sensible medida en las mitocondrias crudas y solo un 25% de la actividad NADPH citocromo c reductasa, esto nos permite descartar que la actividad GPAT NEM sensible medida en las mitocondrias puras se deba exclusivamente a la contaminación con membranas del RE.

Si bien por medidas de qRT-PCR se había demostrado que el ARNm de GPAT2 se expresaba principalmente en testículo (Wang S y col, 2007), con estos resultados pudimos confirmar que GPAT2 es activa en las mitocondrias puras aisladas de testículo de rata.

2.2. Localización celular de GPAT2

El testículo es un órgano complejo, compuesto por distintos tipos de células. Habiendo demostrado que GPAT2 es activa en las mitocondrias de testículo, nuestro siguiente objetivo fue determinar en cuáles de los diferentes tipos de células presentes en este órgano se expresa GPAT2. Para ello realizamos las técnicas de Northern blot, hibridización del ARNm de *Gpat2 in situ*, e inmunofluorescencia.

2.2.1. Detección del ARNm correspondiente a *Gpat2* por Northern blot

Para realizar el ensayo de Northern blot utilizamos como muestra el ARN obtenido a partir de células de Leydig, de Sertoli y de una fracción enriquecida en túbulos seminíferos.

2.2.1.1. Optimización de los aislamientos de las distintas células de testículo de rata

Utilizamos diferentes tratamientos enzimáticos para obtener células de Sertoli y de Leydig a partir de testículos de ratas de 60 días, así como también una fracción enriquecida en túbulos seminíferos.

La pureza de las fracciones obtenidas se evaluó por Western blot, utilizando anticuerpos comerciales anti proteína Star (Santa Cruz Biotechnology), anti proteína SCP3 (Santa Cruz Biotechnology) y anti $\Delta 6$ desaturasa (obtenido y gentilmente cedido por el Dr.

Omar Rimoldi, investigador del INIBIOLP) como marcadores de células de Leydig, línea espermática y Sertoli respectivamente (Fig 2.3).

Figura 2.3. Expresión de proteínas marcadoras en células purificadas de testículo

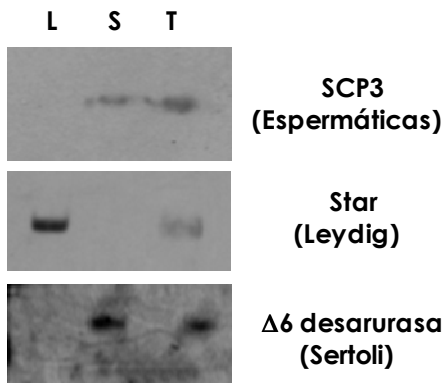


Figura 2.3. Se analizaron por Western blot, 100 µg de proteína total de células de Leydig (**L**), células de Sertoli (**S**) y de la fracción enriquecida en túbulos seminíferos (**T**) obtenidas a partir de testículo de rata. Los anticuerpos primarios utilizados reconocen la proteína Star de células de Leydig, la proteína $\Delta 6$ desaturasa de células de Sertoli y la proteína SCP3 de la línea espermática.

En la figura puede observarse la expresión de la proteína marcadora apropiada en las fracciones correspondientes a las células de Leydig y de Sertoli, así como también la expresión de las proteínas marcadoras de células de Sertoli y de la línea espermática en la fracción correspondiente a los túbulos seminíferos.

2.2.1.2. Optimización de la obtención de una sonda radiactiva para detectar el ARNm correspondiente a Gpat2

La sonda específica para Gpat2 se obtuvo por PCR, usando como molde el cDNA clonado en el vector pcDNA3.1, y marcándola luego con ^{32}P (dCTP). Los primers para sintetizar la sonda fueron diseñados de forma tal de amplificar una región coincidente de los genes de Gpat2 de rata y ratón, y de mínima homología con Gpat1.

2.2.1.3. Northern blot

Se sembraron en geles de agarosa-formamida 20 µg de ARN total obtenido a partir de homogenato de testículo, células de Leydig, células de Sertoli y de la fracción enriquecida en túbulos seminíferos. Luego de la corrida se transfirió el ARN a una membrana de nylon, la cual se incubó sucesivamente con una sonda específica para Gpat2 y con una sonda para β -actina. La intensidad de las bandas fue cuantificada utilizando el programa Image Quant y los resultados se expresaron como intensidades

relativas normalizadas en base a la intensidad de señal correspondiente a la β -actina (Fig 2.4).

Figura 2.4. Expresión del ARNm correspondiente a Gpat2 en células de testículo por Northern blot

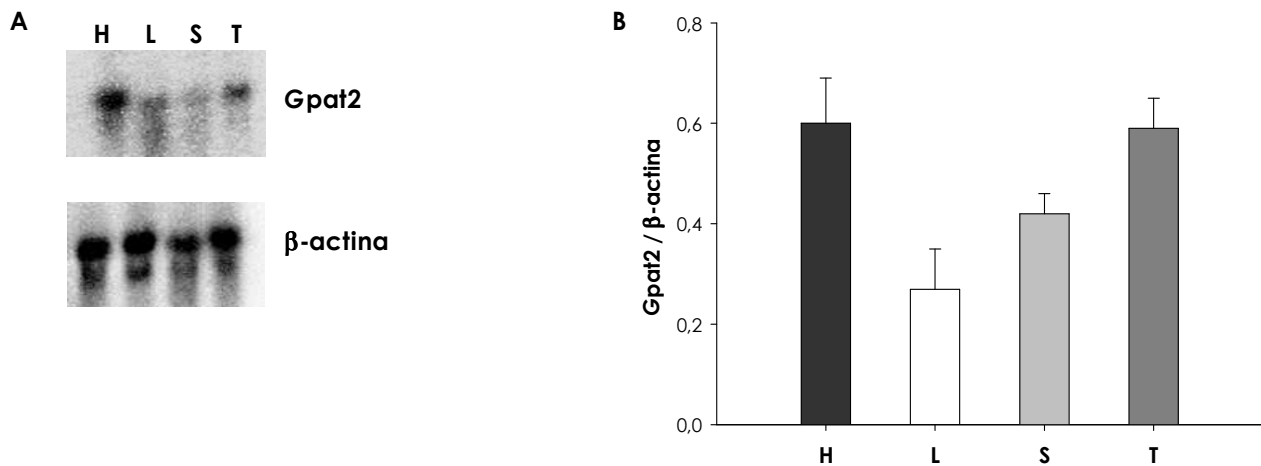


Figura 2.4.A. Se sembraron en geles de agarosa-formamida 20 μ g de ARN total obtenido a partir homogenato de testículo (**H**), células de Leydig (**L**), células de Sertoli (**S**) y túbulos seminíferos (**T**). Luego de la corrida se transfirió el ARN a una membrana de nylon, la que se incubó primero con una sonda específica para Gpat2 y, luego del stripping, con una sonda para β -actina.

Figura 2.4.B. Los Northern blot se cuantificaron utilizando el programa Image Quant y los resultados se indican como niveles de expresión de Gpat2/ β -actina correspondientes a homogenato de testículo (**H**), células de Leydig (**L**), células de Sertoli (**S**), y túbulos seminíferos (**T**). Los resultados corresponden al promedio \pm desvío estándar de cuatro experimentos independientes.

Comparando el nivel de expresión para el ARNm correspondiente a Gpat2 entre el homogenato y las distintas fracciones celulares podemos determinar que este gen se expresa principalmente en los túbulos seminíferos. Dentro de los mismos inferimos que se expresa en las células de la línea espermática, por constituir estas la fracción mayoritaria dentro de los túbulos en animales adultos y, porque además, no detectamos un enriquecimiento en la expresión del ARNm correspondiente a Gpat2 en las células de Sertoli con respecto al homogenato.

2.2.2. Detección del ARNm correspondiente a Gpat2 por Hibridización *in situ*

Para confirmar la localización de Gpat2 decidimos realizar la técnica de hibridización *in situ* (HIS), la cual nos permite identificar directamente en un corte del tejido el tipo de célula en el cual se expresa el ARNm.

La hibridización *in situ* fue realizada utilizando el kit de Roche, y siguiendo las instrucciones del fabricante. Utilizamos como muestras cortes de tejido obtenidos a partir de testículos de ratones adultos. Como control negativo de hibridización utilizamos una sonda sentido para Gpat2 (Fig 2.5).

Figura 2.5. Expresión del ARNm correspondiente a Gpat2 en células de testículo por HIS

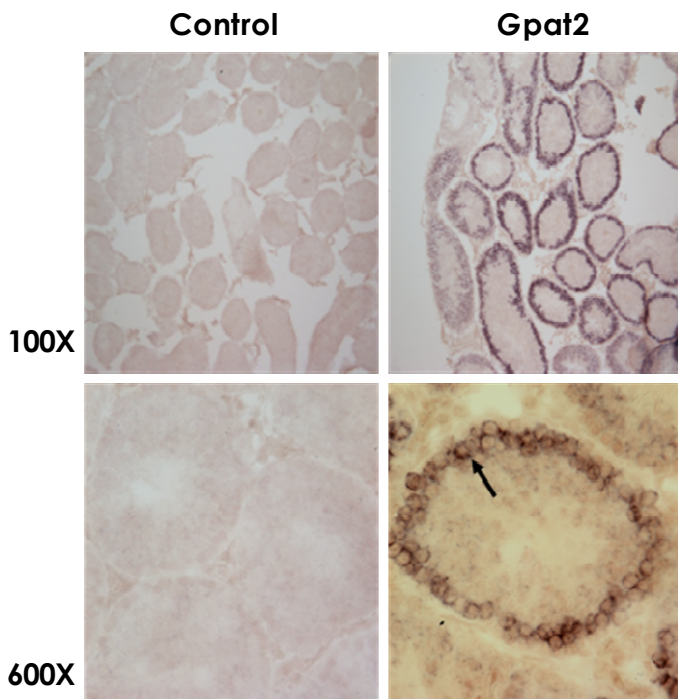


Figura 2.5. Se realizó la HIS utilizando como muestras cortes de testículo de ratones adultos los cuales fueron incubados con la sonda sentido (Control) y con la sonda antisentido para Gpat2 (Gpat2) marcadas con digoxigenina. La flecha negra indica las células sobre las que se detectó señal positiva. No se observa señal en las muestras incubadas con la sonda sentido.

Para visualizar la HIS utilizamos como reactivo revelador una mezcla de diaminobencidina e imidazol, entonces la coloración oscura (marrón con una amplificación de 600 veces) en las fotos correspondientes a la hibridización con la sonda antisentido para Gpat2 indican una señal positiva. Esta técnica nos permitió confirmar que el ARNm correspondiente a Gpat2 se expresa en las células de la línea espermática. En particular puede observarse que el ARNm correspondiente a Gpat2 solo está presente en los espermatoцитos primarios.

2.2.3. Detección de GPAT2 por inmunofluorescencia

Los resultados obtenidos en 2.2.1. y 2.2.2. nos permitieron determinar la localización del ARNm correspondiente a Gpat2. Para estudiar la expresión de la proteína GPAT2

realizamos la técnica de inmunofluorescencia utilizando como muestras cortes de testículos obtenidos a partir de ratas adultas.

Figura 2.6. Expresión de GPAT2 por inmunofluorescencia

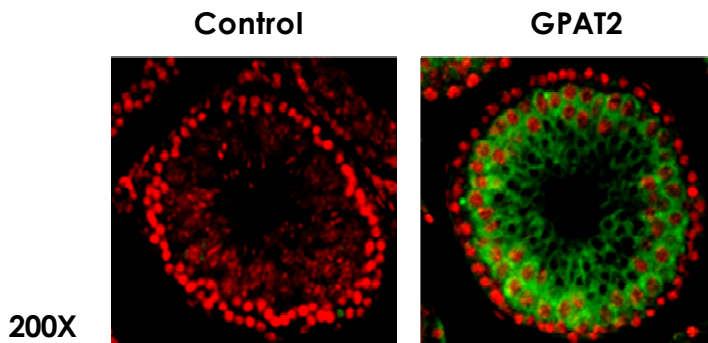


Figura 2.6. Se realizó la técnica de inmunofluorescencia utilizando como muestras cortes de testículo de ratas de 60 días los cuales fueron incubados en PBS (Control) o con un anticuerpo comercial anti-GPAT2 (GPAT2), y luego con un anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado al fluoróforo Alexa Fluor 488. Los núcleos fueron teñidos con Ioduro de propidio. No se observa señal en las muestras incubadas con PBS.

En esta figura la coloración roja corresponde a la tinción de los núcleos con ioduro de propidio, y la coloración verde a la detección de GPAT2. A partir de la misma podemos observar que en la rata GPAT2 se localiza en las células de la línea espermática, y dentro de las mismas podemos ver que GPAT2 se expresa en los espermatoцитos primarios y que su expresión se mantiene en los estadios posteriores de maduración celular. En concordancia con lo observado en la HIS, GPAT2 no fue detectada en las espermatogonias. Por lo tanto, este experimento nos permitió confirmar el resultado obtenido por Northern blot y es coherente con el obtenido por HIS.

2.3. Estudio de la expresión de GPAT2 durante el desarrollo postnatal

La presencia de GPAT2 en las células de la línea espermática sugiere que la misma podría cumplir alguna función durante la espermatogénesis. Por lo tanto decidimos estudiar los niveles de expresión y actividad de GPAT2 a lo largo del desarrollo postnatal. Para ello elegimos trabajar con animales de edades correspondientes a cuatro estadios del desarrollo: infantiles (19 días), pre-púberes (30 días), púberes (40 días) y adultos jóvenes (60 días), que nos permitieran abarcar los sucesivos niveles de maduración testicular postnatal (Nogueiras R y col, 2004).

2.3.1. Detección del ARNm correspondiente a Gpat2 en función de la edad por qRT-PCR

Para realizar los experimentos de PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR) utilizamos como muestra el ARN total obtenido a partir de testículos de ratas de diferentes

edades. Los ensayos fueron realizados por triplicado utilizando muestras de ARN correspondientes a diferentes aislamientos, y los resultados se expresan como el número de copias del ARNm correspondiente a Gpat2 / μg de ARN total (Fig 2.7).

Figura 2.7. Expresión del ARNm correspondiente a Gpat2 en testículo de ratas de diferentes edades

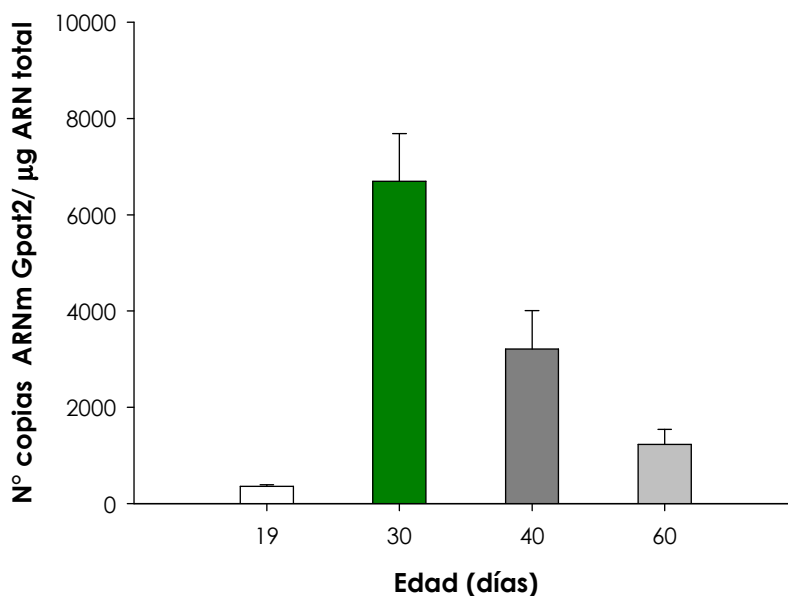


Figura 2.7. Se cuantificó la expresión del ARNm correspondiente a Gpat2 por qRT-PCR utilizando ARN total obtenido a partir de homogenato de testículo de ratas de 19, 30, 40 y 60 días. Los cambios en los niveles de expresión fueron determinados utilizando el método de la curva de calibración. Los resultados se expresan como el promedio \pm desvío estándar de tres experimentos independientes.

En este ensayo podemos observar que la expresión del ARNm correspondiente a Gpat2 varía con la edad, alcanzando un máximo a los 30 días de edad.

2.3.2. Detección de la proteína GPAT2 en función de la edad por Western blot

Para realizar estos ensayos utilizamos un anticuerpo anti GPAT2 humana comercial (Sigma catálogo N° HPA036841) y muestras de mitocondrias puras obtenidas a partir de homogenatos de testículos de ratas diferentes edades. Teniendo en cuenta por un lado que las muestras a utilizar son de rata y no humanas, y por otro la alta homología de secuencia que presentan GPAT1 y GPAT2, ambas de localización mitocondrial, previamente a la realización del Western blot fue necesario realizar un control de especificidad del anticuerpo anti GPAT2.

2.3.2.1. Control de especificidad del anticuerpo anti GPAT2

Para validar el anticuerpo realizamos la técnica de Western blot, utilizando como muestras membranas totales obtenidas a partir de células CHO-K1 control, o que sobreexpresaban de manera heteróloga las proteínas GPAT1 o GPAT2 marcadas con el epítipo antigénico Flag. Los Western blot fueron revelados utilizando el anticuerpo anti-Flag o el anticuerpo anti GPAT2 HPA 036841 (Fig 2.8).

Figura 2.8. Control de especificidad del anticuerpo anti GPAT2 comercial (Sigma catálogo N° HPA036841)

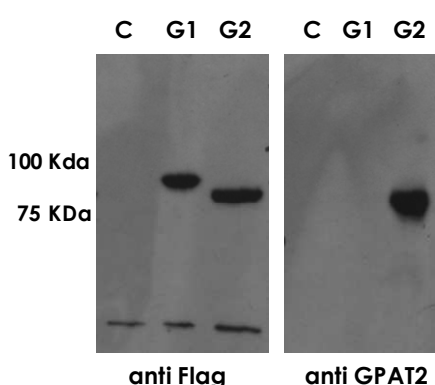


Figura 2.8. Se analizaron mediante Western blot 100 µg de proteína total de células CHO-K1 transfectadas con el vector pcDNA3.1 vacío (**C**), o con el cDNA correspondiente a las proteínas GPAT1-Flag (**G1**) o GPAT2-Flag (**G2**). El revelado se realizó utilizando los anticuerpos comerciales anti Flag o anti GPAT2.

El Western blot revelado utilizando el anticuerpo anti Flag nos permitió confirmar que tanto la GPAT1 como la GPAT2 están siendo expresadas por las células CHO-K1. Al revelar utilizando el anticuerpo anti GPAT2 solo obtenemos una señal positiva y del PM apropiado en las células transfectadas con el cDNA correspondiente a GPAT2. Este resultado nos permite demostrar por un lado que el anticuerpo HPA036841 es específico para la isoforma GPAT2, y por otro que puede ser utilizado para reconocer la proteína GPAT2 de ratón. Debido a la alta homología de secuencia que existe entre la GPAT2 de rata y ratón (95% de identidad, Anexo 1) y a que el anticuerpo comercial es policlonal, consideramos que es adecuado para reconocer la proteína GPAT2 de rata. Este anticuerpo anti-GPAT2 también fue utilizado para realizar la técnica de inmunofluorescencia descrita anteriormente (apartado 2.3.2.)

2.3.2.2. Western blot

Para realizar estos ensayos utilizamos como muestras mitocondrias puras obtenidas a partir de testículos de ratas de diferentes edades (Fig 2.9).

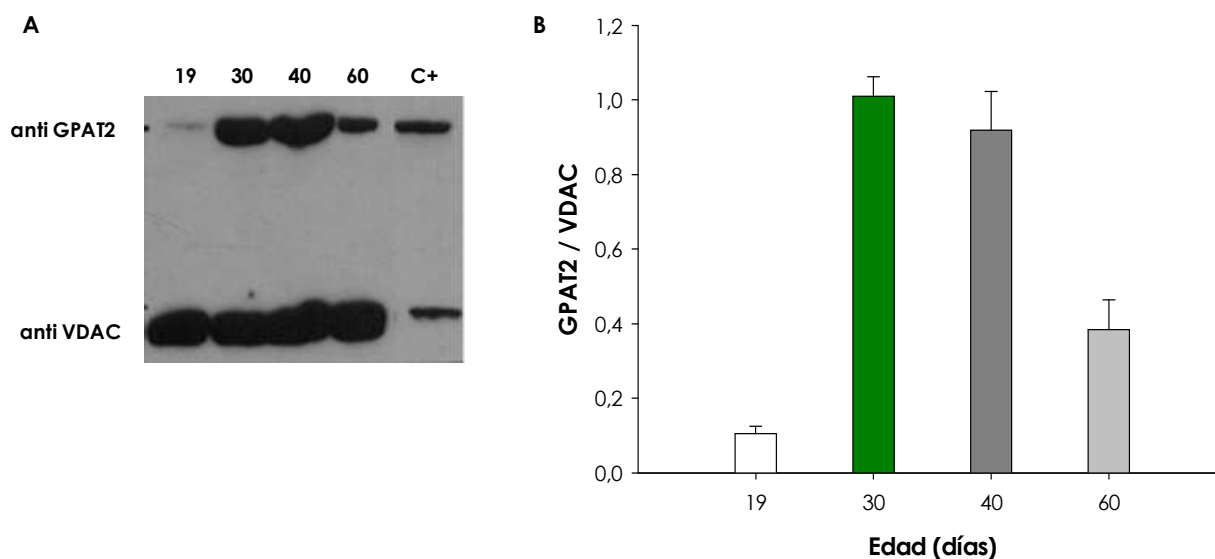
Figura 2.9. Expresión de GPAT2 en testículo de ratas de diferentes edades

Figura 2.9.A. Se analizaron mediante Western blot 100 μ g de proteína correspondiente a mitocondrias puras aisladas de testículo de ratas de 19, 30, 40 y 60 días, y a células CHO-K1 transfectadas con el cDNA correspondiente a GPAT2 como control positivo (C+). El revelado se realizó utilizando los anticuerpos anti GPAT2 y anti VDAC. La banda de GPAT2 corresponde a un PM de \sim 80 KDa y la de VDAC a 30 KDa.

Figura 2.9.B. Los Western blot se cuantificaron utilizando el programa ImageJ y los resultados se grafican como niveles de expresión de GPAT2/VDAC correspondientes a las edades de 19, 30, 40 y 60 días. Los resultados corresponden al promedio \pm desvío estándar de cuatro experimentos independientes.

La intensidad de las bandas fue cuantificada con el programa ImageJ, y tomando como referencia la banda correspondiente a los 19 días, el nivel de expresión de GPAT2 relativo a VDAC fue 10, 9 y 4 veces mayor a los 30, 40 y 60 días de edad respectivamente. Con este ensayo pudimos observar que la expresión de GPAT2 varía durante el desarrollo postnatal, alcanzando un máximo entre los 30 y 40 días, de manera coherente con las variaciones observadas en la expresión del ARNm. Debido a que las muestras corresponden a mitocondrias puras, el revelado con el anticuerpo anti-VDAC que reconoce una proteína mitocondrial de 30 KDa se incluyó como control interno de siembra.

2.3.3. Medida de la actividad GPAT2 en función de la edad

Teniendo en cuenta las diferencias observadas en los niveles de expresión de GPAT2 en función de la edad decidimos estudiar la actividad GPAT NEM sensible en mitocondrias de testículo utilizando araquidonil-CoA como sustrato. Para ello obtuvimos mitocondrias puras a partir de testículos de ratas de diferentes edades y medimos la

actividad GPAT de las mismas sin (actividad total) y con (actividad NEM resistente) el agregado de NEM 2 mM, para poder determinar la actividad GPAT2 NEM sensible por diferencia.

En el gráfico se muestra solo la actividad GPAT NEM sensible la cual corresponde a GPAT2, dado que esta es la única isoforma de GPAT cuya actividad es sensible al NEM que se localiza en mitocondrias. Los resultados se expresan en nmol/min mg para las distintas edades (Fig 2.10).

Figura 2.10. Actividad GPAT2 en mitocondrias puras de testículo de ratas de diferentes edades utilizando araquidonil-CoA como sustrato

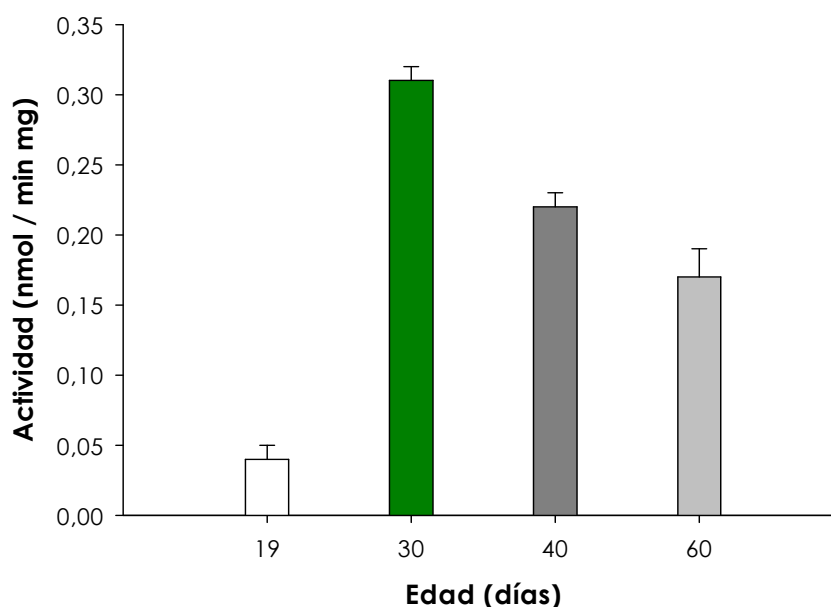


Figura 2.10. Se determinó la actividad GPAT NEM sensible en mitocondrias puras aisladas de testículos de ratas de distintas edades utilizando araquidonil-CoA como sustrato. Los resultados se expresan como el promedio \pm desvío estándar de tres aislamientos independientes.

A partir de la figura podemos observar que la actividad GPAT NEM sensible mitocondrial (GPAT2) alcanza un valor máximo a los 30 días de edad. Estas variaciones en los niveles de actividad GPAT NEM sensible en función de la edad son coherentes con las obtenidas en las medidas del ARNm y de la proteína.

A los 30 días, la actividad GPAT2 representa el 82% de la actividad GPAT total (sensible más resistente) medida en las mitocondrias puras de testículo de rata utilizando araquidonil-CoA como sustrato; a los 19, 40 y 60 días la actividad GPAT2 representa el 25%, 65% y 65% de la actividad GPAT total, respectivamente.

2.3.4. Medida del contenido de TAG y de su composición en AG en función de la edad

Los ensayos realizados en células en cultivo nos permitieron determinar que GPAT2 estimula tanto la síntesis de TAG como la esterificación de AA en los mismos. Los resultados obtenidos en el modelo animal nos permitieron observar que GPAT2 se expresa y es activa en testículo al utilizar araquidonil-CoA como sustrato, mostrando un perfil de expresión y actividad que varía a lo largo del desarrollo postnatal. Teniendo en cuenta estos resultados, decidimos estudiar el contenido de TAG en testículo de ratas de diferentes edades y su composición en AG.

Para determinar el contenido de TAG y la composición en AG de los mismos utilizamos como muestras homogenatos de testículos de ratas de diferentes edades.

Los resultados se expresan como microgramos de TAG / miligramo de tejido en función de la edad, y como porcentaje del ácido graso indicado esterificado en los TAG en función de la edad, respectivamente (Fig 2.11).

Figura 2.11. Contenido de TAG y composición en AG en testículo de ratas de diferentes edades.

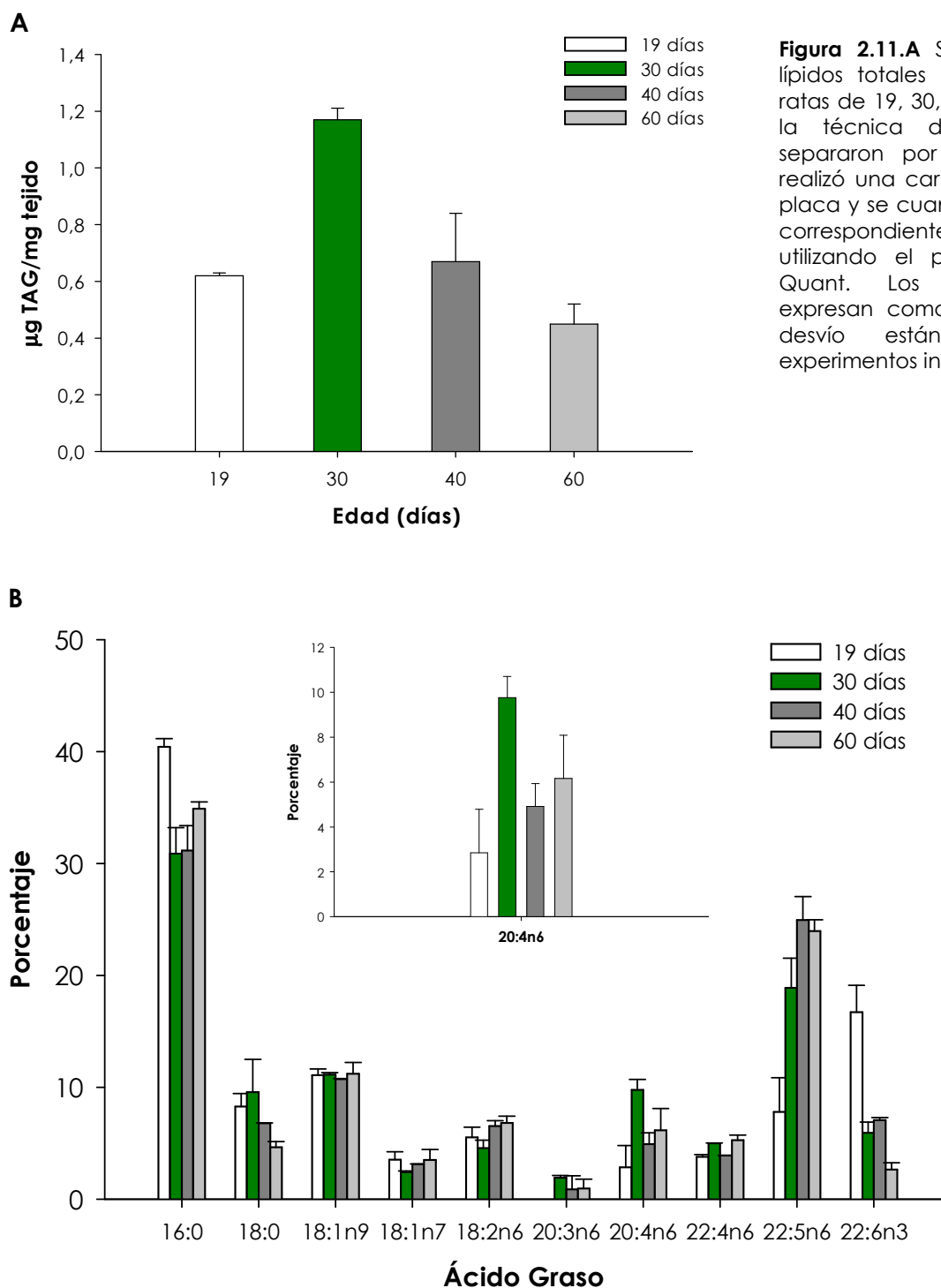


Figura 2.11.B Se extrajeron los lípidos totales de testículos de ratas de 19, 30, 40 y 60 días con la técnica de Folch, se separaron por TLC, y los ácidos grasos correspondientes a los TAG fueron derivatizados y resueltos por GLC. En la figura inserta puede observarse el porcentaje correspondiente al AA: Los resultados se expresan como el promedio \pm la desviación estándar de tres experimentos independientes.

La figura A representa el contenido de TAG en testículos de ratas de diferentes edades, mientras que la figura B nos muestra la composición en AG de esos TAG y en la misma podemos observar que solo el contenido de AA varía en función de la edad presentando un máximo a los 30 días, y de manera coherente a las variaciones observadas en las medidas de expresión y actividad de GPAT2. Teniendo en cuenta la mayor afinidad por el AA demostrada por GPAT2 en los ensayos realizados en cultivos celulares, esta correlación entre el contenido de AA en los TAG y la expresión de GPAT2 en función de la edad sugiere que GPAT2 sería la enzima responsable de la esterificación del AA en los TAG del testículo.

3. RESULTADOS OBTENIDOS *IN SÍLICO*

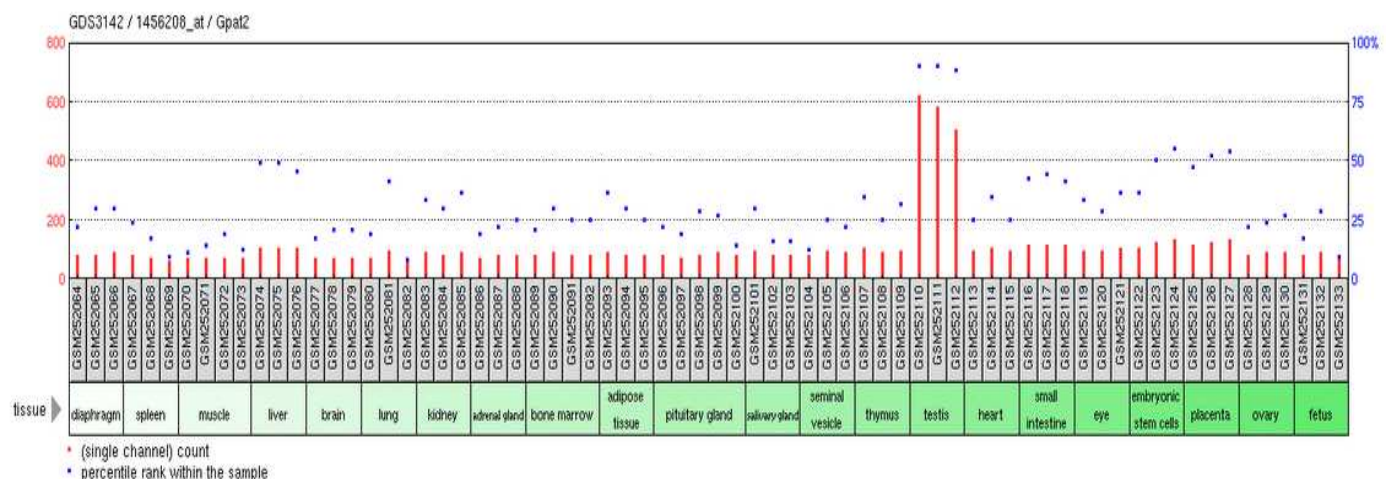
En simultaneo con el trabajo experimental realizamos búsquedas en las bases de datos públicas Gene Expression Omnibus (GEO) perteneciente al NCBI (National Center for Biotechnology Information), y ArrayExpress perteneciente al EMBL-EBI (European Molecular Biology Laboratory - European Bioinformatics Institute), las cuales recopilan información de meta-estudios de expresión génica, basados principalmente en las tecnologías de los microarreglos y de SAGE (Serial Analysis of Gene Expression).

3.1. Gene Expression Omnibus. Localización tisular de Gpat2

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geoprofiles?term=gpat2%20mus%20musculus%20GDS3142>

Title: [GDS3142](#) / 1456208_at / Gpat2 / Mus musculus

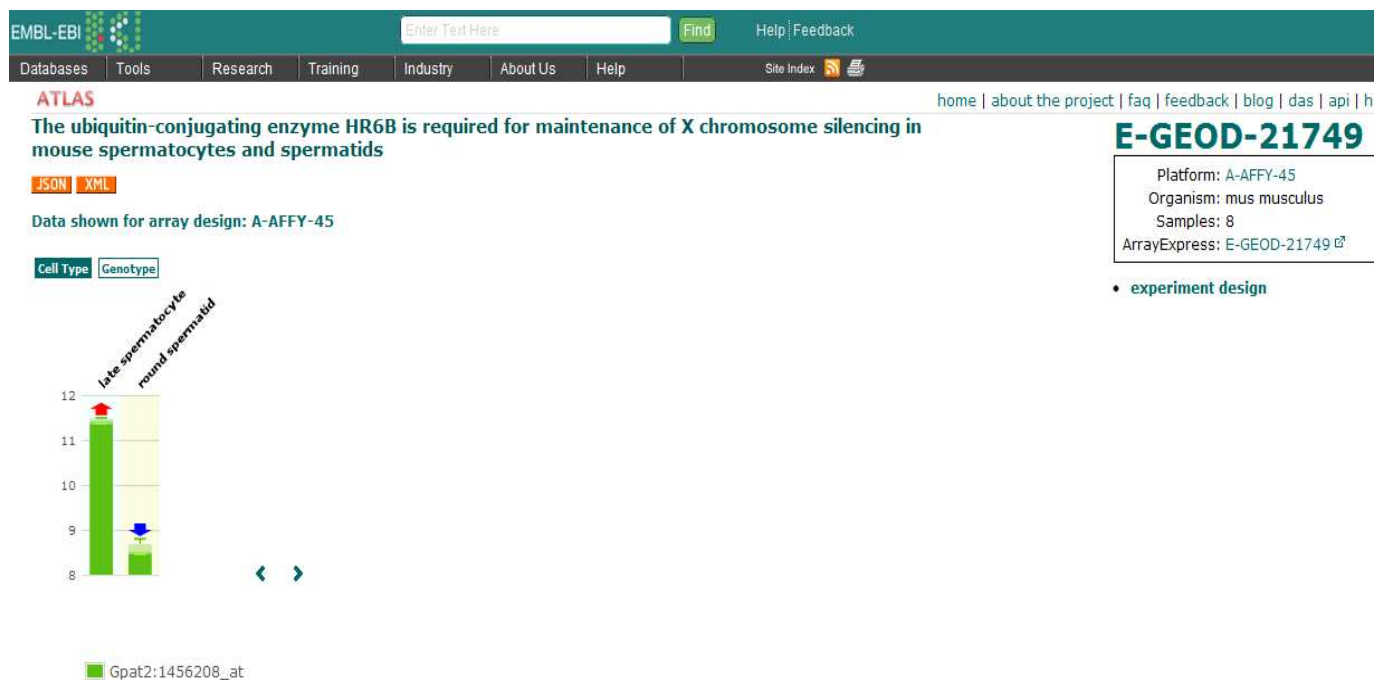
Summary: Analysis of 22 different tissues from 10 to 12 week old C57BL/6 animals. Results provide insights into the practice of using housekeeping genes as reference genes.



En esta figura podemos ver que de todos los tejidos de ratón estudiados, el ARNm correspondiente a Gpat2 se expresa principalmente en el testículo.

3.2. ArrayExpress. Localización celular de Gpat2

<http://www.ebi.ac.uk/gxa/experiment/E-GEOD-21749/ENSMUSG00000046338>



En esta figura podemos observar que el ARNm correspondiente a Gpat2 se expresa en las células de la línea espermática, y coincidiendo con nuestros resultados la expresión es mayor en los espermatoцитos y disminuye en las espermátides.

Las búsquedas realizadas en estas bases de datos públicas apoyan los resultados obtenidos en esta tesis acerca de la localización del ARNm correspondiente a GPAT2.

DISCUSIÓN

1. La sobreexpresión de GPAT2 en células de mamífero promueve la síntesis y almacenamiento de TAG.

Las GPAT son las enzimas que catalizan el primer paso de la vía metabólica que conduce a la síntesis de TAG y GPL. Hasta el momento han sido clonadas 4 isoformas de GPAT y experimentos tanto de ganancia como de pérdida de función, en modelos animales y en células en cultivo, permiten asociarlas con la síntesis *de novo* de TAG (Wendel AA y col, 2008).

En particular para la isoforma GPAT2 previamente fue demostrado que al incubar células COS-7 que sobreexpresaban de manera transitoria esta enzima con trazas ($3 \mu\text{M}$) de [^{14}C]18:1n9 se producía un incremento del 84% en la esterificación de este AG en los TAG y una disminución en la esterificación en los GPL con respecto a las células no transfectadas. Este experimento permitió demostrar que GPAT2 está involucrada específicamente en la síntesis de TAG (Wang S y col, 2007).

Para estudiar los efectos de la sobreexpresión de GPAT2 sobre la síntesis de TAG en nuestro modelo de estudio (células CHO-K1) decidimos determinar el contenido de lípidos neutros intracelulares cuantificando la formación de las gotas de lípidos citoplasmáticas (LD, de *lipid droplets*). Las LD son estructuras celulares dinámicas y heterogéneas en tamaño, presentes en distintos tipos de células, y constituidas por un centro de lípidos neutros rodeados por una monocapa de GPL y proteínas asociadas (Brasaemle DL, 2007). Los principales lípidos neutros de las LD son los TAG y CE (Ducharme NA y Bickel PE, 2008). La relación directa entre síntesis de TAG y formación de LD ya ha sido demostrada por otros grupos. Por ejemplo, ensayos realizados con cultivos primarios de fibroblastos obtenidos a partir de ratones nulos para las enzimas DGAT1 y DGAT2 demuestran que en estas células tanto la síntesis de TAG como la formación de LD se encuentran severamente disminuidas (Harris CA y col, 2011); mientras que ensayos de sobreexpresión del factor de transcripción PPAR γ 2, el cual promueve la síntesis de lípidos, en la línea de células hepáticas AML-12 condujeron a una estimulación de la síntesis TAG y de la expresión de proteínas relacionadas con la síntesis de lípidos, y a un aumento en simultaneo en el contenido de LD (Schadinger SE y col, 2005).

En nuestros experimentos determinamos el contenido de lípidos neutros intracelulares por tinción con Oil-Red O, y pudimos observar que el tamaño de las LD se duplica en las células que sobreexpresan GPAT2 (Fig 1.2.B). Esto nos indica que se produjo

un aumento en el almacenamiento de TAG, debido probablemente a un aumento de su síntesis. Teniendo en cuenta que para realizar los experimentos las células fueron incubadas durante 24 hs en DMEM con 10% de FBS, sin el agregado de AG exógenos que promuevan la síntesis de TAG al medio de cultivo (Igal RA y col, 2001), podemos suponer que este aumento en la síntesis de TAG se debe exclusivamente a la sobreexpresión de GPAT2.

Las 4 isoformas de GPAT presentan diferentes afinidades por los sustratos acilgraso-CoA. La isoforma mitocondrial GPAT1 tiene preferencia por los sustratos saturados, principalmente palmitoil-CoA y estearoil-CoA (Coleman RA y Lee DP, 2004). Ensayos de sobreexpresión de esta isoforma en células CHO-K1 y HEK-293 o en cultivos primarios de hepatocitos permitieron demostrar que la misma provoca un incremento de la masa de TAG intracelulares y estimula la incorporación del [¹⁴C]18:1n9 adicionado al medio de cultivo en los TAG (Igal RA y col, 2001; Wendel AA y col, 2008). Las isoformas microsomales GPAT3 y GPAT4 presentan igual afinidad por los sustratos saturados e insaturados (Gimeno RE y Cao J, 2008; Chen YQ y col, 2008).

Habiendo demostrado que GPAT2 promueve la síntesis de TAG en células en cultivo decidimos estudiar la composición en AG de esos TAG para poder determinar si GPAT2 estimulaba la esterificación de algún AG en particular. Estos ensayos nos permitieron observar que solo las células que sobreexpresan GPAT2 son capaces de esterificar el AA provisto por el FBS en los TAG (Fig 1.3). El FBS contiene bajas concentraciones de AG (21-27 μ M) (Rosenthal MD, 1980), de los cuales en promedio un 8% corresponden a AA (Diascro Jr DD y col, 1998). Al incubar células control y G2 por 24 hs en DMEM con 10% de FBS pudo observarse que las células G2 presentaban un 5,3% de AA esterificado en sus TAG, mientras que el AA no fue detectado en los TAG de las células control. Este resultado es sorprendente debido a que el AA, al igual que otros PUFA, se esterifica normalmente en los GPL. Incluso en el testículo donde los TAG presentan un alto contenido de PUFA, el AA se encuentra esterificado también principalmente en los GPL, como lo demuestra el análisis de los lípidos extraídos tanto de ensayos de incubación de muestras de túbulos seminíferos con AA radiactivo (Aveldaño MI y col, 1993), como de experimentos realizados inyectando el AA radiactivo dentro del testículo *in vivo* (Beckman JK y Coniglio JG, 1980). En nuestros ensayos la composición en AG de los GPL no mostró diferencias significativas en el contenido de AA entre las células control y G2 (Tabla 1.1), lo cual es coherente con el rol previamente atribuido a GPAT2 en la síntesis de TAG (Wang S y col, 2007).

En conjunto, estos estudios nos permitieron demostrar que GPAT2 está involucrada en la síntesis de TAG y que muestra una aparente preferencia por el AA.

2. La isoforma GPAT2 es específica para el AA.

Para determinar la especificidad de sustrato de GPAT2 decidimos medir la actividad GPAT NEM sensible en membranas totales de células CHO-K1 que sobreexpresaban esta enzima utilizando G3P radiactivo y distintos acilgraso-CoAs como sustratos. Para medir la actividad GPAT se eligió un método ampliamente utilizado, tanto en tejidos de mamífero (Lewin TM y col, 2001) como en cultivos celulares (Pellon Maison M y col, 2006).

Ensayos previos habían demostrado que la sobreexpresión de GPAT2 en células COS-7 incrementaba la actividad GPAT NEM sensible en un 30% al utilizar palmitoil-CoA como sustrato, sin embargo, en este trabajo no se ensayó la actividad GPAT utilizando otros sustratos acilgraso-CoAs (Wang S y col, 2007).

En nuestro modelo experimental las medidas de actividad enzimática indican que GPAT2 utiliza como sustrato al AA (Fig 1.4). El cálculo de la relación de actividades específicas para células control/células G2 = $2,18 \pm 0,31$ muestra claramente un incremento de la actividad específica del 100% al utilizar araquidonil-CoA como sustrato. En cambio, al utilizar otros acilgraso-CoAs como sustratos (palmitoil-CoA, oleoil-CoA, linoleoil-CoA y docosahexanoil-CoA) no hubo diferencias en los valores medidos de actividad específica entre las células control y las G2. Este resultado es coherente con el obtenido al determinar la composición en AG de los TAG, donde la única diferencia entre las células control y G2 se produce en el contenido de AA.

Ya ha sido demostrado que la isoforma GPAT1 utiliza principalmente sustratos saturados (Coleman RA y Lee DP, 2004), mientras que los trabajos realizados para determinar la especificidad de sustrato de GPAT3 y GPAT4 indican que estas isoformas esterifican con igual afinidad sustratos saturados e insaturados. Si utilizamos como referencia aquellos trabajos en los que el araquidonil-CoA haya sido estudiado podemos observar que, si bien tanto GPAT3 como GPAT4 son capaces de utilizar araquidonil-CoA como sustrato, los valores de actividad específica obtenidos con estas isoformas son mucho menores que el reportado en esta tesis para GPAT2 (actividad específica menor a 100 pmol/min mg para GPAT3 y menor a 50 pmol/min mg para GPAT4 vs 940 pmol/min mg para GPAT2). Por otro lado, tanto para GPAT3 como para GPAT4 los mayores valores de actividad específica se obtienen al utilizar como sustratos acilgraso-CoAs de 16 y 18

carbonos, tanto saturados como insaturados (Cao J y col, 2006; Nagle CA y col, 2008). Si bien los valores de actividad específica pueden estar influidos por el tipo de célula elegida para realizar la sobreexpresión, la comparación relativa de las actividades específicas en cada caso deja en claro que el araquidonil-CoA no es el principal sustrato de ninguna de estas dos isoformas. Por lo tanto esta preferencia por el AA sería una característica específica de GPAT2.

Para poder determinar la canalización de sustratos por una enzima que forma parte de una vía metabólica ramificada pueden utilizarse distintas aproximaciones experimentales. Para las enzimas del metabolismo lipídico un diseño experimental muy utilizado consiste en realizar ensayos en los que se sobreexpresa la enzima en una línea celular y se incuban luego estas células con trazas de un AG radiactivo. Estos ensayos permiten determinar la incorporación relativa de este sustrato radiactivo a los distintos lípidos celulares y realizar así una aproximación *in vitro* de la vía metabólica en la cual participa la enzima estudiada. Así, al incubar células HEK-293 que sobreexpresaban GPAT3 con $\sim 3 \mu\text{M}$ de $[^{14}\text{C}]18:1n9$, pudo observarse que estas células esterificaban 4 veces más de este AG radiactivo en los TAG que las células control (Cao J y col, 2006). Resultados equivalentes se obtuvieron al sobreexpresar GPAT1 en células CHO-K1 e incubar en las mismas condiciones (Igal RA y col, 2001). Esto permitió deducir que tanto las isoformas GPAT1 como GPAT3 estaban implicadas en la vía de síntesis de TAG.

Al realizar los ensayos de incubación de células que sobreexpresan GPAT2 con trazas $[1-^{14}\text{C}]AA$ pudimos observar que, luego de 3 hs de incubación, las células transfectadas esterifican un 40% más de $[1-^{14}\text{C}]AA$ en los TAG que las células control (Fig 1.5). Esto nos permite confirmar que GPAT2 estimula la síntesis de TAG y la esterificación de AA en los mismos.

La presencia de TAG con un alto contenido de AA en células en cultivo ya ha sido descrita. En un trabajo de Blank ML y col. realizado para estudiar la transferencia de de AA entre TAG y GPL estos autores pudieron observar que al incubar células HL60 con $10 \mu\text{M}$ de $[1-^{14}\text{C}]AA$ por 2 hs se obtenían aproximadamente las mismas cantidades (30%) de especies moleculares de TAG con AA esterificado en cada uno de los 3 carbonos del glicerol, e incluso un 24% aproximadamente de triaraquidonilglicerol (Blank ML y col, 1993). Este trabajo es muy interesante debido a que esta es una de las pocas líneas celulares en la cual se ha observado que GPAT2 se encuentra expresada (<http://biogps.gnf.org/#goto=genereport&id=150763>) La síntesis de estas especies moleculares de TAG con alto contenido de AA en una línea celular que naturalmente

expresa GPAT2 apoya de alguna manera los resultados que obtuvimos al sobreexpresar esta isoforma en las células CHO-K1.

Así, mientras las 4 isoformas de GPAT conocidas hasta el momento utilizan como sustratos acilgraso-CoAs de cadena larga, GPAT2 se diferencia de ellas principalmente en su especificidad de sustrato.

GPAT2 fue identificada por primera vez como la actividad GPAT mitocondrial presente en el hígado de los ratones nulos para GPAT1, GPAT2 no se expresa en el hígado de los animales normales (Gimeno RE y Cao J, 2008). Aunque algunas características del fenotipo de los ratones *knock out* para GPAT1, como ser el menor peso corporal y el menor contenido de TAG en hígado y plasma al ser alimentados con una dieta normal sugerían que GPAT2 era capaz de compensar parcialmente la síntesis de TAG (Hammond LE y col, 2002), estos estudios realizados *in vitro* permiten confirmar la participación activa de GPAT2 en esta vía metabólica.

3. GPAT2 es una isoforma mitocondrial NEM sensible, biológicamente activa en testículo de ratas normales.

Si bien los resultados obtenidos al sobreexpresar GPAT2 en cultivos celulares corresponden a la proteína de ratón, como modelo de estudio animal utilizamos principalmente la rata dado que estas proteínas son muy similares; ambas tienen 801 amino ácidos, con una identidad del 95% (766 de 801) y una homología del 97% (783 de 801) (Anexo 1).

La presencia de varias isoformas de GPAT en un mismo tejido, pero con diferentes localizaciones subcelulares, es común en células de mamíferos. En particular en testículo de ratón ya ha sido descrita una isoforma de GPAT (GPAT4) de localización microsomal (Qiu Q y col, 2009). Entonces, debido a que tanto la actividad GPAT2 de localización mitocondrial como las isoformas microsomales de GPAT son sensibles al tratamiento con NEM, para poder realizar las medidas de actividad GPAT NEM sensible necesitábamos contar con mitocondrias altamente puras. Las mitocondrias que se obtienen por el método clásico de centrifugación diferencial (mitocondrias crudas) se encuentran contaminadas con RE. Para purificar estas mitocondrias crudas realizamos una ultracentrifugación en un gradiente de Percoll que permite eliminar esta contaminación. Para evaluar el proceso de purificación, y poder determinar en qué medida la contaminación con membranas de RE afecta a nuestras determinaciones, utilizamos dos metodologías diferentes, la medida de actividad de una enzima marcadora de RE

(NADPH-citocromo c reductasa) y un ensayo de Western blot para una proteína marcadora mitocondrial (VDAC) (Fig 2.1), y ambos resultados demuestran un incremento en la pureza de la preparación de mitocondrias. Estos ensayos nos permiten asegurar que el proceso de purificación fue efectivo y por lo tanto que las medidas de actividad GPAT NEM sensible realizadas en mitocondrias puras corresponden efectivamente a una isoforma mitocondrial y no son consecuencia de una contaminación con las isoformas de RE.

Los ensayos de qRT-PCR realizados por nuestro grupo (Wang S y col, 2007) permitieron demostrar que el ARNm correspondiente a GPAT2 se expresa principalmente en el testículo, pero para poder atribuir una función particular a este gen es necesario demostrar que el mismo da origen a una proteína activa.

Previamente utilizando como muestras mitocondrias obtenidas a partir de hígado de ratones nulos para GPAT1 pudo observarse que la GPAT2 presente en estos animales esterificaba en igual medida palmitoil-CoA y oleoil-CoA, sin embargo, en este experimento sólo se ensayó el oleoil-CoA como ejemplo de sustrato insaturado.

Basándonos en los resultados obtenidos al sobreexpresar GPAT2 en células en cultivo, para realizar la medida de actividad GPAT en testículo utilizamos como sustrato el araquidonil-CoA. Este ensayo nos permitió medir por primera vez una actividad GPAT NEM sensible en mitocondrias puras de animales normales y confirmar así que el producto del gen *Gpat2* es activo en testículo de rata (Fig 2.2).

4. El ARNm correspondiente a *Gpat2* se expresa en los espermatoцитos primarios, y la expresión de la proteína se mantiene a lo largo del proceso de diferenciación celular

El testículo es un órgano compuesto por diferentes tipos de células, poseyendo cada una de ellas una función específica necesaria para el normal funcionamiento del mismo. Debido a esta heterogeneidad celular, conocer la localización celular de una proteína puede ayudar a comprender su función.

En los mamíferos el desarrollo del testículo ocurre de manera progresiva, y durante el mismo tanto las células somáticas como las germinales pasan por periodos de proliferación y diferenciación hasta alcanzar los valores característicos correspondientes al animal adulto (Marty MS y col, 2003; Print CG y Loveland KL, 2000; Eddy EM, 2002).

Por lo tanto, para realizar los estudios de localización celular de *Gpat2* decidimos utilizar como muestras testículos obtenidos a partir de animales de 60 días en los cuales se encuentran presentes en forma simultánea todos los posibles tipos celulares.

Para realizar los ensayos de Northern blot purificamos células de Leydig, de Sertoli y una fracción enriquecida en túbulos seminíferos. Las técnicas aplicadas nos permitieron obtener células de Leydig con un adecuado nivel de pureza, mientras que las células de Sertoli muestran un ligero nivel de contaminación con células de la línea espermática, y los túbulos seminíferos contienen algunas células intersticiales (Fig 2.3). Con esta técnica pudimos observar que, tomando como referencia el nivel de expresión del ARNm correspondiente a Gpat2 en el homogenato, no existe un enriquecimiento de este ARNm en las células de Leydig ni en las células de Sertoli, y que la expresión del ARNm fue máxima en los túbulos seminíferos y comparable al nivel observado en el homogenato (Fig 2.4.B). Teniendo en cuenta que para realizar esta técnica utilizamos testículos de animales adultos, y que a esta edad las células de la línea espermática constituyen la fracción mayoritaria dentro de los túbulos, podemos suponer que el ARNm de Gpat2 se localiza en las células espermáticas. Sin embargo este resultado no nos permite descartar la presencia de Gpat2 en las células de Sertoli.

Por lo tanto para confirmar la localización del ARNm correspondiente a Gpat2 decidimos realizar la técnica de HIS. Esta técnica presenta la ventaja de permitirnos observar en simultáneo a todas las células, tanto somáticas como germinales, que constituyen el testículo directamente en un corte del tejido, permitiéndonos discriminar además entre los distintos tipos de células que constituyen la línea espermática. La HIS nos permitió confirmar que el ARNm correspondiente a Gpat2 de ratón se expresa solo en las células de la línea espermática, en particular en los espermatoцитos primarios (Fig 2.5). Este resultado es coherente con el que obtuvimos al estudiar la localización de la proteína GPAT2 por inmunofluorescencia en cortes de testículo de ratas adultas, en los cuales podemos observar por un lado que esta proteína se expresa en los espermatoцитos primarios, y por otro que su expresión se mantiene durante las etapas siguientes de diferenciación celular (Fig 2.6), lo cual probablemente se deba a una alta estabilidad de la proteína GPAT2.

5. Los niveles de expresión de GPAT2 varían durante el desarrollo postnatal

Teniendo en cuenta por un lado la localización celular de GPAT2, y por otro que el proceso de espermatogénesis se inicia luego del nacimiento y se mantiene a lo largo de la vida adulta, decidimos estudiar si la expresión de GPAT2 se modificaba durante la maduración sexual. Para ello utilizamos animales de diferentes edades y estudiamos la expresión de Gpat2 por qRT-PCR y por Western blot. Los perfiles de expresión del ARNm

(Fig 2.7) y de la proteína (Fig 2.9) coinciden, y nos muestran que los niveles de expresión de Gpat2 varían con la maduración testicular, alcanzando un valor máximo a los 30 días de edad.

Es interesante destacar que otra proteína de la familia de las GPAT, la GPAT4, también se localiza en las células germinales del testículo de ratón. Su ARNm ha sido detectado en espermatoцитos primarios y en espermátides redondas, y su expresión varía con la edad pero de manera diferente a como lo hace GPAT2, dado que GPAT4 muestra un máximo de expresión entre la quinta y sexta semana, y sus niveles se mantienen elevados durante la vida adulta. Este patrón de expresión sugiere que GPAT4 cumpliría alguna función relacionada con el inicio y mantenimiento de la espermatogénesis (Qiu Q y col, 2009), en cambio, y teniendo en cuenta su patrón de expresión, el rol de GPAT2 parece ser importante durante el desarrollo de la primera espermatogénesis.

6. La actividad de GPAT2 alcanza un máximo durante la primera espermatogénesis y correlaciona con el contenido de AA presente en los TAG.

El normal desarrollo de la espermatogénesis implica, además de cambios histológicos, importantes cambios bioquímicos. Los TAG de testículo de ratas adultas se caracterizan por poseer un alto contenido de PUFA siendo el mayoritario el 22:5n6, y por ensayos de depleción de células de la línea germinal y de detección de las gotas de lípidos neutros intracelulares realizados en animales adultos ha sido demostrado que la síntesis de TAG en el testículo ocurre principalmente en las células germinales (Oresti GM y col, 2010). Por otro lado, estudios realizados en testículos de ratas de entre 3 y 10 semanas de edad permiten observar que a los 28 días se produce un aumento en el contenido tanto de TAG como de GPL, lo cual coincide con el descenso testicular e inicio de la espermatogénesis (Ewing LL y col, 1966).

Para comprender la función de GPAT2 realizamos medidas de actividad GPAT NEM sensible, y de cuantificación y composición en AG de los TAG obtenidos de ratas de diferentes edades.

Las medidas de actividad GPAT NEM sensible realizadas en mitocondrias puras y utilizando araquidonil-CoA como sustrato, nos demuestran que la actividad de GPAT2 varía durante el desarrollo postnatal del mismo modo que lo hacen el ARNm y la proteína, alcanzando un valor máximo a los 30 días de edad. Al analizar la composición en AG de los TAG podemos observar que el contenido de AA es máximo en animales de

30 días, lo cual es coherente con el perfil de expresión de GPAT2 y con la mayor afinidad mostrada por GPAT2 hacia este PUFA.

El máximo de expresión de GPAT2 ocurre durante la primera espermatogénesis, la cual se desarrolla en la rata entre las semanas 1 y 8 de vida postnatal, y es un proceso clave para la maduración sexual y la funcionalidad del testículo. Durante esta primera espermatogénesis se ha podido observar que un gran número de células germinales mueren por apoptosis. Esta apoptosis ocurre de manera fisiológica como un mecanismo necesario para mantener una relación óptima entre el número de células germinales y el número de células de Sertoli. Las medidas de actividad y expresión de proteínas proapoptóticas permitieron demostrar que en la rata esta apoptosis asociada a la primera espermatogénesis alcanza un máximo a los 25 días de edad y afecta principalmente a los espermatoцитos primarios (Jahnukainen K y col, 2004). Es interesante destacar que es en estas células en las que se inicia la expresión de GPAT2.

Aunque muchos de los efectos ejercidos por el AA dependen de su estructura química o de productos de su metabolismo, hoy en día se sabe que el AA de por sí cumple un rol muy importante participando de las vías de transducción de señales involucradas en la proliferación y supervivencia celular (Surette ME y col, 1996). En mamíferos ha sido observado que altos niveles de AA libre intracelular promueven apoptosis, y se ha sugerido que las vías metabólicas que disminuyen los niveles de AA libre dentro de las células podrían por lo tanto prevenir la apoptosis (Rizzo MT y col, 1999; Finstad HS y col, 1994). Debido a estos efectos ejercidos sobre la supervivencia celular varios estudios indican que el metabolismo del AA es importante durante el desarrollo del cáncer. Así, en muestras obtenidas de distintos tipos de tumores se han encontrado sobreexpresadas las enzimas ciclooxygenasa 2 (COX2) y acilCoA sintetasa 4 (FACL4) las cuales utilizan AA como sustrato (Cao Y y col, 2000).

La presencia en el genoma de los mamíferos de varias isoenzimas de GPAT sugiere que cada una de ellas cumpliría una función específica en el metabolismo de los glicerolípidos. En general, la presencia de varios genes puede ser una estrategia para poder aplicar un mecanismo compensatorio en caso de mutaciones que afecten a la expresión de alguno de ellos, puede facilitar un mecanismo de regulación especial en los diferentes tejidos en los que cada uno se expresa o permitir la canalización de sustratos hacia diferentes productos finales. Por lo tanto, conocer la localización tisular y subcelular, así como la especificidad de sustrato de cada una de estas isoformas es esencial para comprender su función.

Existen diferencias importantes entre GPAT2 y las demás isoformas de GPAT. Las isoformas de GPAT 1 y 3 se localizan principalmente en tejidos lipogénicos, como el hígado y el tejido adiposo, y son las enzimas responsables de la síntesis de TAG. GPAT4 ha sido detectada en testículo, pero a diferencia de GPAT2 también se expresa en hígado, tejido adiposo, y glándula mamaria. GPAT4 se localiza en el RE y es la enzima responsable del 50% de la actividad GPAT en el hígado. Los ratones nulos para GPAT4 presentan valores disminuidos de TAG en el hígado, en el tejido adiposo y en la leche materna, pero en ellos no han sido reportados defectos en la fertilidad (Nagle CA y col, 2008).

Por su parte GPAT2 también está implicada en la síntesis de TAG, pero presenta un alto nivel de expresión en el testículo, en particular en células cuya principal característica es la de encontrarse en división celular activa, en las cuales GPAT2 cataliza la esterificación del araquidonil-CoA en los TAG. GPAT2, al contrario de lo que sucede con GPAT4, no ha sido detectada en tejidos lipogénicos y además, al contrario de lo que sucede con Gpat1 y otras enzimas lipogénicas como la ácido graso sintasa y la acetil-CoA carboxilasa, los niveles del ARNm correspondiente a Gpat2 no resultan alterados en experimentos de ayuno-realimentación (Wang S, 2007). Esto sugiere que GPAT2 podría estar involucrada en la síntesis de TAG que estarían cumpliendo una función diferente a la de ser moléculas de reserva energética.

Los testículos de mamíferos presentan un alto contenido de PUFA de 20 a 22 átomos de carbono, pero a diferencia de lo que sucede en otros órganos con alto contenido de PUFA el testículo resulta continuamente drenado de estos AG cuando los espermatozoides maduros son transportados hacia el epidídimo; parte de estos PUFA son reciclados por las células de Sertoli durante la fagocitosis de cuerpos residuales. En el testículo de ratas adultas los TAG presentan un alto contenido de 22:5n6, y se encuentran concentrados principalmente en los CR, siendo producidos por lo tanto por las células más diferenciadas de la línea espermática, durante los últimos estadios de la espermiogénesis. Por otro lado, al estudiar la composición en AG de los TAG en ratas adultas puede observarse que el contenido de TAG con AA no se modifica, mientras que el contenido de TAG con 22:5n6 aumenta a medida que se pasa de espermátocitos en paquiteno a espermátides redondas y a CR (Oresti GM y col, 2010). Varios resultados experimentales apoyan la idea que, una posible función de estas especies moleculares de TAG con alto contenido de PUFA presentes en el testículo es la de almacenar estos AG preformados, los cuales pueden servir también como precursores para la síntesis de los PUFA de 22 carbonos presentes en los GPL (Furland NE y col, 2003).

Si bien la función de GPAT2 puede estar relacionada con este mecanismo, siendo la enzima responsable de almacenar específicamente el AA, el hecho de que su expresión y actividad se modifiquen con la edad sugiere que esta proteína podría estar cumpliendo además un rol específico relacionado con la maduración testicular. Teniendo en cuenta además que alteraciones en los niveles de expresión de enzimas que utilizan al AA como sustrato afectan a la viabilidad celular, esto nos permite suponer que la síntesis de TAG catalizada por GPAT2 podría ayudar también a regular los niveles de AA libres dentro de las células germinales participando de este modo de los mecanismos relacionados con la supervivencia de las mismas.

CONCLUSIONES

1. La sobreexpresión de GPAT2 en células de mamífero promueve la síntesis de y almacenamiento de TAG.
2. GPAT2 muestra mayor afinidad por el araquidonil-CoA como sustrato que por otros acilgraso-CoAs.
3. GPAT2 es una isoforma mitocondrial NEM sensible biológicamente activa en testículo de ratas normales.
4. El ARNm correspondiente a *Gpat2* se expresa en los espermatoцитos primarios, mientras que la expresión de la proteína se mantiene durante la división y diferenciación celular.
5. Los niveles de expresión y actividad de GPAT2 varían durante el desarrollo postnatal, alcanzando un máximo durante la primera espermatogénesis.
6. El contenido de AA en los TAG del testículo varía durante el desarrollo postnatal de manera coherente con la actividad de GPAT2.

BIBLIOGRAFÍA

Amann RP. The Cycle of the Seminiferous Epithelium in Humans: A Need to Revisit? *Journal of Andrology* 29(5):469–487. **2008**

Aveldaño MI, Robinson BS, Johnson DW, Poulos. A Long and very long chain polyunsaturated fatty acids of the n-6 series in rat seminiferous tubules. Active desaturation of 24:4n-6 to 24:5n-6 and concomitant formation of odd and even chain tetraenoic and pentaenoic fatty acids up to C32. *J Biol Chem* 268: 11663-11669. **1993**

Beckman JK, Coniglio JG. The Metabolism of Polyunsaturated Fatty Acids in Rat Sertoli and Germinal Cells. *Lipids* 15: 389–394. **1980**

Blaise R, Guillaudeux T, Tavernier G, Daegeleni D, Evrard B, Mairal A, Holm C, Jegou B, Langin D. Testis Hormone-sensitive Lipase Expression in Spermatids Is Governed by a Short Promoter in Transgenic Mice. *J Biol Chem* 276(7): 5109–5115. **2001**

Blank ML, Smith ZL, Snyder F. Arachidonate-containing triacylglycerols: biosynthesis and a lipolytic mechanism for the release and transfer of arachidonate to phospholipids in HL-60 cells. *Biochem Biophys Acta* 1170: 275-282. **1993**

Brasaemle DL. The perilipin family of structural lipid droplet proteins: Stabilization of lipid droplets and control of lipolysis. *J Lipid Res* 48: 2547–2559. **2007**

Borg CL, Wolski KM, Gibbs GM, O'Bryan MK. Phenotyping male infertility in the mouse: how to get the most out of a 'non-performer'. *Human reproduction update* 16(2): 205-224. **2010**

Cameron DF, Muffly KE. Hormonal regulation of spermatid binding. *J Cell Sci* 100: 623–633. **1991**

Cao Y, Pearman AT, Zimmerman GA, McIntyre TM, Prescott SM. Intracellular unesterified arachidonic acid signals apoptosis. *PNAS* 97(21): 11280-11285. **2000**

Cao J, Li JL, Li D, Tobin JF, Gimeno RE. Molecular identification of microsomal acyl-CoA: glycerol-3-phosphate acyltransferase, a key enzyme in de novo triacylglycerol synthesis. *PNAS* 103(52): 19695-19700. **2006**

Castilla RM, Gadaleta AF, Castillo A, Duarte I, Neuman C, Paz M, Cornejo F, Podesta EJ. New enzymes involved in the mechanism of action of epidermal growth factor in a clonal strain of Leydig tumor cells. *Endocrinology* 149: 3743- 3752. **2008**

Coleman RA, Lee DP. Enzymes of triacylglycerol synthesis and their regulation. *Prog Lipid Res* 43: 134-176. **2004**

Chanmugan PS, Boudreau MD, Hwang DH. Dietary (n-3) Fatty Acids Alter Fatty Acid Composition and Prostaglandin Synthesis in Rat Testis. *J Nutr* 121: 1173-1178. **1991**

Chen YQ, Shang Kuo M, Li S, Bui HH, Peake DA, Sanders PE, Thibodeaux SJ, Chu S, Qian YW, Zhao Y, Bredt DS, Moller DE, Konrad RJ, Beigneux AP, Young SG, CaoG. AGPAT6 Is a Novel Microsomal Glycerol-3-phosphate Acyltransferase. *J Biol Chem* 283(15): 10048–10057. **2008**

- Diascro Jr DD**, Vogel RL, Johnson TE, Witherup KM, Pitzemberger SM, Rutledge SJ, Prescott DJ, Rodan GA, Schmidt A. High Fatty Acid Content in Rabbit Serum Is Responsible for the Differentiation of Osteoblasts Into Adipocyte-like Cells. *J Bone Miner Res* 13: 96–106. **1998**
- Donnell LO**, Robertson KM, Jones ME, Simpson ER, Henry P. Estrogen and Spermatogenesis. *Endocrine Reviews* 22(3): 289–318. **2001**
- Ducharme NA**, Bickel PE. Minireview: Lipid Droplets in Lipogenesis and Lipolysis. *Endocrinology* 149: 942-949. **2008**
- Eddy EM**. Male Germ Cell Gene Expression. Laboratory of Reproductive and Developmental Toxicology, National Institute of Environmental Health Sciences, National Institutes of Health, Research Triangle Park, North Carolina 27709. **2002**
- Ewing LL**, Means AR, Beames CG, Montgomery RD. Biochemical changes in rat testis during postnatal maturation. *J Reprod Fert* 12: 295-307. **1966**
- Finstad HS**, Kolset SO, Holme JA, Wiger R, Farrants AK, Blomhoff R, Drevon CA. Effect of n-3 and n-6 fatty acids on proliferation and differentiation of promyelocytic leukemic HL-60 cells. *Blood* 84: 3799-3809. **1994**
- Folch J**, Lees M, Sloane Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* 226: 497-509. **1957**
- Franca LR**, Ogawa T, Avarbock MR, Brinster RL, Russell LD. Germ Cell Genotype Controls Cell Cycle during Spermatogenesis in the Rat. *Biology of Reproduction* 59: 1371–1377. **1998**
- Furland NE**, Maldonado EN, Aveldaño MI. Very long chain PUFA in murine testicular triglycerides and cholesterol esters. *Lipids* 38: 73-80. **2003**
- Furland NE**, Zanetti SR, Oresti GM, Maldonado EN, Aveldaño MI. Ceramides and Sphingomyelins with High Proportions of Very Long-chain Polyunsaturated Fatty acids in Mammalian Germ Cells. *J Biol Chem* 282(25): 18141-18150. **2007 a**
- Furland NE**, Maldonado EN, Ayuza Aresti P, Aveldaño MI. Changes in Lipids Containing Long- and Very Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acids in Cryptorchid Rat Testes. *Biology of Reproduction* 77: 181–188. **2007 b**
- Gimeno RE**, Cao J. Mammalian glycerol-3-phosphate acyltransferases : new genes for an old activity. *Journal of Lipid Research* 49: 2079-2088. **2008**
- Gonzalez-Baro MR**, Granger DA, Coleman RA. Mitochondrial glycerol-3-phosphate acyltransferase contains two transmembrane domains with the active site in the N-terminal domain facing the cytosol. *J Biol Chem* 276: 43182-43188. **2001**
- Gonzalez-Baro MR**, Lewin TM, Coleman RA. Regulation of Triglyceride Metabolism. II. Function of mitochondrial GPAT1 in the regulation of triacylglycerol biosynthesis and insulin action. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 292: 1195-1199. **2007**

Hammond LE, Gallagher PA, Wang S, Hiller S, Kluckman KD, Posey-Marcos EL, Maeda N, Coleman RA. Mitochondrial Glycerol-3-Phosphate Acyltransferase-Deficient Mice Have Reduced Weight and Liver Triacylglycerol Content and Altered Glycerolipid Fatty Acid Composition. *Molecular and Cellular Biology* 22(23): 8204-8214. **2002**

Harris CA, Haas JT, Streeper RS, Stone SJ; Kumari M, Yang K, Han X, Brownell N, Gross RW, Zechner R, Farese Jr RV. DGAT enzymes are required for triacylglycerol synthesis and lipid droplets in adipocytes. *Journal of Lipid Research* 52: 657-667. **2011**

Heller CG, Clermont Y. Spermatogenesis in man: an estimation of its duration. *Science* 140: 184-186. **1963**

Hovius R, Lambrechts H, Nicolay K, de Kruijff B. Improved methods to isolate and subfractionate rat liver mitochondria. Lipid composition of the inner and the outer membrane. *Biochem Biophys Acta* 1021: 217-226. **1990**

Hurtado de Catalfo GE, Mandon EC, Gomez Dumm I. Arachidonic Acid Biosynthesis in Non-Stimulated and Adrenocorticotropin-Stimulated Sertoli and Leydig Cells. *Lipids* 27: 593-598 **1992**

Igal RA, Wang S, Gonzalez-Baro M, Coleman RA. Mitochondrial glycerol phosphate acyltransferase directs the incorporation of exogenous fatty acids into triacylglycerol. *J Biol Chem* 276: 42205-42212. **2001**

Jahnukainen K, Chrysis D, Hou M, Parvinen M, Eksborg S, So O. Increased Apoptosis Occurring During the First Wave of Spermatogenesis Is Stage-Specific and Primarily Affects Midpachytene Spermatocytes in the Rat Testis. *Biology of Reproduction* 70: 290-296. **2004**

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685. **1970**

Lejona S, Benetti MS, Fay F, Fay O. Avances en el Diagnóstico Molecular: reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real. Anuario FundaciónDr. J. R. Villavicencio 14: 33-37. **2006**

Lewin TM, Granger DA, Kim JH, Coleman RA. Regulation of mitochondrial sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase activity: response to feeding status is unique in various rat tissues and is discordant with protein expression. *Arch Biochem Biophys* 396: 119-127. **2001**

Lewin TM, Schwerbrock NMJ, Lee DP, Coleman RA. Identification of a New Glycerol-3-phosphate Acyltransferase Isoenzyme, mtGPAT2, in Mitochondria. *J Biol Chem* 279(14): 13488-13495. **2004**

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275. **1951**

Marty MS, Chapin RE, Parks LG, Thorsrud BA. Development and Maturation of the Male Reproductive System. *Birth Defects Research (Part B)* 68: 125-136. **2003**

Masanori K, Morris PL. Growth Hormone Regulates Steroidogenic Acute Regulatory Protein Expression and Steroidogenesis in Leydig Cell Progenitors. *Endocrinology* 140(4): 1681-1686. **1999**

Mc Lachlan RI, O'Donell L, Meachem SJ, Stanton PG, de Kretser DM, Pratis K, Robertson DM. Identification of Specific Sites of Hormonal Regulation in Spermatogenesis in Rats, Monkeys, and Man. *Hormonal Regulation of Spermatogenesis*. Copyright © 2002 by The Endocrine Society, 149-179. **2002**

Meachem SJ, Ruwanpura SM, Ziolkowski J, Ague JM, Skinner MK, Loveland KL. Developmentally distinct in vivo effects of FSH on proliferation and apoptosis during testis maturation. *Journal of Endocrinology* 186: 429-446. **2005**

Mruk DD, Cheng CY. Sertoli-Sertoli and Sertoli-Germ Cell Interactions and Their Significance in Germ Cell Movement in the Seminiferous Epithelium during Spermatogenesis. *Endocrine Reviews* 25: 747-806. **2004**

Nagle CA, Vergnes L, DeJong H, Wang S, Lewin TM, Reue K, Coleman RA. Identification of a novel sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase isoform, GPAT4, as the enzyme deficient in *Agpat6*^{2 / 2} mice. *J Lipid Res* 49: 823-831. **2008**

Nogueiras R, Barreiro ML, Caminos JE, Gaytán F, Suominen JS, Navarro VM, Casanueva FF, Aguilar E, Toppari J, Diéguez C, Tena-Sempere M. Novel expression of resistin in rat testis: functional role and regulation by nutritional status and hormonal factors. *J Cell Sci* 117: 3247-3257. **2004**

Oresti GM, Reyes JG, Luquez JM, Osses N, Furland NE, Aveldaño MI. Differentiation-related changes in lipid classes with long-chain and very long-chain polyenoic fatty acids in rat spermatogenic cells. *J Lipid Res* 51: 2909-2921. **2010**

Osuga J, Ishibashi S, Oka T, Yagyu H, Tozawa R, Fujimoto A, Shionoiri F, Yahagi N, Kraemer FB, Tsutsumi O, Yamada N. 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. **2000**

Parra MT, Viera A, Gómez R, Page J, Benavente R, Santos JL, Rufas JS, Suja JA. Involvement of the cohesin Rad21 and SCP3 in monopolar attachment of sister kinetochores during mouse meiosis I. *J Cell Sci* 117: 1221-1234. **2004**

Pellon-Maison M, Coleman RA, Gonzalez-Baro MR. The C-terminal region of mitochondrial glycerol-3-phosphate acyltransferase-1 interacts with the active site region and is required for activity. *Arch Biochem Biophys* 450: 157-166. **2006**

Pellon-Maison M, Montanaro MA, Coleman RA, Gonzalez-Baro MR. Mitochondrial glycerol-3-P acyltransferase 1 is most active in outer mitochondrial membrane but not in mitochondrial associated vesicles (MAV). *Biochem Biophys Acta* 1771: 830-838. **2007**

Poirot C, Cherruau B. Infertilidad masculina: Aspectos clínicos e investigaciones biológicas. *Acta Bioquím Clín Latinoam* 39(2): 225-241. **2005**

- Print CG**, Loveland KL. Germ cell suicide: new insights into apoptosis during spermatogenesis. *BioEssays* 22: 423-430. **2000**
- Qiu Q**, Liu G, Li W, Shi Q, Zhu F, Lu G. Glycerol-3-phosphate acyltransferase 4 gene is involved in mouse spermatogenesis. *Acta Biochem Biophys Sin* 41(8): 668-676. **2009**
- Refferstol K**, Tran TN, Haugen TB, Christophersen BO. Metabolism of very long chain polyunsaturated fatty acids in isolated rat germ cells. *Lipids* 36: 601-606. **2001a**
- Refferstol K**, Haugen TB, Tran TN, Christophersen BO. Studies on the metabolism of essential fatty acids in isolated human testicular cells. *Reproduction* 121: 881-887. **2001 b**
- Rizzo MT**, Regazzi E, Garau D, Akard L, Dugan M, Boswell HS, Rizzoli V, Carlo-Stella C. Induction of Apoptosis by Arachidonic Acid in Chronic Myeloid Leukemia Cells. *Cancer Research* 59: 5047-5053. **1999**
- Rosenthal, MD**. Selectivity in incorporation, utilization and retention of oleic and linoleic acids by human skin fibroblasts. *Lipids* 15: 838-848. **1980**
- Sæther T**, Tran TN, Rootwelt H, Christophersen BO, Haugen TB. Expression and Regulation of $\Delta 5$ -Desaturase, $\Delta 6$ -Desaturase, Stearoyl-Coenzyme A (CoA) Desaturase 1, and Stearoyl-CoA Desaturase 2 in Rat Testis. *Biology of Reproduction* 69: 117-124. **2003**
- Sambrook J**, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual on the web. Cold Spring Harbor, N.Y. Cold Spring Harbor Laboratory. **2001**
- Schadinger SE**, Bucher NL, Schreiber BM, Farmer SR. PPAR γ 2 regulates lipogenesis and lipid accumulation in steatotic hepatocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 288:1195-1205. **2005**
- Serio M**, Forti G. The impact of andrological research on the treatment of male infertility. En: Waites GMH, Frick J, Baker GWH (Eds). Current advances in andrology, Monduzzi Ed, 23-29. **1997**
- Surette ME**, Winkler JD, Fonteh AN, Chilton FH. Relationship between Arachidonate-Phospholipid Remodeling and Apoptosis. *Biochemistry* 35: 9187-9196. **1996**
- Vogt PH**. Genetic disorders of human spermatogenesis. En: Waites GMH, Frick J, Baker GWH (Eds). Current advances in andrology, Monduzzi Ed, 51-73. **1997**
- Wang H**, Xiong W, Chen Y, Ma Q, Ma J, Ge Y, Han D. Evaluation on the phagocytosis of apoptotic spermatogenic cells by Sertoli cells in vitro through detecting lipid droplet formation by Oil Red O staining. *Reproduction* 132: 485-492. **2006**
- Wang R**, Yeh S, Tzeng C, Chang C. Androgen Receptor Roles in Spermatogenesis and Fertility: Lessons from Testicular Cell-Specific Androgen Receptor Knockout Mice. *Endocrine Reviews* 30(2):119-132. **2009**

Wang S, Lee DP, Gong N, Schwerbrock NM, Mashek DG, Gonzalez-Baro MR, Stapleton C, Li LO, Lewin TM, Coleman RA. Cloning and functional characterization of a novel mitochondrial N-ethylmaleimide-sensitive glycerol-3-phosphate acyltransferase (GPAT2). *Arch Biochem Biophys* 465: 347- 358. **2007**


Wendel AA, Lewin TM, Coleman RA. Glycerol-3-phosphate acyltransferases: Rate limiting enzymes of triacylglycerol biosynthesis. *Biochem Biophys Acta* 1791(6): 501-506. **2008**

Zanetti SR, Maldonado EN, Aveldaño MI. Doxorubicin Affects Testicular Lipids with Long-Chain (C18-C22) and Very Long-Chain (C24-C32) Polyunsaturated Fatty Acids. *Cancer Research* 67: 6973-6980. **2007**

Alineamiento por homología de las secuencias proteicas de GPAT2 de rata y ratón

Query: secuencia correspondiente al ratón

Sbjct: secuencia correspondiente a la rata



Blast 2 Sequences results

PubMed
Entrez
BLAST
OMIM
Taxonomy
Structure

BLAST 2 SEQUENCES RESULTS VERSION BLASTP 2.2.16 [Mar-25-2007]

Matrix: BLOSUM62 gap open: 11 gap extension: 1

x_dropoff: 0 expect: 10.00 wordsize: 3 [Filter](#) View option: Standard

Masking character option: X for protein, n for nucleotide Masking color option: Black

Show CDS translation Align

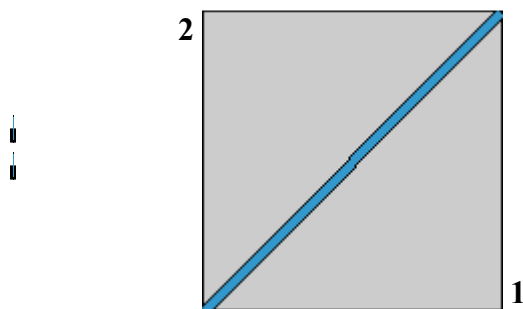
Sequence 1: GPAT2 de ratón

Length = 801 (1 .. 801)

Sequence 2: GPAT2 de rata

Length = 801 (1 .. 801)

Gráfico de correlación de secuencias:



NOTE: Bitscore and expect value are calculated based on the size of the nr database.



Score = 1283 bits (3320), Expect = 0.0, Method: Composition-based stats.
Identities = 766/801 (95%), Positives = 783/801 (97%), Gaps = 0/801 (0%)

Ratón	1	MDTMLKSNPQTQQRSNHNGQETSLWSSSFGMKMEAITPFLGKYRPFMGRCCQCTCPKSWE	60
Rata	1	M+TMLKSNPQ QQR+NH+GQETSLWSS FGMKMEAITPFLGKYRPFMGRCCQCTCPKSWE	60
Ratón	61	SLFHRSIMDLGFCNVILVKEENTFRFRGWLVRRRCYFLWSLEQHIPTSFSDASQKIMENTGV	120
Rata	61	SLFHRSIMDLGFCNVILVKEENTFRFRGWLVRRRCYFLWSLEQHIPTS DASQ IMENTGV	120
Ratón	121	QNLLSGRVPGAAGEGQAPLKVKEVQRILGHIQTTPRPFLRLFXWALLWFLNRLFLNVQ	180
Rata	121	QNILLGKVPGAAGEGQAPDLVKKEVQRILGHIQTTPRPFLRLFSWALLWFLNRLFLNVQ	180
Ratón	181	LHKGQMKMVQKAVQEGSPLVFLSTHKSLLDGFLLPFVLFVFSQGLGVVVALDSRTCSPALR	240
Rata	181	LHKGQMKMV KA QEGSPLVFLSTHKSLLDGFLLPFVLFVFSQGLGV+RVALDSRTCSPALR	240
Ratón	241	ALLRKLGGFLFLPPEVNLSLDNSEGILARAVVRATVEELLTSGQPLLIIFLEPPGSPGPRL	300
Rata	241	ALLRKLGGFLFLPPE NLSLD+SEGILARAVVRATVE+LLTSGQPLLIIFLEE PG PGPRL	300
Ratón	301	SALGQAWLGVVIQAVQAGIISDATLVPVAIAYDLVPDAPCNMNDLAPLGLWTGALAVFR	360
Rata	301	SALGQAWLG+V+QAVQAGI+ DATLVPVA AYDLVPDAPCNM HDLAPLGLWTGALA+FR	360
Ratón	361	RLCNCWGCNRRVCVRVHLAQPFSLQEYTTINARSCWDSRQTLLEHLLQPIVLGECVVPDTE	420
Rata	361	RLCNCWGCNRRVCVRVHLAQPFSLQEYTTINARSCW SRQTLLEHLLQPIVLGECVVPDTE	420
Ratón	421	KEQEWPPTGLLLALKEEDQLLVRRLSRHVLSASVASSAVMSTAIMATLLLLLKHQKGVVL	480
Rata	421	KEQEWPPTSLLLALKEEDQLLVRRLSRHVLSASVASSAVMSTAIMATLLLLLKHQKGVVL	480
Ratón	481	SQLLGEFSWLTEETLLRGFDVGFSGQLRCLAQHTLSLLRAHVLLRVHQDGLVVVPRPGP	540
Rata	481	SQLLGEFSWLTEETLLRGFDVGFSGQLRCLAQHTLSLLRAHVLLRVHQDGLVVVPRPGP	540
Ratón	541	GLTHLARLSMELLPTFLSEAVGACAVRGLLAGRVPPEGPWELQGIELLSONELYRQIILL	600
Rata	541	GLTHLARLSMELLPTFLSEAVGACAVRGLLAGRVPPEGPWELQGIELLSONELYRQIILL	600
Ratón	601	LHLLPQDLLLLPQPCQSSYCYCQEVLDRLIQCGLLVAEETPGSRPACDTGRQHLSAKLLWK	660
Rata	601	LHLLPQDLLLLPQPCQSSYCYCQEVLDRLIQCGLLVAEETPGSRPACDTGRQHLSAKLLWK	660
Ratón	661	PSGDFTDSESDDFEPPGGRCFRLSQQSRCPDFFLFLCRLLSPIKAFQAATFLHLGQLP	720
Rata	661	PSGDFTDSESDDFEPPGGRCFRLSQQSRCPDFFLFLCRLLSPIKAFQAATFLHLGQLP	720
Ratón	721	DSEVAYSEKLFQFLQACAQEEGIFECADPNLAISAVWTFKDLGVLQEMPSPTGQHLHLS	780
Rata	721	DSEV YSEKL QFLQACAQEEGIFECADPNLAISA+WTFKDLGVLQ++PSPTGQHLHLS	780
Ratón	781	TFATRDNDKLEQFIRQFICS 801	
Rata	781	TFA+RDNDKLEQFIRQFICS 801	

ANEXO 2: BUFFERS Y SOLUCIONES

Buffer glicina: glicina 0,1M; metanol 30%, pH: 3

Buffer fosfato salino (PBS): fosfato de sodio 10 mM; NaCl 150 mM; ph: 7,4

Buffer fosfato salino con Tween (PBS-T): fosfato de sodio 10 mM; NaCl 150 mM;
Tween 0,005 % v/v; pH 7,4

Buffer H: HEPES-KOH 10 mM, pH: 7,4 ; sacarosa 0.25 M; EDTA 1 mM ; DTT 1 mM

Buffer HBSS(Hanks' Balanced Salt Solution): NaCl 137 mM; KCl 5 mM; Na₂HPO₄·12H₂O
0.3 mM; KH₂PO₄ 1.1 mM; Glucosa 6.1 mM

Buffer KRBG: NaCl 100 mM; KCl 5 mM; CaCl₂ 2.6 mM; KH₂PO₄ 1.2 mM; NaHCO₃ 26
mM; glucosa 10 mM; estrptomocina 100 mg/L

Buffer KRBG-A: albúmina al 0,1 % p/v en KRBG

Buffer KRBG-Mg⁺⁺: KRBG más MgSO₄·7H₂O 1.2 mM

Buffer MOPS 10X: MOPS 0,2M pH: 7; acetato de Na 0,05M; EDTA 0,01M

Buffer SSC 10X: NaCl 87,65 g/L; Citrato de sodio · 2H₂O 44,1 g/L; pH: 7,0

Buffer de siembra para ARN 6X: 50% v/v glicerol; EDTA 1 mM; Azul de Bromofenol
0,25% p/v; xilenocianol 0,25% p/v

Buffer de siembra para ADN 6X: Glicerol 50% v/v; buffer TAE 1 X; Azul de Bromofenol
1% p/v; Xilenocianol 1% p/v

Buffer TAE 1 X: Tris 0,04 M; Na·Acetato·3H₂O 0,02 M; EDTA-Na₂·2H₂O 1 mM; pH: 7,2

Buffer TBE: Tris 0,05 M; Acido Bórico 0,05 M; EDTA-Na₂·2H₂O 1 mM

Buffer de transferencia: Tris-HCl 125 mM; glicina 0,1 M; metanol 20%

Medio Luria Bertani (LB): triptona (Britania) 10 g/L; extracto de levadura (Britania) 5
g/L; NaCl (Carlo Erba) 10 g/L

Medio SOC: peptona 20 g/l; extracto de levadura 5 g/l; NaCl 0,584 g/l; KCl 0,186 g/l;
Glucosa 20 mM; pH: 7

Mezcla desnaturizante para ARN: agua bidestilada estéril 2,25 µl; buffer MOPS 10X
1,0 µl; formaldehído 37% v/v 1,75 µl; formamida 5,0 µl

Reactivo de Denhart 1X: 2,5 g% de Ficoll; 2,5 g% de Polivivilpirrolidona; 2,5 g% de BSA

Solución de competencia: MnCl₂·4H₂O 1,088% p/v; CaCl₂·2H₂O 0,22% p/v; KCl 1,865%
p/v; Pipes 0,01 M

Solución de pre-hibridización: 2,5 ml de formamida (JT Baker Ultrapura); Fosfato de Na 0,12 M pH 7,2; NaCl 0,25 M; SDS 7% p/p; EDTA 1 mM pH 8; reactivo de Denhart 1X; ADN de esperma de salmón 0,1 mg/ml

Solución de *stripping*: 10X SSC 1,25 ml; SDS 10% 12,5 ml; agua estéril c.s.p 250 ml