



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Trabajo de Tesis Doctoral

***Función y regulación de la glicerol-3-fosfato
aciltransferasa 2 (GPAT2) en relación al
crecimiento y diferenciación celular en su
entorno fisiológico y patológico***

Tesista: Lic. GARCÍA FABIANI, María Belén

Directora: Dra. GONZALEZ BARÓ, María del Rosario

Codirector: Dr. MONTANARO, Mauro Aldo

Año 2015

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) "Prof. Dr. Rodolfo R. Brenner", de la Facultad de Ciencias Médicas, de la Universidad Nacional de La Plata, bajo la dirección de la Dra. María del Rosario Gonzalez Baró y la co-dirección del Dr. Mauro Montanaro.

Mi reconocimiento

A las autoridades del INIBIOLP, el Dr. Horacio Garda y la Dra. Margarita García, por haberme abierto las puertas del Instituto,

A CONICET, por haberme otorgado las becas doctorales Tipo I y Tipo II para poder realizar este trabajo de Tesis Doctoral y por el apoyo que otorgó a nuestro grupo de investigación,

A FIC-NIH, por su generoso subsidio que nos permitió realizar experimentos con reactivos de la mejor calidad,

A las autoridades de la Facultad de Ciencias Exactas, que me aceptaron en la Carrera de Doctorado en la misma Facultad que me formó como Licenciada en Bioquímica.

Mi agradecimiento

A mi directora de tesis, la Dra. María Gonzalez Baró (“Marita”), por haberme aceptado en su grupo de investigación, por todo lo que me enseñó y me permitió aprender de ella y por quererme y respetarme dentro y fuera del laboratorio.

A mi co-director de tesis, el Dr. Mauro Montanaro, por su gran ayuda durante todos estos años, su excelente predisposición al trabajo en equipo y su constante guía.

A la Dra. Magali Pellon Maison, por sus consejos y sus propuestas experimentales.

A mis compañeras y amigas del laboratorio, Eli, Yose, Marian, Sole, Carli y Guille, quienes alegraron mis días dentro y fuera del trabajo y me apoyaron constantemente.

Al Dr. Pablo Stringa y el personal del Laboratorio de Trasplante de Órganos de la Facultad de Ciencias Médicas, UNLP, por su valiosa contribución en el experimento de silenciamiento in vivo.

A todo el personal del Bioterio de la Facultad de Ciencias Médicas, en especial al Médico Veterinario Juan Manuel Lofeudo, por su gran ayuda en el manejo y cuidado de los animales.

A Mario Raúl Ramos por su colaboración en el diseño y corrección de gráficos.

A Rodrigo Tarabini de la Cátedra de Patología “B” de la Facultad de Ciencias Médicas por su asistencia en la preparación de cortes histológicos.

A la Dra. Amada Segal y el personal del CINIBA por haberme permitido utilizar su cuarto de cultivo celular durante los primeros años de trabajo.

Al Dr. Ezequiel Lacunza por su gran ayuda en la búsqueda y análisis de datos bioinformáticos.

A todo el personal del INIBIOLP, especialmente a Nico, Omar, Aldana, Nahuel, Andrea, Ignacio y al Dr. Rodolfo Goya y su grupo de investigación por haberme ayudado desinteresadamente cada vez que lo necesité.

A mis papás y a Agustín, por haberme acompañado y escoltado incondicionalmente durante este desafío.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	páginas 1-17
1. <u>ESPERMATOGÉNESIS</u>	páginas 1-14
2. <u>GLICEROL-3-FOSFATO ACILTRANSFERASA 2</u>	páginas 14-16
3. <u>ANTÍGENOS CÁNCER-TESTÍCULO</u>	páginas 16-17
 HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS	 página 18
 MATERIALES Y MÉTODOS	 páginas 19-51
 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	 páginas 52-106
PRIMERA SECCIÓN:	
<u>CARACTERÍSTICAS DE GPAT2 DE RATÓN EN SU CONTEXTO FISIOLÓGICO</u>	páginas 52-86
SEGUNDA SECCIÓN:	
<u>REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE GPAT2 DE HUMANO Y CARÁCTERÍSTICAS EN SU CONTEXTO PATOLÓGICO</u>	páginas 87-106
 CONCLUSIONES	 página 107
 REFERENCIAS	 páginas 108-114
 ANEXO 1	 página 115
 ANEXO 2	 páginas 116-131

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

9cisRA: 9-cis-ácido retinoico.

AR: receptor de andrógenos.

ATRA: todo trans (*all-trans*) ácido retinoico.

BSA: seroalbúmina bovina.

BTB: barrera hemato-testicular.

c.s.p.: cantidad suficiente para.

C: citosina/s.

CTA: antígeno cáncer testículo.

DAC: 5-aza-2'-desoxicitidina.

DHT: dihidrotestosterona.

DMEM: Medio Eagle Modificado por Dulbecco.

DNMT: *de novo* metiltransferasa.

E: estradiol

ER: receptor de estrógenos.

GPAT: glicerol-3-fosfato aciltransferasa.

H: histona/s.

HDAC: histona desacetilasa.

HAT: histona acetiltransferasa.

KO: *knock-out*.

LB: medio Luria Bertani.

LPA: ácido lisofosfatídico.

PA: ácido fosfatídico.

PPAR: receptor del activador de proliferación de peroxisomas.

RA: ácido retinoico.

RAR: receptor de ácido retinoico.

RXR: receptor de ácido retinoico X.

SFB: suero fetal bovino.

T: testosterona.

TB: buffer de transformación.

TSA: tricostatina A.

INTRODUCCIÓN

1. ESPERMATOGENÉISIS

1.1. CONCEPTOS GENERALES

Los testículos de los mamíferos son órganos pares que esencialmente se encargan de la producción de espermatozoides y la síntesis de esteroides. Están compuestos por una serie de túbulos y su tejido circundante, encerrados en una cápsula de tejido conectivo, llamada túnica albugínea. La espermatogénesis se lleva a cabo en los túbulos seminíferos, estructuras tortuosas y curvas cuyos extremos desembocan en la rete testis, una anastomosis ubicada en el polo vascular del testículo. La rete testis se conecta por medio de los conductillos eferentes con el epidídimo, un tubo contorneado que se ubica en la parte superior posterior del testículo. El epidídimo se conecta luego con el tubo deferente, que lleva a los espermatozoides maduros hasta el conducto eyaculador. Los túbulos seminíferos están tapizados por un epitelio de células germinales en diferentes etapas de la maduración espermática y de células de Sertoli. Están envueltos por una túnica propia compuesta de células mioideas contráctiles (que ayudan a mover a los espermatozoides hacia la rete testis), fibras de colágeno, fibras elásticas y, en roedores y humanos, además contiene células de sistema inmune (monocitos y mastocitos). El espacio intersticial está compuesto principalmente por células de Leydig (células productoras de andrógenos), macrófagos, vasos sanguíneos y linfáticos, como también de terminaciones nerviosas [1].

La espermatogénesis, es el proceso por el cual las células germinales masculinas se desarrollan, se dividen y se diferencian para dar espermatozoides maduros. El epitelio que recubre la luz de los túbulos seminíferos está compuesto por células germinales ubicadas de manera concéntrica, de forma que las células más inmaduras (espermatogonias) se encuentran sobre la membrana basal y a medida que van madurando (de espermatocito hasta espermatozoide) van ocupando estratos cada vez más cercanos al lumen del túbulo. Las células germinales están rodeadas en todo momento por el único tipo de célula somática dentro de los túbulos, las células de Sertoli, que son las responsables del movimiento de las células germinales en maduración hacia la luz del túbulo. El citoplasma de las células de Sertoli se extiende desde la base del túbulo seminífero hasta el lumen y alrededor de las células germinales, constituyendo su soporte nutricional y manteniendo las asociaciones celulares necesarias para el proceso espermátogénico. Las uniones especializadas (estrechas y tipo Gap) entre las prolongaciones citoplasmáticas de las células de Sertoli, cerca de la membrana basal, constituyen en los testículos de mamíferos la barrera hemato-testicular (BTB) o barrera Sertoli-Sertoli, que impide que los túbulos seminíferos sean penetrados por vasos sanguíneos, linfáticos o nervios. Una de las funciones primordiales de la BTB es la de restringir el paso de sustancias de manera paracelular hacia el compartimiento apical, regulando entonces la entrada de nutrientes, moléculas regulatorias y tóxicos, creando un microentorno. La BTB

contribuye además a que **el testículo sea un sitio de inmunoprivilegio**, es decir, impide la detección y la respuesta inmunológica hacia autoantígenos que residen en las células germinales, muchos de los cuales son proto-onogénicos y oncogénicos que se expresan transitoriamente durante la meiosis y la espermiogénesis. Por lo tanto, uno de sus roles más importantes es el de evitar la creación de anticuerpos contra las propias células germinales [2].

Las células germinales se multiplican primero por divisiones mitóticas y luego por meiosis, que comprende la duplicación del genoma, la recombinación entre cromosomas homólogos y la segregación de los mismos a través de dos divisiones nucleares sucesivas para producir espermátides haploides, células esféricas, que luego se diferencian a espermatozoides altamente compactos, listos para ser liberados a la luz del túbulo seminífero. Los espermatozoides terminan de madurar al atravesar el epidídimo, donde adquieren movilidad y fertilidad. Existen regiones del epidídimo con diferentes microambientes que permiten este proceso de maduración. A este proceso se lo llama maduración post-testicular [3].

Para estudiar la espermatogénesis, el proceso ha sido dividido en **etapas**, teniendo en cuenta los distintos tipos de células germinales presentes en un determinado momento en un corte de túbulo seminífero, o en **fases**, que agrupa al proceso en mitosis, meiosis y espermiogénesis [4]:

- Espermatogénesis dividida en etapas: el epitelio seminífero está compuesto por células de Sertoli y muchos tipos diferentes de células germinales. La complejidad de este epitelio se simplificó para su estudio por Leblond y Clermont [1], que clasificaron al epitelio en etapas, según los tipos celulares germinales que pueblan o se “asocian” en un determinado momento en un corte de túbulo seminífero. Definieron 14 asociaciones entre células germinales en rata, llamadas etapas del ciclo del epitelio seminífero y las denominaron con números romanos (I-XIV). Cada etapa contiene entre 4 o 5 tipos de células germinales al mismo tiempo en un corte de túbulo seminífero. Entonces, una generación de células germinales en un estadio de la maduración espermática se asocia histológicamente a otras generaciones de células germinales en otros estadios madurativos. Estas asociaciones son precisas, exactas y altamente sincronizadas. La sucesión secuencial en el tiempo de estas 14 asociaciones celulares en un área específica del túbulo se definió como ciclo del epitelio seminífero. En humano se definieron 6 etapas y en ratón 12 etapas [1].
- Espermatogénesis dividida en fases:
 - Mitosis: las espermatogonias son células diploides que se dividen por mitosis y se ubican en la membrana basal del túbulo. Los diferentes tipos de espermatogonias se clasifican en tres tipos generales: A, intermedia y B, que a su vez se pueden subdividir en más clases.

- **Meiosis:** las espermatogonias B son las últimas que se dividen por mitosis para formar dos espermatocitos pre-leptoténicos ($2n$), iniciando así la fase meiótica. Estas espermatogonias se ubican cerca de la membrana basal, pero los espermatocitos en leptoteno y zigoteno ya se comienzan a mover a través de la BTB. Esta división celular se subagrupa en tres categorías: meiosis I, formación de espermatocitos secundarios (raramente observados al microscopio por su corta vida) y meiosis II, que termina por formar las espermatídes redondas ($1n$).
- **Espermioogénesis:** comprende la transformación de espermatídes redondas esféricas en espermatídes elongadas y luego en espermatozoides que serán liberados a la luz de los túbulos seminíferos. Este proceso de diferenciación atraviesa 4 etapas: Golgi, *capping*, acrosómica y madurativa. A través de estas etapas, las espermatídes sufren una serie de cambios drásticos en su núcleo, la compactación de la cromatina, el reemplazo de las histonas (H) por protaminas en el ADN, la formación del acrosoma y el establecimiento del flagelo, para convertirse finalmente en espermatozoides. A medida que se liberan los espermatozoides al lumen del túbulo, se forman los llamados cuerpos residuales a partir del citoplasma sobrante de las espermatídes, que es fagocitado por las células de Sertoli.

En el siguiente cuadro comparativo se muestran los tiempos de duración del ciclo del epitelio seminífero y de la espermatogénesis en rata, ratón y en el hombre:

Tabla 1. Duración del ciclo del epitelio seminífero y espermatogénesis en roedores y en el hombre.

Especie	Espermatogénesis		Ciclo del epitelio seminífero		Etapas del epitelio seminífero	
	Días	Cita	Días	Cita	Etapas	Cita
<i>Homo sapiens</i>	64-68	[5, 6]	16	[5]	I-VI	[7]
<i>Mus musculus</i>	34-35	[8, 9]	8.6	[9, 10]	I-XII	[11, 12]
<i>Rattus norvegicus</i>	48-58	[11, 13, 14]	12.8-12.9	[10, 15, 16]	I-XIV	[17, 18]

En el hombre, la espermatogénesis no comienza hasta la pubertad. En el testículo humano posnatal, las células de Sertoli inmaduras son el tipo celular más abundante junto con un pequeño número de células germinales indiferenciadas. Las células de Sertoli secretan

inhibina B¹ hasta los 2-4 años y hormona anti-Mülleriana² durante todo el período prepuberal. Se conocen tres picos de aumento de la hormona testosterona en el hombre: uno a las 4-6 semanas de gestación, otro entre los 4 meses de gestación y los 3 meses de edad y el último de los 12 a los 14 años. En concordancia con el aumento de testosterona posnatal, existe un aumento bifásico en el número de células de Leydig, que comprende un aumento temprano posnatal, seguido por una caída al nivel más bajo a los 1,5 años y luego un aumento continuo en el número de células hasta un *plateau* en la adultez. Con respecto al número de células germinales, el número de espermatogonias aumenta 6 veces entre el nacimiento y los 10 años de edad, y este número continúa aumentando exponencialmente en la pubertad. La pubertad marca el inicio de la producción de miles de espermatozoides diariamente y está estimulada por los altos niveles de testosterona circulantes. Junto con el inicio del ciclo espermatogénico, es crítico el correcto desarrollo del lumen tubular y la BTB. Aproximadamente dos años después de la primera espermatogénesis se alcanzan los niveles de testosterona del adulto. A diferencia de las espermatogonias, las células de Sertoli y de Leydig no proliferan en el hombre adulto [19].

A diferencia del hombre, los roedores no muestran un período de quiescencia testicular, probablemente debido a la ausencia de una interrupción sostenida en la secreción de gonadotropinas (FSH y LH). En ratas, el desarrollo testicular posnatal comienza temprano, las primeras espermatogonias se detectan a los 7-8 días y la pubertad se alcanza aproximadamente a los 48 días, cuando los primeros espermatozoides pasan al lumen del túbulo seminífero. En el ratón, las primeras espermatogonias A se pueden observar en el día 3 posnatal y la pubertad se alcanza a los 35 días. Las células de Sertoli proliferan hasta el día 17 posnatal y las células de Leydig entre los 21-33 días, bajo la influencia de hormonas gonadotropinas (FSH y LH) [19].

1.2. EL RATÓN COMO MODELO PARA SU ESTUDIO

La infertilidad es un gran problema a nivel mundial. En las sociedades occidentales, 1 de cada 8 parejas en edad reproductiva es infértil, entre los cuales el 40% de los casos se debe parcial o completamente a factores masculinos. Las causas de infertilidad masculina pueden ser varias, desde un defecto en la producción de espermatozoides hasta disfunciones eréctiles. Aunque se desconoce la etiología de la mayoría de los defectos en la fertilidad, un porcentaje significativo estaría causado por problemas a nivel génico. Si bien los estudios citogenéticos, el avance en la biología molecular y la secuenciación del genoma humano han permitido identificar aberraciones cromosómicas o genes asociados a la infertilidad masculina, la función precisa de cada uno de ellos y su implicancia en este proceso no están del todo esclarecidas. Además, la investigación de estos genes en humanos suele ser intrincada por un inadecuado número de

¹ Inhibina B: glicoproteína producida por las células de Sertoli que actúa en la glándula pituitaria inhibiendo la secreción de la hormona folículo estimulante (FSH) y en el hipotálamo inhibiendo la secreción de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH).

² Hormona anti-Mülleriana: miembro de la familia de proteínas TGF- β , causa la regresión de los conductos müllerianos durante el desarrollo fetal masculino.

pacientes, datos clínicos insuficientes y por la alta variabilidad genética en la población que puede derivar en fenotipos muy diversos [20].

La fertilidad masculina depende fundamentalmente de la espermatogénesis, que comprende una serie de pasos complejos, altamente estructurados y precisamente regulados por varios factores. **La complejidad del proceso determina que no pueda ser completamente modelado *in vitro*, por lo que los modelos animales son una alternativa muy útil para la experimentación.** El ratón (*Mus musculus*) es el animal más comúnmente utilizado tanto en la investigación biomédica, como en estudios de biología reproductiva, por su corto ciclo reproductivo, su alto número de crías por camada y su bajo costo de mantenimiento. Además, el ratón es muy similar genéticamente al hombre y sus embriones son fáciles de manipular a nivel genético. Por último, y muy importante, la espermatogénesis y la oogeneis en el ratón son semejantes a las del humano. Se ha calculado que la espermatogénesis en ratón comprende más de 30.000 transcriptos en las células germinales, sin tener en cuenta las células somáticas testiculares y aquellas involucradas en la regulación endócrina. Usando modelos genéticamente modificados se han descubierto cerca de 400 genes que son esenciales para la fertilidad masculina, lo que **justifica la importancia del ratón como modelo de estudio de este proceso** [21].

1.3. PRIMERA OLA ESPERMATOGÉNICA

El desarrollo de la primera cohorte de gonocitos en espermatozoides se conoce como el primer ciclo espermatogénico o primera ola espermatogénica. Comienza pocos días después del nacimiento en el ratón y se caracteriza por la aparición secuencial de células germinales cada vez más maduras de manera sincrónica entre los túbulos seminíferos. Por lo tanto, se han podido definir tiempos de aparición específicos para varios tipos de células germinales durante este primer ciclo espermatogénico. Testículos de ratones de 7 días post parto (dpp) poseen sólo células de Sertoli y espermatogonias en sus túbulos seminíferos; a los 9 dpp aparecen los primeros espermatoцитos; al día 10 comienza la meiosis y aproximadamente en el día 14 alcanzan el estadio de paquiteno, que dura hasta el día 18, momento en el que se pueden observar espermatoцитos en paquiteno tardío y en diploteno. Como resultado de las dos divisiones meióticas aparecen las espermátides redondas alrededor del día 20, al día 30 alcanzan la etapa de elongación y aproximadamente a los 35 dpp se pueden ver los primeros espermatozoides en el lumen de los túbulos seminíferos (Figura 1). Luego de la primera ola, la sincronía se pierde y la espermatogénesis avanza de manera independiente en cada túbulo seminífero. **Debido a la sincronía en su progresión, la primera ola de la espermatogénesis es un excelente modelo para el estudio de la expresión génica durante el desarrollo de la gameta masculina** [22-25].

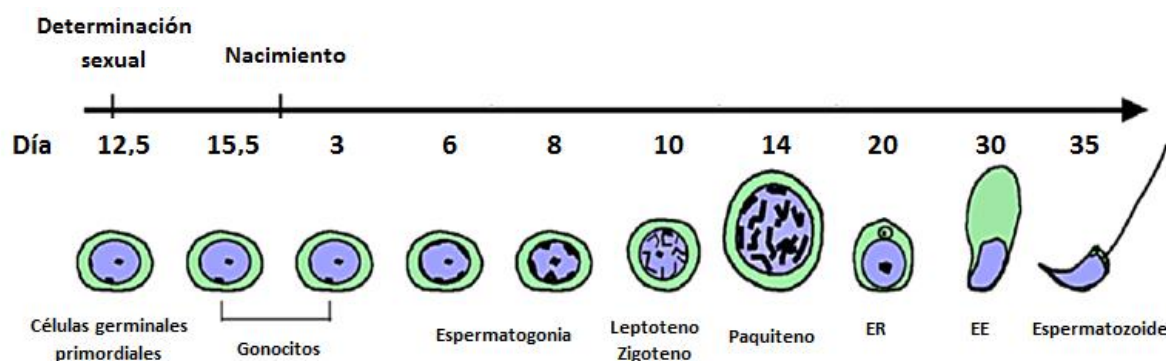
Figura 1. Representación esquemática de la primera ola espermatogénica en ratón.

Figura 1. Representación de la primera ola espermatogénica en ratón. Se muestra el tiempo de aparición pre y posnatal de los distintos tipos celulares, que ocurre de manera coordinada entre los diferentes túbulos seminíferos. ER: espermatide redonda; EE: espermatide elongada. Adaptado de Zheng K. *et al.*, 2012 [26].

La primera ola espermatogénica se acompaña de una amplia apoptosis de células germinales, que en el ratón tiene un pico máximo a los 14 días. Esta reducción en el número de células está regulada por múltiples señales y parece ser importante para ajustar el número de células germinales que pueden ser mantenidas por el número de células de Sertoli presentes. En el testículo adulto, la apoptosis también ocurre en una extensión tal que el 75 % de las células germinales degeneran [23]. Para lograr la homeostasis del proceso espermatogénico es necesario mantener un correcto balance de cada tipo de célula, por lo que los procesos de proliferación, meiosis, diferenciación y apoptosis tienen que estar estrictamente controlados. La muerte programada de células germinales masculinas ocurre en mamíferos espontáneamente de manera tal que el epitelio seminífero produce menos espermatozoides que los teóricamente posibles. Esto se ha visto en rata, ratón, hámster y humano. En humano se observó que las espermatogonias, espermatocitos y espermatides entran en apoptosis espontáneamente, aunque la frecuencia apoptótica variaba según la etnia [25].

1.4. REGULACIÓN DE LA ESPERMATOGÉNESIS

1.4.1. Regulación hormonal

La espermatogénesis en mamíferos requiere principalmente la acción de hormonas peptídicas y esteroideas, que juegan un papel importante en el funcionamiento del epitelio seminífero y que son críticas para la regulación no sólo del desarrollo de células germinales, sino también para la proliferación y función de las células somáticas del testículo. El ácido retinoico, derivado funcional de la vitamina A, es también un factor de importancia en este proceso.

Gonadotropinas

Las hormonas folículo estimulante (FSH) y luteinizante (LH) son glicoproteínas secretadas por la glándula pituitaria anterior, en respuesta a la estimulación por la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) secretada por el hipotálamo, que actúan directamente en el testículo estimulando la función de las células somáticas que soportan la espermatogénesis. Estas hormonas que forman parte de la familia de factor de crecimiento transformante β (TGF β) comparten una subunidad α y se distinguen por su subunidad específica β . En machos, la expresión del receptor de FSH (FSHR) está limitada a las células de Sertoli, mientras que el receptor de LH (LHR) se encuentra principalmente en células de Leydig, aunque también se ha detectado en células germinales.

El rol principal de FSH (en conjunto con andrógenos y hormonas tiroideas) en la espermatogénesis es el de la estimulación de la proliferación de las células de Sertoli durante el desarrollo prepuberal, lo cual es de suma importancia ya que el número de células de Sertoli determina en gran medida el número de espermatogonias, actuando como un factor de supervivencia [27]. Mutaciones dirigidas hacia FSHR y la subunidad β de FSH en modelos murinos no anulan completamente la capacidad fértil, pero resultan en una drástica reducción en el peso de los testículos y en el número de espermatozoides [28].

Con respecto a la LH, su única función indispensable pareciera ser la de la regulación de la producción de testosterona (T) a partir de colesterol por las células de Leydig en el testículo adulto. El tratamiento de ratones *knock-out* (KO) para LHR con T exógena reestablece la espermatogénesis [28].

Hormonas esteroideas

La T y sus metabolitos, dihidrotestosterona (DHT) y estradiol (E), son de suma importancia para la regulación del desarrollo gonadal y de las células germinales en ambos sexos. En el macho, la T tiene un rol principal en la regulación del desarrollo morfológico y de la función reproductiva.

Si bien las células germinales no poseen receptores para andrógenos, se ha reportado la presencia de los transcritos de los genes que codifican para las dos isoformas del receptor de E (*Esr1* y *Esr2*) en ratas adultas y de las proteínas ER α y ER β en espermatoцитos en paquiteno y espermátides redondas. Los modelos KO para ambos genes resultan en ratones infértiles. Los ratones KO para el gen *Esr1* presentan una fertilidad reducida y una reducción drástica en el conteo espermático. Sin embargo, estos efectos son más bien secundarios, ya que la función del ER α es la de regular la reabsorción de líquido luminal en la rete testis y favorecer la unión del ducto eferente con el epidídimo [28, 29]. El origen de la infertilidad a causa de la mutación en el gen *Esr2* se desconoce [29]. La mutación del gen de la aromatasa, que transforma T en E en las células de Leydig, resulta en una progresiva pérdida de la fertilidad y disrupción de la

espermatogénesis, aunque inicialmente son animales fértiles. No está del todo claro por qué una mutación en el gen de la aromatasa es menos severa que una mutación en el *Esr1* [28].

La función de los andrógenos (T y DHT) y del receptor de andrógenos (AR) es esencial para una correcta diferenciación sexual en el macho, para el desarrollo de las glándulas accesorias y para el mantenimiento de una espermatogénesis normal. La actividad del AR está regulada por T y DHT, que controlan su translocación al núcleo y su función como regulador de la transcripción génica. La DHT se une con más afinidad al AR que la T, por lo que es un andrógeno más potente [30, 31]. En humanos la DHT es crucial para el desarrollo del tracto reproductivo, aunque en ratón no parece ser tan importante. Las células que expresan el *Ar* en el testículo son las células de Sertoli, las de Leydig y las células mioides, por lo que la acción de la T en las células germinales es indirecta y está regulada a través de las células de Sertoli [28]. En modelos de ratón en los cuales se ha mutado al gen *Ar* específicamente en las células de Sertoli, a pesar de presentar un fenotipo masculino normal, la meiosis se encuentra totalmente bloqueada, mientras que en modelos en los cuales se ha mutado al gen del *Ar* específicamente en células germinales, presentan fertilidad normal. Esto demuestra que las células de Sertoli son el principal blanco de acción de T y DHT como reguladores de la espermatogénesis [31].

En humanos, la T sola o en conjunto con FSH actúa también como un factor de supervivencia para los espermatocitos y espermátides regulando tanto la vía intrínseca como la extrínseca de la apoptosis [32]. Además, la T actúa estimulando el comportamiento sexual e influenciando la respuesta eréctil, entre otros procesos. Por último, la T y sus metabolitos derivados son más que una hormona sexual y desempeñan numerosas acciones fisiológicas importantes en el organismo que resultan imprescindibles para la salud global del varón [33].

En el Anexo 2 se detallan algunos aspectos más acerca de la función de las gonadotropinas y de las hormonas esteroideas en la espermatogénesis.

Vitamina A y sus derivados

Aunque la importancia de la vitamina A (retinol) en la espermatogénesis se conoce desde hace casi un siglo, la función específica en este proceso de su metabolito activo, el ácido retinoico (RA), comenzó a ser apreciada hace relativamente poco tiempo. Mientras que el rol de las gonadotropinas y andrógenos en la espermatogénesis está bien establecido, el rol del RA es igual de importante pero está menos caracterizado. Hoy se conoce que los derivados funcionales de la vitamina A son necesarios para la fertilidad y para una espermatogénesis normal [34].

En general el RA no es transportado por sangre, sino que la oxidación del retinol a RA tiene lugar en los tejidos blanco. El retinol se obtiene de la dieta, se almacena en el hígado y se transporta a los tejidos blanco, que cuentan con las enzimas necesarias para la producción y degradación de RA, como también sus efectores intracelulares. Se ha reportado que las células de Sertoli, las células de Leydig y los espermatocitos premeióticos pueden sintetizar RA [34, 35].

Existen dos formas isoméricas activas del RA: como todo trans (ATRA) y como 9-cis RA (9cisRA). Dentro de las células, existen 2 familias de receptores de RA llamados RARs y RXRs, que a su vez pueden clasificarse en 3 subtipos (α , β y γ), cada uno codificado por un gen distinto y a su vez, cada subtipo posee diferentes isoformas creadas por *splicing* alternativo [36]. Su complejidad aumenta al tener en cuenta que los RXR pueden formar homodímeros con RXRs o heterodímeros con RARs, el receptor de hormonas tiroideas, con el receptor de vitamina D, PPARs, etc. Los heterodímeros RAR-RXR unen ambos isómeros del RA mientras que el homodímero de RXRs une preferentemente 9cisRA [37]. Estos receptores, en la forma de homo o heterodímeros regulan la expresión de genes al unirse a elementos específicos de respuesta a RA en los promotores de los genes blanco [34, 36]. **Se han localizado por inmunohistoquímica a los 6 subtipos de receptores de RA en los diferentes tipos de células testiculares, incluidas las células germinales, aunque su expresión varía según el tipo célula, la maduración testicular y la etapa de la espermatogénesis** [37]. Sin embargo, se considera que la acción del RA en las células de Sertoli está mediada principalmente por el RARA. Ratones macho KO para *Rara* son estériles, pero las células germinales *Rara*^{-/-} pueden reanudar la espermatogénesis al ser trasplantadas a otro testículo *wild type*, lo que demuestra que la expresión de RARA en células de Sertoli es esencial para la espermatogénesis [34].

En modelos murinos deficientes en vitamina A, la espermatogénesis cesa, y al examinar los testículos sólo se encuentran espermatogonias y células de Sertoli, lo que demuestra la importancia de la vitamina A para la diferenciación de las células germinales. En los últimos años se ha demostrado que **el RA es fundamental para el inicio de la meiosis** por un mecanismo parcialmente conocido. Se sabe que el RA activa la expresión del gen *Stra8*, un gen crítico para el inicio de la meiosis, tanto en ovario como en testículo. En células germinales masculinas, la activación de la transcripción de *Stra8* responde a la vía clásica: el heterodímero RAR/RXR-RA se une a la secuencia de consenso de respuesta a RA en el promotor del gen, aumentando la síntesis de su ARNm [34]. A pesar de ser considerada como el “guardián” del inicio de la meiosis, aún no se conoce si la proteína STRA8 actúa como un factor de transcripción, un segundo mensajero o si cumple alguna otra función [38]. Sin embargo, varios estudios han demostrado su relevancia en la meiosis. Por ejemplo, ratones con el gen *Stra8* mutado resultan estériles y la meiosis está completamente detenida antes de la profase I, tanto en machos como en hembras. A partir de estos modelos de ratones KO para *Stra8*, surgen algunos indicios que indicarían su función específica. En células germinales de estos ratones, la localización de las proteínas SYCP3³ y REC8⁴ en los cromosomas no es la adecuada, lo que indicaría que STRA8 es relevante en la formación del complejo sinaptonémico [34], demostrando irrefutablemente la implicancia de esta proteína en la entrada en meiosis. Ravardeau *et al.* [35] demostraron además que la regulación de la síntesis de *Stra8* en células

³ SYCP3: proteína 3 del complejo sinaptonémico; involucrada en la formación del complejo sinaptonémico.

⁴ REC8: proteína de recombinación meiótica 8; involucrada en la formación de los complejos de cohesión que mantiene unidos a los cromosomas homólogos.

La unión de estas proteínas a los cromosomas, entre otros eventos, marca el inicio de la profase I de la meiosis.

germinales de ratón, y por lo tanto de la entrada en meiosis, podría estar regulada por la secreción autócrina de RA sintetizado por espermatoцитos preleptoténicos.

Además del rol “clásico” del RA en la regulación de la expresión génica, esta hormona afecta también al contexto epigenético del gen en cuestión (Sección 1.4.2.). Al igual que otros reguladores del desarrollo [36], los RARs-RXRs tienen la capacidad de funcionar como un interruptor molecular: cuando no están unidos a su ligando, forman un complejo con correpresores e H desacetilasas (HDAC) que se unen al sitio de consenso para la unión de los receptores de RA inhibiendo activamente la expresión génica. Una vez que el RA se une, se liberan los correpresores y se reclutan los coactivadores, incluyendo H acetiltransferasas (HAT), para descondensar la cromatina y activar la transcripción de genes [39]. Además, a nivel epigenético, el RA no solamente modula el estado de acetilación de H, sino también la metilación del ADN. Varios investigadores han reportado que el ATRA promueve la desmetilación del ADN en modelos celulares e *in vivo* por mecanismos aún no del todo esclarecidos [40]. En la siguiente sección se detallan con más profundidad los mecanismos de regulación epigenética.

La relevancia del RA en la espermatogénesis en humanos no está del todo comprendida. La deficiencia de vitamina A ocurre y es una de las causas más importantes de ceguera, pero no hay datos acerca de sus efectos en la reproducción [35]. Entre la información disponible se sabe que las células de Sertoli expresan enzimas de la vía metabólica de la vitamina A y que *Stra8* se expresa tanto en testículo (y ovario) embrionario como en testículo posnatal. Claramente, hace falta mucha más información para poder comprender del todo el rol de la vitamina A y del RA en la regulación de la espermatogénesis en el hombre.

1.4.2. Regulación epigenética

La epigenética hace referencia a cambios heredables en la cromatina que, sin alterar la secuencia del ADN, producen alteraciones en el fenotipo, cuya regulación es fundamental para el desarrollo tanto de mamíferos como de plantas [41]. Las modificaciones epigenéticas que pueden afectar la cromatina son: la metilación del ADN, la modificación postraduccional de las H y la remodelación de la cromatina. La compactación del ADN en una determinada región está determinada por la epigenética y dado que una cromatina altamente compactada es transcripcionalmente inactiva, modificaciones epigenéticas derivan en cambios drásticos en la expresión génica. Mientras que el genoma y el código genético definen la impronta fenotípica estable, el código epigenético proporciona una impronta dinámica al hacer el ajuste fino del fenotipo en relación a factores ambientales [42].

La metilación del ADN se produce en citosinas (C) correspondientes a pares citosina-guanina (CG) en regiones denominadas “Islas CpG”. Estas islas comprenden regiones del ADN de 200 pb o más con un contenido C+G mayor al 55% y una frecuencia de CGs mayor a 0,65. En general se encuentran circundando al primer exón o forman parte de los promotores de los

genes que regulan. La metilación de los pares CG en el seno de la isla CpG se asocia al silenciamiento del gen, mientras que la hipometilación de los mismos se asocia a la expresión génica. La metilación de C se lleva a cabo por las *de novo* ADN metiltransferasas (DNMT), de las cuales existen varias isoformas.

La modificación de H hace referencia a las modificaciones postraduccionales que pueden sufrir los residuos aminoacídicos de la porción N-terminal de estas proteínas. Estas pueden ser: metilación, acetilación, fosforilación, ubiquitinación y sumolización. La metilación es una de las modificaciones más frecuentes, está regulada por H metiltransferasas y en general se asocia al silenciamiento génico. La acetilación/desacetilación de H está modulada por HAT e HDAC y en general la acetilación se asocia a una cromatina más abierta y por lo tanto a la activación de la transcripción génica.

Por el contrario, la remodelación de la cromatina no se basa en interacciones covalentes, sino que complejos de remodelación de la cromatina dependientes de ATP usan esta energía para alterar la ubicación y/o estructura de los nucleosomas. Esto cambia qué genes están disponibles para transcripción y puede generar activación o silenciamiento génico. Los complejos de remodelación de la cromatina actúan deslizando las H a lo largo del ADN, aunque también lo pueden enrollar, desenrollar o torcer. Dos de las familias más conocidas de complejos de remodelación son la familia SWI/SNF y la ISWI, ambas con sitios catalíticos para el ATP [42].

Las modificaciones epigenéticas regulan un número importante de procesos biológicos, entre ellos la espermatogénesis. El patrón epigenético de las células germinales testiculares cambia drásticamente a lo largo de todo este proceso de diferenciación. Por ejemplo, las células germinales tienen un patrón de metilación distintivo, que se establece por metilación *de novo* antes de la profase I de la meiosis. La metilación es específica de secuencia y se completa antes del paquíteno. El estado de metilación de ciertos genes puede variar a medida que la célula atraviesa las fases de la espermatogénesis y puede o no determinar el patrón de expresión génica. Además, los patrones de metilación son en gran parte borrados en el período fetal, durante la proliferación y migración de células germinales primordiales a las gónadas en desarrollo y es restablecido en patrones específicos de sexo durante la espermatogénesis y la ovogénesis. La metilación *de novo* se dirige principalmente a retrotransposones y la pérdida de los patrones de metilación libera a los retrotransposones y cambia la impronta genómica paterna o materna en las células germinales o somáticas. Incluso una mínima alteración en los patrones de metilación puede ser letal. Asimismo, la modificación de H por fosforilación, sumolización y ubiquitinación es necesaria para que ocurra el apareamiento y recombinación entre los cromosomas X-Y durante la meiosis I. La epigenética también es importante durante el proceso de transición de H a protaminas, ya que las H se hiperacetilan durante la espermiogénesis, lo que genera nucleosomas más débilmente unidos al ADN, que son reemplazadas por proteínas de transición y luego, al final de la espermiogénesis, por protaminas [42, 43].

El mantenimiento de una correcta regulación epigenética durante la espermatogénesis es crucial, no sólo para asegurar un correcto funcionamiento espermático, sino también, un desarrollo embrionario normal. Por ejemplo, se han relacionado defectos en el patrón de metilación del ADN (globales o particulares) tanto con anomalías en las características del semen como también con otras causas de infertilidad en el hombre. Houshdaran *et al.* demostraron que una baja concentración de espermatozoides en esperma, su movilidad y su tamaño estaban asociados a una extensa hipermetilación del ADN de los mismos [44]. Además, el establecimiento de una correcta impronta epigenética es crítico para el mantenimiento de la fertilidad, ya que en varios hombres infértiles se han detectado defectos tanto en la impronta materna como paterna [45]. La transición H-protaminas es también crucial para un correcto desarrollo espermático. Cualquier problema en este proceso puede afectar severamente la calidad del esperma y la integridad del ADN. El estudio de Sonnak *et al.* demostró que hombres cualitativa o cuantitativamente infértiles poseían bajos niveles de acetilación de H [46]. Estos casos, revelan la importancia de la regulación epigenética en el establecimiento de una correcta fertilidad masculina y podrían explicar la etiología de patologías que no pueden explicarse sólo teniendo en cuenta la genética.

1.4.3. Regulación por ARN pequeños no codificantes

Existen por lo menos tres grupos de ARN pequeños no codificantes en testículos de mamíferos: micro ARNs (miRNAs), pequeños ARN de interferencia endógenos (siRNAs) y ARN que interaccionan con proteínas PIWI (piRNAs).

Los miRNA y siRNA forman parte de un mecanismo de silenciamiento génico postranscripcional. Los precursores de miRNA son transcriptos primarios largos en forma de horquilla, que son procesados en pre-miRNA dentro del núcleo por la enzima DROSHA (endonucleasa de ARN de doble hebra). En el citoplasma, DICER, otra endonucleasa, corta a los pre-miRNA en miRNA de doble hebra de 21 nucleótidos aproximadamente. Eventualmente, una de las hebras del miRNA se carga en una proteína de la familia AGO para formar el complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC), que guía el reconocimiento hacia el ARNm blanco. Aunque el apareamiento miRNA-ARNm en este caso es imperfecto, se impide su traducción o se impulsa su degradación. Los siRNA derivan de precursores largos de ARN de doble cadena y no son clivados por DROSHA, sino directamente por DICER. El mecanismo de silenciamiento génico es el mismo, ya que los siRNA monohebra también se ensamblan en el complejo RISC. Los siRNA maduros son similares a los miRNA maduros, sólo que los primeros son totalmente complementarios a sus ARNm blanco. Los siRNA pueden ser endógenos o derivar de una fuente exógena, como una infección viral [47]. En el Anexo 2 se aportan más detalles acerca de los mecanismos de síntesis de estos ARNs.

En la línea germinal masculina se pueden encontrar los componentes de la maquinaria de síntesis de miRNA y varios miRNA se expresan específicamente o predominantemente en

testículo. La importancia de DICER en la maduración de las células germinales se demostró en modelos de ratón KO. La delección específica de *Dicer* en células de Sertoli de ratón, reveló la importancia de esta enzima para la función de estas células somáticas, ya que su ausencia causa dramáticos cambios en el proteoma testicular y la degeneración del tejido [48]. La delección específica de *Dicer* en espermatogonias de ratón demostró la relevancia de los ARN pequeños dependientes de DICER, ya que estos ratones presentaban un tamaño testicular reducido y la espermatogénesis estaba afectada. El defecto más importante se hallaba en la espermiogénesis, especialmente en la etapa de elongación nuclear y organización de la cromatina de las espermátides [49]. Sin embargo, los mecanismos moleculares dependientes de DICER que controlan la espermatogénesis se desconocen.

A diferencia de los miRNA que están ampliamente distribuidos en los distintos tejidos, los piRNAs se expresan predominantemente en células de la línea germinal y son fundamentalmente conocidos por su papel en la protección del genoma, al silenciar elementos transponibles que se activan durante la desmetilación del ADN en las células germinales primordiales. Su nombre deriva de su asociación directa con proteínas PIWI (MILI, MIWI y MIWI2 en ratón), un grupo de proteínas que pertenece al clado de la familia de proteínas Argonauta, junto con las AGO antes mencionadas. Los piRNA poseen aproximadamente 30 nucleótidos, existen miles de piRNAs distintos y son muy abundantes en testículos de mamíferos. Su procesamiento no incluye a DROSHA ni a DICER, por lo que su biogénesis es distinta a la de miRNAs y siRNAs. Se distinguen dos clases de piRNA en testículos de mamíferos y se clasifican en pre-paquiteno o paquiteno según el momento en el desarrollo testicular en el cual se sintetizan [47]. Si bien estos grupos de piRNAs son similares a nivel molecular, se asocian a diferentes proteínas PIWI, actúan por diferentes mecanismos, cumplen distintas funciones y provienen de distintas regiones del genoma. En el ratón, la expresión de los genes *Piwi* varía según la etapa del desarrollo testicular: *Miwi2* se expresa en células germinales fetales y perinatales, *Miwi* en espermátocitos en paquiteno y espermátides redondas y *Mili* se expresa desde células germinales fetales hasta espermátides redondas. Los piRNA pre-paquiteno tienen un pico de expresión entre los 15 días *post coitum* (dpc) y el nacimiento, derivan de elementos transponibles y se asocian a MILI y MIWI2 en células germinales fetales y perinatales. Por otro lado, los piRNA de paquiteno tienen un pico de expresión en esta etapa de la meiosis (que ocurre entre los 14 y 18 dpp durante la primera meiosis en el ratón), provienen de más de 3.000 clústers genómicos y se unen tanto a MILI como a MIWI. La biogénesis de los piRNA puede ser por un mecanismo de procesamiento primario o secundario (también llamado “ping-pong”). Los piRNAs pre-paquiteno se sintetizan por ambas vías, mientras que los piRNAs de paquiteno lo hacen por la vía primaria [26].

Los piRNA pre-paquiteno, junto con MILI y MIWI2 participan en el silenciamiento de retrotransposones en células germinales fetales y neonatales tanto a nivel epigenético como postranscripcional. En modelos de ratón KO para cualquiera de los dos genes que codifican dichas proteínas, los transposones se expresan de manera descontrolada, dañando la

integridad del genoma, lo que deriva en arresto meiótico y esterilidad [50, 51]. Se conoce menos acerca de la función de los piRNA de paquitenos y cuál es la razón de su prominente pico de expresión. La delección de *Miwi* en ratón causa el arresto de la espermatogénesis en el estadio de espermátide redonda, sin ningún defecto claro en la meiosis y una completa ausencia de espermátides elongadas. La expresión de los piRNA en estos ratones se reduce significativamente, lo que indicaría que MIWI participa de su síntesis [52].

Por lo tanto, si bien no se conoce en detalle las características particulares de cada uno de los mecanismos que gobiernan la acción de los ARN pequeños no codificantes, cada vez se tiene más evidencia de su importancia en control y mantenimiento de la espermatogénesis.

2. GLICEROL-3-FOSFATO ACILTRANSFERASA 2

El primer paso y limitante, en la síntesis *de novo* de triacilglicéridos y glicerofosfolípidos en mamíferos está catalizado por la actividad de la glicerol-3-fosfato aciltransferasa (GPAT) y consiste en la acilación del glicerol-3-fosfato con un acil-CoA de cadena larga para dar ácido lisofosfatídico (LPA), que es el sustrato de las 1-acilglicerol-3-fosfato aciltransferasas que catalizan sucesivamente la formación de ácido fosfatídico (PA). Hasta el momento se han descrito 4 isoformas en mamíferos para las GPATs (GPAT1-4) [EC 2.3.1.1]. Estas isoenzimas se diferencian por su ubicación subcelular y tisular, su sensibilidad a sustancias reactivas a grupos –SH como la *N*-etilmaleimida (NEM) y por su preferencia de sustrato [53]. Se pueden resumir algunas de sus características en la siguiente tabla:

Tabla 2. Características de las 4 isoformas GPATs.

Isoforma	N° Genebank (<i>Mus musculus</i>)	Ubicación subcelular	Ubicación tisular	Sustrato de preferencia	Sensibilidad al NEM
GPAT1	NM_008149.3	Mitocondria	Hígado, Tejido Adiposo, Corazón	Palmitoil-CoA	Resistente
GPAT2	NM_001081089		Testículo	Araquidonil-CoA	Sensible
GPAT3	NM_172715.3	Retículo endoplásmico	Tejido Adiposo, Intestino Delgado, Riñón, Corazón	Sin preferencia	
GPAT4	NM_018743	Retículo endoplásmico	Hígado, Tejido Adiposo, Testículo		

GPAT2 se describió por primera vez en mitocondrias hepáticas en un modelo de ratón KO para *Gpat1* (*Gpat1*^{-/-}) [54]. Esta enzima es similar a GPAT1 tanto en su estructura, peso molecular y en su localización subcelular en la membrana mitocondrial externa. Sus secuencias

de aminoácidos son 33% idénticas y 64% homólogas, con máxima homología en la región del sitio activo ubicada en el dominio N-terminal de la proteína. Además, como GPAT1, posee un extenso dominio C-terminal que la distingue de otras aciltransferasas. Sin embargo, como se muestra en la Tabla 2, son varias las diferencias entre estas dos isoformas. Una diferencia destacable es su distribución tisular: mientras que *Gpat1*, 3 y 4 se expresan en altos niveles en tejidos principalmente caracterizados por una alta tasa de síntesis y/o metabolismo de lípidos, como lo son el tejido adiposo, hígado, músculo y corazón (*Gpat4* también se ha detectado en testículo), *Gpat2* se expresa prácticamente de manera exclusiva en testículo. Esta distribución particular concuerda con lo observado en modelos murinos de ayuno y re-alimentación de glúcidos: la expresión de *Gpat1* en hígado, al estar regulada por SREBP-1 e insulina, aumenta abruptamente luego de la ingesta post-ayuno, mientras que la expresión de *Gpat2* no se modifica [55]. Además, mientras que la expresión del resto de las isoformas aumenta en modelos de diferenciación de fibroblastos en cultivo a adipocitos, la expresión de *Gpat2* disminuye [56]. Por último, si bien GPAT2 está presente en mitocondrias de ratones *Gpat1*^{-/-}, su presencia no complementa la ausencia de *Gpat1*, ya que estos ratones KO muestran disminución en el peso corporal, cambios en los ácidos grasos de fosfolípidos hepáticos y resistencia insulínica en hígado, fenotipo que no revierte con la presencia de una segunda isoforma mitocondrial [54, 55]. Todo esto sugiere que GPAT2 no estaría cumpliendo la función “clásica” de las enzimas aciltransferasas, ya sea relacionada a la síntesis de moléculas que proveen energía en el caso de los triacilglicerol (TAG) o moléculas estructurales en el caso de los fosfolípidos.

Cattáneo *et al.* (integrantes del grupo de investigación en donde se realizó esta tesis) demostraron que esta isoforma posee como sustrato de preferencia al araquidonil-CoA (20:4-CoA) y que lo incorpora preferencialmente en TAG y no en fosfolípidos. La expresión heteróloga de *Gpat2* en células CHO-K1 produjo una duplicación en el tamaño de gotas lipídicas y la presencia de ácido araquidónico esterificado en TAG, indetectable en las células control. Sin embargo, el producto directo de la actividad GPAT (LPA) no pudo ser detectado en estos experimentos, sino que se observó un aumento en PA, sin acumulación de LPA. Además, por hibridación *in situ* en cortes de testículo de ratón adulto se observó que la expresión del ARNm de *Gpat2* está limitada a los espermatoцитos primarios y por inmunofluorescencia en cortes de testículo de rata adulta que la proteína está presente también en espermátides. Por qPCR y Western blot se estudió el nivel de transcripción y traducción de este gen durante la maduración sexual en testículos de rata, detectando un aumento abrupto en el transcripto primario y la síntesis de la proteína a los 30 dpp. Por último, se detectó un máximo en el contenido testicular de TAG en la rata a los 30 dpp como también en el contenido de ácido araquidónico esterificado en TAG [57].

Recientemente, se ha descubierto que GPAT2 es de crucial importancia en la biogénesis de piRNAs. Se demostró que GPAT2 interacciona físicamente con MILI tanto en cultivos primarios de células germinales como en homogenatos de testículo de ratón, que la

presencia de GPAT2 es necesaria para la producción de piRNA por la vía primaria y que esto es independiente de su actividad como aciltransferasa, ya que esta función se mantiene aun cuando se muta el motivo que define dicha actividad [58]. A partir de estos hallazgos sumados al particular patrón de expresión tisular de GPAT2, se puede plantear la hipótesis de que esta proteína **fisiológicamente está cumpliendo otro rol de importancia, distinto al de aciltransferasa**. A lo largo de esta tesis se expondrán más evidencias que indican que esta enzima tendría alguna otra actividad diferente a la inicialmente adjudicada por homología de secuencia con GPAT1.

3. ANTÍGENOS CÁNCER-TESTÍCULO

En las últimas décadas, varios estudios han demostrado que durante la maduración de las células germinales testiculares éstas expresan un gran número de genes que no se expresan o que lo hacen en muy bajos niveles en células somáticas normales a menos que sufran una transformación tumoral; es decir, muchos de estos genes son oncogenes o proto-oncogenes. Algunos de estos genes, que se expresan transitoriamente en testículo, tienen funciones cruciales para la espermatogénesis y la fertilidad y, a pesar de no haberse detectado en otros tejidos normales, sí se han encontrado expresados en células tumorales metastásicas. La expresión de los mismos en las células testiculares en desarrollo además de ser transitoria, suele ser específica de alguna etapa del proceso espermatogénico.

El término Antígeno Cáncer-Testículo (CTA) se usó por primera vez en 1997 y **hace referencia a una creciente lista de antígenos humanos y murinos que se expresan específicamente en tumores de distintos orígenes histológicos y en ningún otro tejido normal a excepción de las células germinales masculinas** (y eventualmente en placenta y ovario) [59]. El término *antígeno* deriva del hecho de que la expresión ectópica de estos productos génicos en tejidos tumorales induce la respuesta inmune y la síntesis de anticuerpos. La presencia de la BTB determina que el testículo sea un sitio de inmunoprivilegio al impedir la exposición de estos antígenos al sistema inmune evitando así la formación de autoanticuerpos. Por lo tanto, cuando éstos son expresados en tumores por fuera del testículo, son reconocidos por el sistema inmune. Muchos de los CTA fueron identificados por primera vez usando suero de pacientes cursando alguna patología oncológica. Algunos de los CTA más conocidos son: SP-17, SCP-1, MAGE, NY-ESO-1 y PIWIL2 [59]. Por lo tanto, si bien está claro que el testículo no es un tumor *per se*, las células germinales que en él se desarrollan expresan muchos de los oncogenes relacionados con el proceso tumorigénico y metastásico.

Los CTA se clasifican en aquellos codificados por genes ubicados en el cromosoma X (X-CTA) y aquellos que están codificados por genes distribuidos en todo el genoma menos en el cromosoma X (non-X-CTA). Los X-CTA representan más de la mitad de los CTA. Si bien se desconoce la función de cada uno de ellos, se ha demostrado que varios CTA están involucrados

en la regulación del ciclo celular, el control de la transcripción, la supervivencia celular y la apoptosis. Estudios sobre la expresión de los CTA han demostrado que **los eventos epigenéticos, principalmente la metilación del ADN, son los mecanismos más importantes de regulación de la expresión de los CTA en células germinales y tumorales**. Varios CTA han sido seleccionados para el desarrollo de vacunas contra el cáncer (inmunoterapia) y algunos de ellos son biomarcadores de varios tipos de cáncer, como el cáncer de ovario, de pulmón, de mama, de vejiga y de testículo [59-62]. Hoy en día están en curso múltiples ensayos clínicos evaluando inmunoterapias dirigidas contra ciertos CTA, algunos de los cuales están en fase III. Por lo tanto, la búsqueda de nuevos CTA y su estudio en relación al desarrollo del cáncer son un tema de investigación relevante en el campo de la biomedicina aplicada [59, 63].

En el 2009 Condomines *et al.* propusieron a **GPAT2 por primera vez como un CTA, ya que esta proteína se encontraba expresada diferencialmente en testículo y en mieloma múltiple** (referido como LOC150763 en el trabajo)[64]. Esta particularidad la distingue aún más del resto de las GPATs y refuerza la hipótesis de que GPAT2 estaría cumpliendo algún otro rol en el metabolismo celular, independiente de su actividad como aciltransferasa.

HIPÓTESIS DE TRABAJO

GPAT2 es una proteína cuya expresión tisular es una de las tantas características que la distingue del resto de las isoformas, ya que fisiológicamente se encuentra principalmente expresada en testículo. Además se ha visto sobreexpresada ectópicamente y patológicamente en tejidos tumorales humanos. Por lo tanto, dentro de este contexto, hipotetizamos que:

GPAT2 cumple un rol de importancia en la espermatogénesis y, como lo hacen otros CTA, influye en el desarrollo del fenotipo tumoral al sobreexpresarse ectópicamente en células cancerosas. Este patrón de expresión tisular específico está determinado principalmente por la regulación transcripcional del gen.

Para poner a prueba esta hipótesis y determinar el rol de esta isoforma en el funcionamiento celular, nos propusimos alcanzar los siguientes objetivos:

OBJETIVOS

- 1. Estudiar la regulación transcripcional de *Gpat2* de ratón, con el objetivo de determinar los principales mecanismos que influyen en su expresión en testículo.** Para ello primero se estudiará el perfil de expresión del ARNm y de la proteína en el transcurso de la primera ola espermatogénica para conocer qué tipo de células germinales expresan este gen y luego se analizarán los posibles factores que influyen en su transcripción.
- 2. Determinar la importancia de esta proteína en la espermatogénesis.** Para cumplir con este objetivo, se silenciará la expresión de *Gpat2* en testículos de ratones prepúberes con la finalidad de disminuir la expresión de su producto y así determinar si GPAT2 es una proteína de importancia para el establecimiento de la capacidad reproductiva masculina.
- 3. Determinar si la presencia de GPAT2 influye en el desarrollo del fenotipo tumoral,** para lo cual se emplearán líneas celulares humanas derivadas de tumores que expresen GPAT2 y cuyas características relacionadas con el fenotipo tumoral se evaluarán antes y después de silenciar la expresión de este gen.
- 4. Estudiar el patrón de expresión y regulación transcripcional de GPAT2 en líneas celulares humanas,** con el objetivo de determinar cuáles son los mecanismos que influyen en la regulación transcripcional de este gen en humano para intentar explicar su expresión anómala en células tumorales y consolidar su pertenencia al grupo de los CTA.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las composiciones de los buffers o de las soluciones que se usaron y los mapas de los vectores empleados se detallan en el Anexo 1 y en el Anexo 2, respectivamente.

1. MODELOS EXPERIMENTALES.

1.1. Cultivos celulares.

Para este trabajo, las diferentes líneas celulares utilizadas fueron obtenidas de ATCC y mantenidas en condiciones de temperatura (37 °C), humedad (98 %) y tensión de CO₂ (5 %) constantes. Para el mantenimiento de la línea celular, los medios fueron suplementados con SFB al 10 %, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina (de ahora en más denominados como medio “completo”) y las células fueron subcultivadas una vez por semana. Fueron mantenidas en placas de 100 mm. Para el subcultivo: se retiró el medio de cultivo, la monocapa de células se lavó con 5 ml de PBS tibio y luego se agregó 0,5 ml de tripsina 0,25% en EDTA 0,9 mM (Gibco). La acción de la tripsina se frenó con 5 ml de medio de cultivo completo tibio y las células se dispersaron por pipeteo. Un décimo del volumen se colocó en una placa de cultivo nueva y se completó con 10 ml de medio completo tibio. Sólo en el caso de la línea RAW 264.7 se las repicó utilizando *scrapers* (Greiner). Para ello, partiendo de placas de 100 mm, se levantó la monocapa raspándola suavemente con el *scraper*, para luego dispersar las células por pipeteo. Luego, un décimo del volumen se colocó en una placa nueva y se agregaron 10 ml de medio completo. Todo el material de cultivo fue esterilizado por autoclave o por filtración en el caso de los medios de cultivo. En la tabla 1 se detallan las líneas celulares utilizadas para cada experimento, el medio de cultivo, etc.

Tabla 1. Líneas celulares utilizadas.

Nombre	Código en ATCC	Origen	Medio de cultivo	Experimento
CHO-K1	CCL-61	Células epiteliales provenientes de ovario de hámster chino (<i>Cricetulus griseus</i>)	F12	<ul style="list-style-type: none"> Estudio de la actividad del promotor de <i>Gpat2</i>
TM4	CRL-1715	Células de Sertoli provenientes de ratón (<i>Mus musculus</i>)	DMEM:F12	<ul style="list-style-type: none"> Estudio de la actividad del promotor de <i>Gpat2</i>
RAW 264.7	TIB-71	Línea monocítica de ratón (<i>Mus musculus</i>) obtenida a partir de	DMEM	<ul style="list-style-type: none"> Estudio del efecto de DAC y de TSA sobre el nivel de

		tumor ascítico inducido por el virus de Abelson		transcripción de <i>Gpat2</i>
MCF7	HTB-22	Células epiteliales humanas derivadas de metástasis pleural derivada de adenocarcinoma mamario	RPMI	<ul style="list-style-type: none"> • Estudio de la actividad del promotor de <i>GPAT2</i> • Estudio del efecto de DAC y de TSA sobre el nivel de transcripción de <i>GPAT2</i>
MDA-MB231	HTB-26	Células epiteliales humanas derivadas de metástasis pleural derivada de adenocarcinoma mamario	DMEM	<ul style="list-style-type: none"> • Estudio del efecto de DAC y de TSA sobre el nivel de transcripción de <i>GPAT2</i> • Estudio del efecto del silenciamiento de <i>GPAT2</i>
HeLa	CCL-2	Células epiteliales humanas derivadas de adenocarcinoma de cuello de útero	DMEM	<ul style="list-style-type: none"> • Estudio del efecto de DAC y de TSA sobre el nivel de transcripción de <i>GPAT2</i>
HEK 293	CRL-1573	Células epiteliales humanas derivadas de riñón embrionario	DMEM	<ul style="list-style-type: none"> • Estudio del efecto de DAC y de TSA sobre el nivel de transcripción de <i>GPAT2</i> • Evaluación del efecto de la metilación <i>in vitro</i> sobre la actividad del promotor de <i>GPAT2</i>
HEK 293T	CRL-3216	Línea celular derivada de HEK 293 que contiene el antígeno T del virus SV40, permitiendo replicar vectores que porten con el sitio de replicación del SV40	DMEM	<ul style="list-style-type: none"> • Producción de lentivirus
HCT116	CCL-247	Células epiteliales humanas derivadas de carcinoma de colon	DMEM	<ul style="list-style-type: none"> • Estudio del efecto del silenciamiento de <i>GPAT2</i>

1.2. *Mus musculus*.

Los protocolos de manejo de animales fueron aprobados por el Comité Institucional para el Uso y Cuidado de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Ciencias Médicas (FCM), UNLP (número de aprobación T10-02-2013, noviembre de 2013).

Para los experimentos de expresión de *Gpat2* en función de la edad, de búsqueda de sitios de metilación *in vivo* y de silenciamiento de *Gpat2 in vivo*, se utilizaron ratones de la cepa Balb/c del Bioterio Central de la FCM o fueron adquiridos en el Bioterio de la Facultad de Ciencias Veterinarias (UNLP). Fueron mantenidos en cuartos con temperatura controlada (23 °C), ciclos de luz/oscuridad de 12 horas y la administración de agua y alimento (Cargill) fue *ad libitum*.

Para el experimento de prueba de la capacidad tumorigénica de células de la línea MDA-MB-231 transfectadas establemente con un vector que silencia la expresión de *GPAT2*, se usaron ratones hembra atímicas (“*nude*”) de 6 semanas de edad provenientes del Bioterio de la Facultad de Ciencias Veterinarias (N:NIH(S)-nu/nu/LP). Estos fueron mantenidos en una sala apartada del Bioterio Central de la FCM, especialmente acondicionada para el trabajo con este tipo de ratones, con ciclos de luz/oscuridad de 12 horas y temperatura controlada (23 °C). Todo el material fue esterilizado previo contacto con los animales, incluyendo el lecho de viruta y el alimento (CNEA, alimento irradiado). Tanto el alimento como el agua fueron suministrados *ad libitum*.

2. PROTOCOLOS GENERALES DE TRABAJO CON ADN.

Para todos los procedimientos de biología molecular o de trabajo con bacterias se utilizó material (tips, microtubos, tubos de PCR, etc) esterilizado por autoclave.

2.1. Cepa utilizada de bacterias.

Para los experimentos de clonado se utilizó la cepa de bacterias de *Escherichia coli* JM109. Esta cepa es adecuada para su uso para clonado de vectores no sólo porque es fácilmente transformable y de fácil crecimiento, sino también porque la mutación en el gen *RecA* evita que el vector se integre en su genoma y la mutación en el gen de la Endonucleasa A permite obtener plásmidos de mejor calidad. Esta cepa es sensible a los antibióticos ampicilina y kanamicina.

2.2. Medios de cultivos utilizados para bacterias.

Para el crecimiento de bacterias se utilizó el medio Luria-Bertani (LB) líquido o medio LB suplementado con 1,5% de agar (LB-Agar) como medio sólido. Ambos medios fueron esterilizados en autoclave y en caso de requerir antibióticos, éstos fueron agregados una vez que el medio alcanzó una temperatura igual o menor 50 °C.

2.3. Preparación de bacterias competentes.

Para la preparación de bacterias JM109 químicamente competentes, se siguió el protocolo descrito por Inoue *et al.* [65]. Para ello se partió de una placa de LB-Agar con una

estría de *E.coli* JM109 crecida toda la noche a 37 °C. A 250 ml de SOB en un Erlenmeyer de 2 l se le agregó la Solución de Magnesio junto con 10 colonias picadas de la placa de LB-Agar. Se dejaron crecer por aproximadamente 15 horas a 22 °C con agitación vigorosa, hasta alcanzar una DO de 0,6. Luego, se colocó el erlenmeyer en hielo por 10 minutos y se centrifugó 10 minutos a 2100 x g a 4 °C. Se descartó el sobrenadante, el pellet se resuspendió en 80 ml de Buffer de Transformación (TB) y se incubó 10 minutos en hielo. Luego se centrifugó por 10 minutos a 2100 x g a 4 °C. Se retiró el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 20 ml de buffer TB frío, al que se le adicionaron 1,4 ml de DMSO (7 % DMSO). Por último, las células resuspendidas se volvieron a incubar en hielo por 10 minutos y luego se alicuotaron de a 200 µl en microtubos previamente enfriados en hielo. Para lograr una congelación rápida, a medida que se preparaban las alícuotas, las mismas eran sumergidas en nitrógeno líquido y luego conservadas a -70 °C.

2.4. Transformación de bacterias con ADN plasmídico.

Para la transformación de bacterias competentes con ADN plasmídico se siguió el protocolo de Sambrook [66]. Para ello, las células competentes fueron descongeladas en hielo y alicuotadas de a 100 µl en microtubos previamente enfriados en hielo. Se agregaron alrededor de 10 ng de ADN plasmídico por tubo, se mezcló y se incubó en hielo por 30 minutos. Luego se procedió a realizar el shock térmico, incubando las suspensiones de bacterias por 45 segundos en un baño de agua a 42 °C, para después incubarlas por 5 minutos más en hielo. Transcurrido este tiempo, a cada tubo se le agregaron 600 µl de medio SOC a temperatura ambiente y se llevaron a una incubadora a 37 °C y agitación de 180 rpm por una hora. Por último, las bacterias fueron sembradas en placas LB-Agar con el antibiótico correspondiente según el gen de resistencia que porte el plásmido transformado e incubadas toda la noche en estufa a 37 °C para permitir el crecimiento de las colonias transformantes. En caso de placas de LB-Agar-ampicilina la concentración del antibiótico fue de 100 µg/ml, en el caso de placas de LB-Agar-kanamicina la misma fue de 50 µg/ml.

2.5. Obtención de plásmidos a pequeña escala (miniprep).

Para la obtención de plásmidos a pequeña escala se partió de cultivos bacterianos de 5 ml en medio LB líquido (con el antibiótico correspondiente) que se dejaron crecer toda la noche a 37 °C y 180 rpm. Para la purificación del plásmido se utilizaron kits comerciales de Qiagen (QIAprep Spin Miniprep Kit) o de GE Healthcare (illustra Plasmid Mini Spin Kit), siguiendo las instrucciones del fabricante.

2.6. Obtención de plásmidos a gran escala (maxiprep).

Para la obtención de plásmidos a gran escala se siguió un protocolo adaptado de Sambrook [66]. Se partió de un cultivo de bacterias en 200 ml de LB líquido (con el antibiótico correspondiente) que se dejó crecer toda la noche a 37 °C y 180 rpm. Luego de centrifugarlo a

6000 x g por 10 minutos a 4 °C, se resuspendió en 10 ml de Solución I y se agregó 0,5 ml de Lisozima (10 mg/ml). Se incubó 10 minutos a temperatura ambiente, se agregaron 10 ml de Solución II y se incubó 5 minutos más a temperatura ambiente. Después se agregaron 10 ml de Solución III fría y se incubó en hielo por otros 20 minutos. Pasado el tiempo de incubación se centrifugó 20 minutos a 20000 x g a 4 °C. El sobrenadante se filtró a través de gasas y se agregaron 0,6 volúmenes de isopropanol para luego dejar incubando 30 minutos a -20 °C. Luego se centrifugó 30 minutos a 15000 x g y a 4 °C y se descartó el sobrenadante. Al pellet obtenido se lo lavó con 10 ml de etanol 70 % y se centrifugó 10 minutos a 15000 x g. El sobrenadante se descartó y se dejó secar al pellet por unos minutos junto a un mechero. Este se resuspendió en 0,5 ml de agua estéril, se agregaron 2 µl de Ribonucleasa A y se incubó 30 minutos a 37 °C. Una vez finalizada esta incubación, se guardó a -20 °C.

2.7. Cuantificación.

Para medir la concentración de ADN en las distintas muestras (miniprep, ADN genómico, etc) se usó un espectrofotómetro marca Ultrospec 2100 pro (Amersham Bioscience) o un espectrofotómetro NanoDrop 2000c (Thermo). Los mismos permiten leer absorbancias a 260 nm, 280 nm, y 230 nm permitiendo así no sólo medir la concentración de ADN, sino también la presencia de proteínas y otros contaminantes. Se consideraron como adecuados los cocientes: $260/280 > 1,8$ y $260/230 > 2,0$.

2.8. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Para el clonado de los fragmentos del promotor de *Gpat2* se usó la polimerasa iProof High-Fidelity DNA (BioRad), que es apropiada para generar hebras de ADN de manera rápida y precisa. Para clonar las islas CpG a partir de ADN tratado con bisulfito de sodio, se utilizó la polimerasa Taq DNA de Invitrogen. Las reacciones fueron llevadas a cabo en un termociclador Veriti (Thermo). La descripción de las condiciones de reacción y la secuencia de los *primers* utilizados se detalla en las secciones correspondientes.

2.9. Digestión con enzimas de restricción.

En general, el corte con enzimas de restricción se llevó a cabo en un volumen final de 10 µl, durante 1-2 horas a la temperatura adecuada para la enzima utilizada, siguiendo el siguiente protocolo provisto por el fabricante (New England Biolabs o Invitrogen):

- 1-0,5 µg de ADN (plásmido, producto de PCR, etc.)
- 1 µl de buffer 10 X
- 1 µl de BSA 10 X
- 0,5 µl de enzima de restricción (1-3 unidades)
- H₂O c.s.p. 10 µl

Cuando fuera necesario realizar una digestión con más de una enzima de restricción al mismo tiempo, la misma se llevó a cabo en algún buffer de reacción compatible para ambas enzimas o, en su defecto, se hizo secuencialmente, purificando entre digestiones por gel o por columna el fragmento a digerir.

2.10. Electroforesis en geles de agarosa.

Para la preparación de geles de agarosa se utilizó Certified Molecular Biology Agarose (BioRad) en una concentración de 0,5-1 %, según el tamaño del producto a separar, en buffer TBE. Las muestras fueron sembradas con buffer de siembra 6X para ADN, en paralelo con el patrón de peso molecular adecuado. La corrida electroforética se llevó a cabo a 100 V por 45-80 minutos en una cuba horizontal con TBE como buffer de corrida. Para la visualización de las bandas, el gel fue teñido luego con bromuro de etidio y para el análisis del mismo se usó un transiluminador Hoefer Macrovue UV-20 y se tomaron fotos con una cámara Kodak DC 210 Zoom Digital Camera y el software Gel-Pro Analyzer (Media Cybernetics, LP).

2.11. Obtención de células germinales de ratón.

Se aislaron células de la línea germinal de ratones macho con el objetivo de extraer su ADN genómico para realizar estudios epigenéticos. Este protocolo fue adaptado del de Boucheron y Baxendale [67]. Para ello de 3 a 8 ratones macho de 11, 15 y 30 dpp se sacrificaron por dislocación cervical, se les extirparon los testículos y se colocaron en medio RPMI en hielo. Una vez colectados todos los testículos de cada edad, se decapsularon y los túbulos seminíferos se colocaron en otro tubo con 50 ml de RPMI en hielo. Luego, se procedió al tratamiento con enzimas para disgregar el tejido y poder aislar las células germinales. Primero, una vez que los túbulos se concentraron en el fondo del tubo, se retiró la mayoría del RPMI dejando aproximadamente 4,6 ml y se agregaron 2,4 ml de colagenasa (Worthington, 2 mg/ml), 100 µl de hialuronidasa (Sigma, 10 mg/ml) y 300 µl de DNasa I (Sigma, 1 mg/ml). Se incubó con agitación leve a 37 °C por 30 minutos. Luego se descartó el sobrenadante (conteniendo células intersticiales) y se le agregó 3 ml de tripsina-EDTA (0,25%, Gibco) y 300 µl de DNasa I al pellet conteniendo principalmente células germinales y de Sertoli. Se colocó en baño térmico a 37 °C por 15 minutos con agitación leve, mezclando por inversión cada 5 minutos. Pasado este tiempo, se retiró del baño y se esperó a que las células sedimentaran. Con una pipeta se retiró suavemente el sobrenadante, que se colocó en 30 ml de RPMI 10% SFB, y al pellet restante se le agregó nuevamente tripsina y DNasa I y se incubó por 15 minutos más a 37 °C. Pasado este tiempo, se separó el sobrenadante y se colocó junto con el sobrenadante anterior. Estos, contienen células germinales y de Sertoli. La presencia de SFB en el RPMI que recibe los sobrenadantes inhibe a la tripsina. Luego, este tubo se centrifugó a 800 x g por 10 minutos a temperatura ambiente, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 3 ml de RPMI pipeteando varias veces para que se separen las células y se determinó su concentración usando una Cámara de Neubauer. Se prepararon tantas placas de 100 mm como fueran

necesarias con RPMI 5% SFB y se colocaron 5×10^6 células en cada una. Estas placas se incubaron toda la noche a 34 °C y 4 % de CO₂ para permitir la adhesión de las células de Sertoli a la placa de cultivo. Al día siguiente, se observó que hubiera células adheridas con un microscopio Olympus CKX41, se levantó el sobrenadante y se centrifugó a 800 x g por 10 minutos a temperatura ambiente. El pellet obtenido contiene principalmente células germinales. A partir del mismo, se extrajo ADN genómico como se describe a continuación.

2.12. Obtención de ADN genómico.

Se utilizó el kit comercial DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. En el caso de células en cultivo, se partió de una placa de 60 mm (aproximadamente 3×10^6 células) y éstas primero se tripsinizaron y se colectaron por centrifugación para luego purificar el ADN del pellet obtenido. Para la obtención de ADN genómico de testículos de ratón, se usaron dos testículos de 7 dpp y para la obtención de ADN genómico de células germinales, a partir del pellet obtenido a partir de la centrifugación de dos sobrenadantes de placas de 100 mm. Para la obtención de ADN de sangre humana, se partió de 1 ml de sangre.

2.13. Transfección de células eucariotas.

Para los ensayos de medida de la actividad del promotor de *GPAT2* de humana o de *Gpat2* de ratón (con y sin hormonas, metilado o sin metilar), se trabajó en placas *multiwell* de 48 pocillos (48-MW) y para la obtención de las líneas estables MDA-MB-231 y HCT116 con *GPAT2* silenciada o para el testeo de la capacidad silenciadora de *Gpat2* de ratón, se transfectó en placas de 60 mm o placas 6-MW. Se procedió a transfectar la línea celular correspondiente haciendo uso de cationes lipídicos (Lipofectamina 2000, Invitrogen). El día anterior a la transfección las células se plaquearon con medio completo de manera tal que al día siguiente estuvieran a una confluencia del 80%. Al día siguiente se procedió al agregado del ADN plasmídico de interés. Para ello, se diluyó el ADN (0,4 µg/pocillo en 48-MW, 6 µg/pocillo en 6-MW, 10 µg en placa de 60 mm) en medio de cultivo correspondiente incompleto (25 µl/pocillo para 48-MW, 250 µl/pocillo para 6-MW, 500 µl para placas de 60 mm) y la Lipofectamina 2000 (relación Lipofectamina 2000:ADN, 3:1, vol.:µg) en los mismos volúmenes de medio incompleto. Luego de una incubación de 5 minutos se mezclaron y se dejaron a temperatura ambiente por 20 minutos. Al finalizar la incubación se retiró el medio de cultivo de las células, se lavó la monocapa con PBS tibio y se agregaron 150 µl de medio incompleto en el caso de 48-MW, 800 µl en 6-MW y 1,5 ml en el caso de la placa de 60 mm. Pasados los 20 minutos, se agregaron los complejos ADN-cationes lipídicos a las células y se incubaron por 6 horas en estufa a 37 °C. Pasadas las 6 horas de incubación, se retiró el medio y se agregó medio de cultivo completo. A las 48 horas se procedió a levantar las células y a realizar las medidas correspondientes en el caso del ensayo de la actividad del promotor o a subcultivarlas para comenzar la selección con antibióticos, en el caso de las líneas establemente silenciadas.

del ADN tratado a una membrana en columna (EpiTect spin-columns), lavado, desulfonación del ADN unido a la columna, lavado para remover el agente de desulfonación y elución del ADN unido a la columna. Debido a que en esta técnica el ADN es sometido a condiciones de altas temperaturas y bajo pH, suele ocurrir la fragmentación del mismo, lo que lleva a una disminución en su calidad. Por esto, se partió de la máxima concentración de ADN genómico posible para este kit, en este caso 2 µg y se procedió según las instrucciones del fabricante.

2.15. PCR y clonado de ADN tratado con bisulfito de sodio para su secuenciación.

Luego de la conversión del ADN genómico con bisulfito de sodio es necesario amplificar por PCR la región de interés para poder secuenciar y así determinar su estado de metilación. El diseño de los *primers* para PCR post bisulfito es crítico para poder analizar las secuencias obtenidas. Dado que las citosinas no metiladas cambian a uracilo y que el estado de metilación de los pares CG es desconocido, es necesario diseñar *primers* que aparezcan por fuera de las regiones con estos dinucleótidos. Debido a que las Islas CpG por definición son regiones ricas en pares CG, es necesario diseñar *primers* por fuera de las mismas y reemplazar en éstos todas las C por T. Los *primers* fueron diseñados haciendo uso del programa *on line MethPrimer* (<http://www.urogene.org/cgi-bin/methprimer/methprimer.cgi>) tanto para el análisis de las Islas CpG del promotor de *Gpat2* de ratón, como para las de humano. Las secuencias de los *primers* se detallan a continuación en la siguiente tabla:

Tabla 3. Secuencias de *primers* utilizados post tratamiento con bisulfito de sodio.

Especie	Posición con respecto a GPAT2	Nombre	Tamaño del producto	Secuencia
<i>Homo sapiens</i>	De +401 a +377 (en el 1° intrón, <i>forward</i>)	F1	200 pb	GGAATGTTTGTGTTTTATAGAGAGT
	De +226 a +201 (en el 1° intrón, <i>reverse</i>)	R1		AAAAAAACATCCAAAACCTAATATC
	De +44 a +19 (en el 1° intrón, <i>forward</i>)	F5	400 pb	TTTGAAGTAGGAAAGTTTTTGGATG
	De -175 a -200 (<i>reverse</i>)	R5		CAAAATCTAACCTAAATCCCTACTC

<i>Mus musculus</i>	De -81 a -56 (<i>forward</i>)	IG2MmF1	196 pb	ATTGGTTGGTTTTTTTAGTTGTTGAG
	De + 69 + 92 (en el 1° intrón, (<i>reverse</i>))	IG2MmR1		ATTCCACATCAATCCCTACCTAAC

La PCR post conversión con bisulfito de sodio se llevó a cabo en un termociclador Veriti (Thermo) utilizando la enzima *Taq DNA Polimerase* de Invitrogen, en un volumen final de 25 µl siguiendo el siguiente protocolo, basado en las instrucciones del fabricante:

- 2-10 µl de molde (ADN tratado con bisulfito de sodio)
- 2,5 µl de primer *forward* 10 µM
- 2,5 µl de primer *reverse* 10 µM
- 2,5 µl de Buffer 10 X
- 0,75 µl de MgCl₂ 50 mM
- 0,5 µl de dNTPs 10 mM
- 0,2 µl de *Taq DNA polimerase* (5U/µl)
- H₂O c.s.p. 25 µl

Para el ciclado se siguió el siguiente protocolo:

- 1 ciclo de 2 minutos a 94 °C
- 8 ciclos de *touchdown* PCR: 45 segundos a 94 °C, 40 segundos a 64-56 °C (bajando de a 1 °C por ciclo), 1,5 minutos a 72 °C
- 30 ciclos: 45 segundos a 94 °C, 40 segundos a 56 °C, 1,5 minutos a 72 °C
- 1 ciclo de 6 minutos a 72 °C.

Debido a que la cantidad de producto obtenido luego de una ronda de PCR no era suficiente, se analizaron 15 µl de la reacción por electroforesis en gel y en caso de haber obtenido la banda de interés se utilizaron 5 µl para repetir la PCR. Luego todo el volumen de reacción se sembró en un gel y las bandas de interés se purificaron haciendo uso del kit illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para poder secuenciar las bandas obtenidas, fue necesario primero clonaras en el vector pGEM-T Easy Vector (Promega). Basándose en las instrucciones del fabricante, se siguió el siguiente protocolo de clonado:

- 20-50 ng de producto purificado

- 5 µl de *Ligase Buffer* 10 X
- 0,5 µl pGEM-T Easy Vector (50 ng/ µl)
- 1 µl T4 Ligasa
- H₂O c.s.p. 10 µl

Se dejó ligando toda la noche a 4 °C y al día siguiente la totalidad del volumen se utilizó para transformar 100 µl de bacterias JM109 competentes. Este vector, mediante el *screening* azul-blanco, permite diferenciar las colonias transformantes que poseen el vector con el inserto (blancas) o el vector sin inserto (azules). Por lo tanto, al día siguiente se picaron 6-9 colonias blancas y se crecieron en 5 ml de medio LB toda la noche a 37 °C y 180 rpm. Al otro día se purificaron los plásmidos usando el kit QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) y la presencia de inserto se verificó cortando al vector con enzimas de restricción. En caso de tener inserto, se enviaron a secuenciar 200 ng de cada miniprep a la empresa Macrogen (Corea).

2.16. Metilación *in vitro*.

Para el estudio del efecto de la metilación sobre la actividad del promotor de *Gpat2* de ratón y de *GPAT2* humano se utilizó el kit comercial CpG Methyltransferase (M.SssI) de New England Biolabs. Haciendo uso de las construcciones en el vector pGL3-BV, más adelante descritas, se siguió el protocolo del fabricante. Partiendo de 3 µg de cada vector se prepararon las siguientes reacciones:

Vector Metilado

- 3 µg de vector
- 2 µl de s-adenosilmetionina 1,6 mM
- 2 µl de Buffer 2 NEB 10 X
- 1 µl Sss I metiltransferasa (4 U/ µl)
- H₂O c.s.p. 20 µl

Vector Control

- 3 µg de vector
- 2 µl de s-adenosilmetionina 1,6 mM
- 2 µl de Buffer 2 NEB 10 X
- H₂O c.s.p. 20 µl

Se incubaron por 3 horas a 37 °C y luego la enzima se inactivó por 10 minutos a 65 °C. Después, los vectores metilados o los control se purificaron por columna por medio del kit comercial GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare) siguiendo las instrucciones del fabricante. Estos vectores luego fueron transfectados en la línea celular correspondiente para luego analizar su actividad promotora y así poder determinar si la misma es afectada por el estado de metilación de las C de los pares CG que contiene.

3. PROTOCOLOS ESPECÍFICOS DE TRABAJO CON ADN.

3.1. Confección de plásmidos con fragmentos del promotor de *GPAT2* humano y de ratón en el vector pGL3-BV.

Para la confección de las construcciones del promotor de *Gpat2* de ratón y de *GPAT2* de humano en el vector pGL3-BV (Promega) se partió de ADN genómico de tejido adiposo de ratón y de ADN de sangre humana y se utilizó la polimerasa iProof High-Fidelity DNA (BioRad) para obtener, por PCR, el fragmento de interés. Siguiendo las instrucciones del fabricante, se procedió según el siguiente protocolo:

- 1 µg – 500 ng de ADN genómico
- 10 µl de Buffer HF iProof
- 1 µl de dNTPs 10 mM
- 5 µl de primer *forward* 10 µM
- 5 µl de primer *reverse* 10 µM
- 0,5 µl iProof DNA polimerasa (2 U/ µl)
- H₂O c.s.p. 50 µl

Protocolo de ciclado:

- 1 ciclo de 30 segundos a 98 °C
- 35 ciclos de 10 segundos a 98 °C, 30 segundos a 57 °C, 15-30 segundos/Kbase a 72 °C
- 1 ciclo de 10 minutos a 72 °C.

En la siguiente tabla se muestran las secuencias de *primers* utilizadas (para las construcciones de distintos tamaños del promotor de *Gpat2* de ratón se varió la posición del primer *forward*, la del *reverse* se mantuvo):

Tabla 4. Secuencias de *primers* utilizados para clonar las regiones circundantes al primer exón de *Gpat2* de ratón y *GPAT2* de humano. En negrita se resaltan los sitios de restricción adicionados.

Especie	Región donde aparece	Nombre	Tamaño del producto	Secuencia	Nombre del vector con el inserto
<i>Mus musculus</i>	-1324	3.4MmForward	3441 pb	ACGCGT GGGTCTGAACTGGAGGTCAG	-1324 P
	-1165	3.2MmForward	3282 pb	ACGCGT GACCAGGAGAGGGTGCTAGA	-1165 P
	-873	2.9MmForward	2990 pb	ACGCGT ACAGCTGACCAAAAGCCACT	-873 P
	-642	2.7MmForward	2760 pb	ACGCGT TGGGGTAATTGGTTCTCACC	-642 P

	-156	2.2MmForward	2273 pb	ACGCGTTGTGGTACAGGCAGCAAGTC	-156 P
	+145	1.9MmForward	1972 pb	ACGCGTACAGTCAGAGGCAAGCTGGT	+145 P
	+2080	MmReverse	-	CTCGAGTCTGTAAGATCAGTGAATCAAGCAC	-
Homo sapiens	-2922	HsPG2Forward	3745 pb	ACGCGTTGGTCAGTGTCTGTTGGCAG	HsG2 P
	+823	HsPG2Reverse		CTCGAGTTGAACAGCAGAGGGCTTGT	

La presencia de las bandas del tamaño deseado se confirmó por electroforesis en gel de agarosa y previo a su inserción en un vector comercial, se purificaron usando el kit comercial illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare). Una vez purificado, el producto de PCR se ligó en el vector comercial PCR-Blunt vector (Zero Blunt PCR Cloning Kit, Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez obtenidas las construcciones en este vector, las mismas se cortaron haciendo una digestión doble con las enzimas de restricción MluI y XhoI (Promega), con el objetivo de insertarlas en el vector pGL3-Basic Vector (pGL3-BV, Promega). Para ello el vector pGL3-BV se cortó con esas mismas dos enzimas y, luego de purificarlo por columna, se ligó con el inserto. De esta manera, se asegura que la dirección de los promotores clonados sea la correcta. En los *primers* se han agregado los sitios de restricción para las enzimas mencionadas (**ACGCGT**: MluI; **CTCGAG**: XhoI). Luego, las ligaciones se transformaron en bacterias JM109, los plásmidos se obtuvieron mediante el kit comercial de Miniprep de Qiagen y para chequear la secuencia obtenida se enviaron a secuenciar Macrogen, Corea.

3.2. Medida de la actividad del promotor de *Gpat2* de ratón y de *GPAT2* humana.

El vector comercial pGL3-BV permite analizar cuantitativamente la capacidad promotora y los factores que puedan modificar la expresión de genes de mamífero. Estos factores pueden ser factores que actúan en *cis*, como secuencias promotoras y potenciadoras, o factores que actúan en *trans*, como diversos factores de unión a secuencias consenso del ADN. Este vector contiene como gen reportero el ADNc del gen de la luciferasa de la luciérnaga *Photinus pyralis*, que ha sido optimizado para el estudio de la actividad transcripcional cuando es transfectado en células eucariotas. Los insertos con las regiones promotoras se ligaron en el sitio de multiclonado que se encuentra corriente arriba del gen de la luciferasa. De esta manera, la expresión del gen de la luciferasa y, por lo tanto, la actividad luciferasa, depende de la efectividad de la secuencia promotora que se ha insertado.

Para el estudio de la actividad promotora de los fragmentos obtenidos de la región 5' del gen de *GPAT2* de ratón o de humano, se transfectaron las diferentes construcciones de pGL3-BV en células de mamífero en cultivo. Además de transfectar la construcción de interés, se co-transfectó un vector como control interno que permite normalizar la actividad de luciferasa

medida a la eficiencia de la transfección. Este vector (pRL-TK) es un segundo vector con luciferasa de otra especie (*Renilla reniformis*) como gen reportero y, en este caso, con un promotor moderado, como el de la Timidina Quinasa del virus Herpes Simplex. Dado que las luciferasas de luciérnaga y de *Renilla* son de diferente origen evolutivo, poseen requerimientos de sustrato distintos, lo que permite discriminar selectivamente entre las dos bioluminiscencias provenientes de una misma muestra. El kit comercial Dual-Luciferase Reporter Assay System (DLR, Promega) permite medir la actividad luciferasa de luciérnaga y luego extinguirla para medir la actividad de luciferasa de *Renilla*.

Por lo tanto, al cabo de 48-72 horas de la transfección, se levantaron y se lisaron las células, se midió la actividad luciferasa del vector problema y subsiguientemente, la actividad luciferasa proveniente de pRL-TK haciendo uso del kit comercial DLR en un equipo DTX 880 Multimode Detector (Beckman Coulter). Para realizar los cálculos, se normalizó en cada caso la luminiscencia proveniente del vector problema a la luminiscencia proveniente de pRL-TK.

Con estas construcciones se realizaron los siguientes experimentos:

3.2.1. Determinación del promotor mínimo de *Gpat2* de ratón.

Las construcciones antes mencionadas (-1324 P – +145 P) fueron transfectadas en la línea celular CHO-K1 en una placa de 48-MW. Luego de 48 horas las células fueron lisadas y se midió la luminiscencia proveniente de las construcciones en pGL3-BV y luego la correspondiente a pRL-TK. Este experimento se realizó tres veces por duplicado.

3.2.2. Efecto de diversas hormonas sobre la actividad del promotor de *Gpat2* de ratón.

Para el estudio del efecto de diversas hormonas sobre la actividad del promotor de *Gpat2* de ratón se trabajó en primera instancia con la construcción más larga, la -1324 P. Esta construcción se transfectó en placas de 48-MW. Veinticuatro horas después del plaqueo de las células, éstas se transfectaron y a las 6 horas se retiró el medio de transfección y se agregó medio incompleto (sin SFB) y la hormona correspondiente. A las 48 o 72 horas post-transfección se lisaron las células y se midió la actividad de luciferasa. Las hormonas fueron preparadas en una solución madre en agua estéril, DMSO o etanol absoluto, a la concentración recomendada por el fabricante y preservadas a – 80 °C. Se eligieron líneas celulares que expresaran el receptor de la hormona en estudio. En el siguiente cuadro se indican las hormonas que se testearon, en qué línea celular y en qué concentración. Estos experimentos se realizaron tres veces, por duplicado.

Tabla 5. Hormonas utilizadas en ensayos de actividad del promotor de *Gpat2*.

Hormona	Concentración de trabajo	Línea celular en la que se evaluó	Concentración sérica normal en ratón
Corticosterona (Sigma)	60 ng/ml (0,17 μ M)	CHO-K1	0,05-0,2 μ M [70]
FSH (cedida por el Bioq. Scaglia)	50-100 ng/ml	TM4	10-70 ng/ml [71]
Estradiol (Beta-estradiol, Sigma)	$10^{-9} - 10^{-11}$ M	MCF7	20 pg/ml (7×10^{-11} M) (ratones macho adultos) [72]
Ácido <i>all-trans</i> Retinoico (ATRA) (Sigma)	0-20 μ M	TM4	Retinol (Vitamina A): 1,5 μ M [73]
Ácido 9-cis Retinoico (9cisRA) (TRC)	0-10 μ M	TM4	

3.2.3. Estudio del efecto de la metilación sobre la actividad del promotor de *Gpat2* de ratón y de *GPAT2* de humano.

Con el objetivo de determinar si el estado de metilación del promotor de *Gpat2* de ratón o de *GPAT2* de humano influye sobre su actividad, se realizó una metilación *in vitro* de los vectores -156 P (promotor de ratón) y HsG2 P (promotor de humano) como indica el fabricante. Luego se transfectaron en las líneas CHO-K1 y HEK 293 respectivamente. Como control se transfectaron los mismos vectores que fueron incubados con la mezcla de reacción, pero sin la enzima Sss I metiltransferasa. Estos experimentos fueron realizados por duplicado, dos veces.

4. GENERACIÓN DE LÍNEAS ESTABLES CON *GPAT2* DE HUMANO SILENCIADA.

Para estudiar el efecto de la expresión de *GPAT2* en el desarrollo y mantenimiento del fenotipo tumoral, se trabajó con dos líneas celulares humanas derivadas de tumor que expresan esta enzima en niveles elevados: MDA-MB-231 y HCT116. La expresión de *GPAT2* se silenció por medio de vectores que portan un ARN de interferencia contra el transcripto primario de esta enzima. La elección de las líneas celulares estuvo basada en información extraída de datos *in silico*, que luego fue corroborada por qPCR (Figuras 2.4 y 2.5 de Resultados).

El silenciamiento de *GPAT2* en las líneas celulares MDA-MB-231 y HCT116 se logró mediante la interferencia por ARN (*RNA interference*, iRNA). Se trabajó con los vectores de la

compañía OriGene HuSH-29 shRNA Vectors, basados en el silenciamiento con ARN pequeños en forma de horquilla (*short hairpin RNA*, shRNA). Cuatro plásmidos con 29 nucleótidos específicos contra todas las distintas variantes de *splicing* de *GPAT2* (sh-*GPAT2*) fueron adquiridos, junto con un vector control cuya secuencia blanco no aparece con ningún ARNm de humano (*Non-effective 29-mer scrambled shRNA cassette*, SCR-*GPAT2*). Estos vectores poseen además el gen de resistencia a puromicina y a kanamicina (gen de resistencia eucariota y procariota respectivamente) y el gen de la Proteína Fluorescente Verde (*Green Fluorescent Protein*, GFP) regulado por el promotor del Citomegalovirus (CMVp).

Para seleccionar el vector sh-*GPAT2* que mejor silencia *GPAT2*, se probó cuál de los 4 vectores comerciales silenciaba más la expresión de *GPAT2* cuando se co-transfectaba con un vector de expresión que porta el cDNA de *GPAT2* (pCMV6 Vector, TrueORF, Origene) en la línea celular HEK 293. El nivel de silenciamiento se midió por qPCR. Una vez seleccionado el vector silenciador, se procedió a transfectar las líneas celulares de interés.

Para lograr una línea estable con *GPAT2* silenciada se transfectaron en placas de 60 mm 10 µg del vector sh-*GPAT2* en cada una de las líneas celulares mencionadas por medio de cationes lipídicos, como se dijo anteriormente. Veinticuatro horas después, la eficiencia de la transfección se chequeó observando la cantidad de células verdes bajo luz fluorescente, las células se repicaron y se agregó medio DMEM completo con 1 µg/ml de Puromicina para seleccionar las células que portan el plásmido. En paralelo se realizaron los controles transfectando con el vector SCR-*GPAT2*. Una vez alcanzado un 80-90% de células verdes con cada vector se procedió a realizar los experimentos correspondientes. El nivel de silenciamiento se monitoreó regularmente por qPCR.

Tabla 6. Secuencias de los shRNA contra *GPAT2* humana adquiridas.

Clon	N° de identificación del clon	Secuencia
1	TG307972A / GI331881	GGAGATACTGTTGCGTGGCTTTGATGTAG
2	TG307972B / GI331882	TGGTTCGGAGGCTCTGCTATTTCTGTGG
3	TG307972C / GI331883	GCAGGAATACATCGTCAGTGCCAGAAGCT
4	TG307972D / GI331884	TGCACCGTGTGACATAGACCATGCCTCGG

4.1. Experimentos realizados con líneas celulares tumorales humanas con la expresión de *GPAT2* silenciada.

Una vez obtenidas las líneas celulares cancerosas con *GPAT2* silenciada, se procedió a evaluar sus características tumorales.

4.1.1. Experimentos *in vitro*.

4.1.1.1. Estudio de la tasa de proliferación.

La tasa de proliferación de las líneas MDA-MB-231 y HCT116 con *GPAT2* silenciada (MDA-SH y HCT-SH) y de sus respectivos controles *scramble* (MDA-SCR y HCT-SCR) fue evaluada por medio del ensayo de MTT [74]. Este ensayo se basa en la reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa en un compuesto coloreado de color azul (formazán), permitiendo determinar la funcionalidad mitocondrial de las células tratadas. Este método ha sido muy utilizado para medir viabilidad, supervivencia y proliferación celular, siendo la cantidad de formazán producido directamente proporcional a la cantidad de células vivas. Para ello, 6000 células fueron sembradas por cuadruplicado en 4 placas 12 MW y durante 4 días se retiró, cada 24 horas, de a una placa de la estufa de cultivo y se procedió con el ensayo de MTT. Brevemente, 500 µl de una solución 5 mg/ml de MTT en PBS fue agregado a cada pocillo, se incubó por 4 horas en estufa de cultivo en la oscuridad, luego se vaciaron los pocillos y se agregaron 500 µl de una solución 0,04 M de HCl en isopropanol y se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente. Se evaluó la diferencia entre absorbancias a 560 nm – 640 nm, haciendo uso de un lector de placas DTX 880 Multimode Detector (Beckman Coulter). Este experimento se repitió tres veces por cuadruplicado.

4.1.1.2. Estudio de la tasa de migración.

El experimento de “cerrado de la herida” se basa en el comportamiento de una monocapa de células confluyente a la que se le ha realizado una brecha o “herida”. Las células en el borde de la brecha migrarán a través de ella hasta ponerse en contacto con otras células, cerrando así la “herida”. Cuanto antes se cierre la herida, más rápido migran esas células y más tumorigénicas son. Partiendo de una placa de 100 mm confluyente de MDA-SH y MDA-SCR, se realizaron 6 “heridas” con un tip de 200 µl. Luego, se lavó con PBS tibio para eliminar los detritos celulares y se agregó medio DMEM completo. A las 0, 2, 6 y 8 horas se tomaron fotos de las “heridas” con un microscopio invertido Olympus IX71, haciendo uso de una cámara Olympus, en aumento total 100 X. Para cuantificar la tasa de migración, se midió el ancho de la “herida” en diez regiones diferentes, haciendo uso del software Image Pro Plus. Este experimento se repitió dos veces, por triplicado.

4.1.1.3. Estudio del crecimiento independiente de anclaje.

Para este ensayo, una capa de 1,5 ml de medio DMEM completo con 0,5 % de agarosa fue agregado a una placa de cultivo de 35 mm. Luego que solidificara, se resuspendieron 5000

células en 1,5 ml de medio DMEM completo con 0,35 % de agarosa y se agregó a las placas. Estas fueron incubadas a 37 °C en estufa de cultivo por 14 días. Las colonias se visualizaron y contaron haciendo uso de un microscopio invertido Olympus IX71. Cuanto más tumorigénica sea la línea celular, más colonias formará. Este experimento se repitió dos veces y cada medida se realizó por triplicado.

4.1.2. Experimentos *in vivo*.

4.1.2.1. Xenoinjertos en ratones *nude*.

La tumorigenicidad *in vivo* es la capacidad de una línea celular para desarrollar tumores en ratones inmunodeficientes. Para ello se inoculan las células en cuestión en ratones atímicos y se controla el tiempo que les toma generar el tumor y las características del mismo. Price JE *et al.* [75] reportaron por primera vez la capacidad tumorigénica *in vivo* de la línea celular MDA-MB-231, ampliamente utilizada en la actualidad en este tipo de experimentos. Con el objetivo de determinar si el silenciamiento de *GPAT2* en la línea celular MDA-MB-231 afecta su capacidad de formación de tumores *in vivo*, se inocularon 3 grupos de 5 ratones *nude* hembras cada uno, de 6 semanas de edad con:

- Grupo MDA-SCR: $3,2 \times 10^6$ células en 200 μ l de DMEM
- Grupo MDA-SH: $3,2 \times 10^6$ células en 200 μ l de DMEM
- Grupo Control: 200 μ l de DMEM

La inoculación se llevó a cabo una semana después de la aclimatación de los animales y se realizó por vía subcutánea en el flanco izquierdo del ratón con agujas 30G de 13 mm. El monitoreo del animal y del crecimiento tumoral se realizó diariamente por observación cuidadosa, palpación del área inyectada y medición del volumen empleando un calibre y la fórmula modificada de un elipsoide: largo x ancho² x ½. Doce semanas después de la administración de las células, los animales fueron sacrificados por dislocación cervical y los tumores fueron extirpados y pesados. Para el sacrificio del animal, se tuvo en cuenta el criterio de punto final humanitario, que especifica que el tumor no debe superar un diámetro mayor a 1,5 cm ni mostrar heridas ulcerosas o que se debe proceder al sacrificio si el tumor, a pesar de no haber alcanzado el máximo tamaño permitido, es un limitante de salud del animal, como podría ser la restricción de movimiento.

5. PROTOCOLOS GENERALES DE TRABAJO CON ARN.

Para todos los procedimientos de trabajo con ARN todo el material fue esterilizado previamente en autoclave y se utilizó agua MiliQ tratada con el inhibidor de RNAsas, dietilpirocarbonato (DEPC, Sigma), tanto para resuspender el ARN como para la preparación de

las mezclas de reacción para la síntesis de ADNc y para qPCR. Además, se utilizó un juego de pipetas automáticas especialmente reservadas para el trabajo con ARN.

5.1. Obtención de ARN.

Para la obtención de ARN se utilizó el reactivo comercial TRIzol (Invitrogen) o TriReagent (MRC) cuyo fundamento se basa en lo descrito por Chomczynski y Sacchi [76]. Se trata de una solución monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina que facilita el aislamiento de ARN de distintos tamaños moleculares manteniendo su integridad, debido a la inhibición altamente eficaz de las RNasas. Brevemente, partiendo de células en cultivo en placas de 60 mm o a partir de 100-50 mg de tejido, se agregó 1 ml del reactivo, se pipeteó varias veces en el caso de células o se homogeneizó mecánicamente en el caso del tejido, se agregaron 200 µl de cloroformo y luego se agitó vigorosamente por 15 segundos y se dejó reposar por 10 minutos. Luego se centrifugó por 15 minutos a 12000 x g a 4 °C, para obtener dos fases: una fase inferior rosa de fenol-cloroformo y una superior acuosa incolora. Se separó la fase superior y se le agregó 500 µl de isopropanol. Se mezcló por inversión y se dejó reposar por 15 minutos, para luego centrifugar 15 minutos a 12000 x g a 4 °C. Se descartó el sobrenadante y el pellet de ARN se lavó tres veces con etanol 75%, centrifugando a 8000 x g por 10 minutos a 4 °C entre lavados. El pellet se dejó secar a 50 °C por 5 minutos y luego se resuspendió en 20-60 µl de agua MiliQ-DEPC. Para su mejor conservación, se guardó a -70 °C en alícuotas de 10 µl.

5.2. Cuantificación de ARN.

Para medir la concentración de ARN se usó un espectrofotómetro marca Ultrospec 2100 pro (Amersham Bioscience) o un espectrofotómetro NanoDrop 2000c (Thermo). Se prestó especial atención a los valores de los cocientes 260/280 y 230/260 para evaluar la presencia de contaminantes (proteínas y fenol/etanol, respectivamente). Se consideraron como adecuados los cocientes: $260/280 > 1,8$ y $260/230 > 2,0$.

5.3. Evaluación de la calidad de ARN.

Para determinar la integridad del ARN obtenido y la presencia o no de contaminación con ADN, se corrieron 0,5 µg de cada muestra en un gel con 1 % de agarosa p/v en TBE, por 20 minutos a 120 V en una cuba electroforética horizontal especialmente reservada para trabajo con ARN. Tanto el buffer TBE para preparar el gel como el utilizado durante la corrida fueron preparados con agua MiliQ-DEPC. Para la visualización de las bandas, el gel fue luego teñido con bromuro de etidio y para el análisis del mismo se usó un transiluminador Hoefer Macrovue UV-20 y se tomaron fotos con una cámara Kodak DC 210 Zoom Digital Camera y el software Gel-Pro Analyzer (Media Cybernetics, LP). Se evaluó la presencia de las típicas bandas 28S y 18S, siendo la intensidad de la primera el doble de la segunda. Sólo se trabajó con las muestras cuya corrida electroforética haya sido satisfactoria.

5.4. Obtención de ADN complementario (ADNc).

Para la obtención de ADNc se utilizaron los kits comerciales High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) y iScript cDNA Synthesis Kit (BioRad), siguiendo las instrucciones del fabricante, usando 1 µg de ARN. La reacción típica de retrotranscripción consiste en:

- | | | |
|---|---|---|
| <ul style="list-style-type: none"> - 2 µl de buffer de reacción 10 X - 0,8 µl de dNTPs 100 nM - 2 µl de <i>Random primers</i> - 1 µl de retrotranscriptasa - 4,2 µl de H₂O MiliQ-DEPC | } | + 1 µg de ARN disuelto en 10 µl finales = 20 µl finales |
|---|---|---|

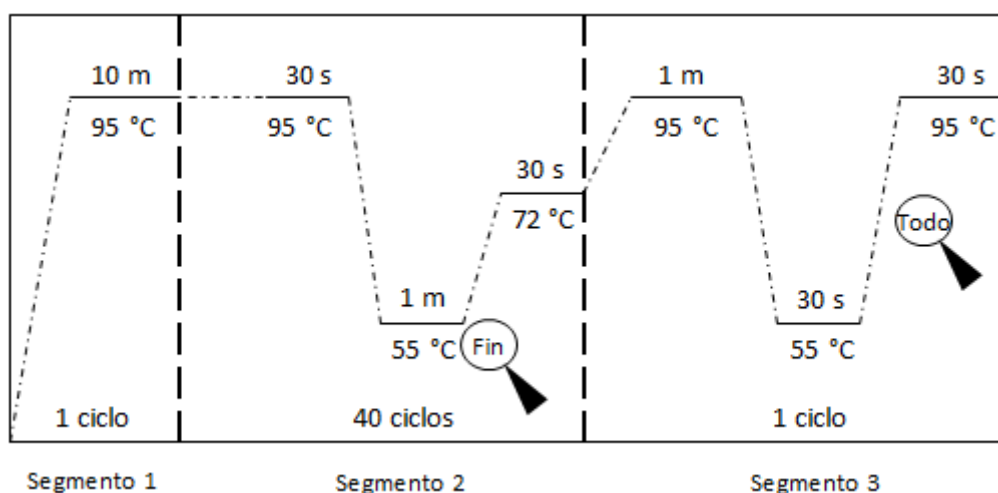
La retrotranscripción se llevó a cabo en un termociclador Veriti (Thermo) y el ciclado consiste típicamente en tres etapas: 10 minutos a 25 °C (unión de *random primers* al ARN), 120 minutos a 37 °C (síntesis de ADNc) y 5 minutos a 85 °C (inactivación de la retrotranscriptasa).

5.5. PCR cuantitativa o en tiempo real (qPCR).

Para la determinación de la cantidad de ARNm de algún gen en particular en algún tipo celular o tejido específico se utilizó el método de PCR cuantitativa a partir de ADNc. Esta técnica se basa en la detección específica del número de copias de un gen determinado haciendo uso de sondas específicas o fluoróforos no específicos. Para esto se utilizaron las *supermix* comerciales iQ SYBR Green Supermix (BioRad) o ABSolute QPCR SYBR Green Mix (Thermo Scientific) que contienen todos los reactivos necesarios para llevar a cabo una PCR tradicional (dNTPs, una ADN polimerasa *hot start*, buffer de reacción apropiado) exceptuando los *primers* y el ADN molde, los fluoróforos SYBR Green (agente intercalante) y ROX (fluoróforo no intercalante, agregado como control de carga), todo a doble concentración (2X). El molde para esta reacción es el ADNc, generalmente diluido de 5 a 20 veces, o más, aunque esto dependerá de la tasa de expresión del gen en estudio, de la sensibilidad del equipo, de la *supermix* utilizada, etc. El protocolo para una reacción típica de qPCR fue el siguiente:

- 12,5 µl qPCR *Supermix* 2X
 - 0,75 µl *Forward + Reverse Primers* 10 µM cada uno (Conc. Final: 300 mM)
 - 6,75 µl H₂O MiliQ-DEPC
 - +
 - 5 µl de ADNc diluído 1/5 – 1/20
- Total: 25 µl

Para el ciclado y la lectura de la fluorescencia se usó un equipo Stratagene Mx3000P. En general, el protocolo de ciclado y de lectura de fluorescencia fue el siguiente:




En el segmento 1 se produce la activación de la ADN polimerasa *hot start* y la desnaturalización del molde, el segmento 2 constituye la reacción de PCR propiamente dicha y el segmento 3 corresponde a la curva de disociación de los productos formados. Las lupas  indican cuándo se lee la fluorescencia: luego del apareamiento de los *primers* con el molde y durante toda la disociación de los productos de PCR formados. Debido a que la temperatura de disociación de un dímero de ácido nucleico depende de su secuencia, el análisis de las curvas de disociación permite determinar la cantidad de productos de PCR formados durante el ciclado, como también la presencia de sub-productos indeseados o dímeros de *primers*. Luego de cada corrida se corroboró la calidad de las curvas de disociación obtenidas y, en caso de no haber sido satisfactorias (presencia de más de un pico de disociación, dímeros de *primers*, etc), esos resultados no se consideraron. Luego del ciclado, el equipo devuelve el valor del Ct para cada muestra. Este valor corresponde al ciclo en el cual la fluorescencia de un dado pocillo alcanza la línea de base (ruido de fondo) durante la fase exponencial de la curva de reacción de PCR, es decir, el valor de Ct es el ciclo en el cual la fluorescencia cruza la línea umbral establecida. Para determinar el efecto de distintos agentes sobre la transcripción de *GPAT2* de humano o de ratón, para determinar su perfil de expresión durante la maduración sexual en testículo de ratón, etc., se utilizó el método de cuantificación relativa, utilizando genes *housekeeping* (se muestran subrayados en la tabla 7) correspondientes según cada caso. Para realizar los cálculos se utilizó el *software* qBase que permite calcular las cantidades relativas de cada gen, teniendo en cuenta la eficiencia de amplificación, varios genes *housekeeping* y la propagación de errores debidos a los distintos cálculos.

Tabla 7. *Primers* utilizados para qPCR. Subrayados se muestran los genes *housekeeping* usados:

Primer		Secuencia	Región donde aparece	Tamaño del producto (pb)
<i>GPAT2</i> humana	<i>forward</i>	ATCCTGCTGCTGATGCACCT	+ 1994-2013 (exón 16)	187
	<i>reverse</i>	ACAGCAGCTTTCTGCTCAAT	+ 2180-2161 (exón 18)	
<i>Gpat2</i> de ratón	<i>forward</i>	ATCCTACTGCTGCTGCACCT	+ 1880-1889 (exón 16)	187

	<i>reverse</i>	ACAGCAGCTTTGCACTCAGA	+ 2066-2047 (exón 18)	
Nanos3 de ratón	<i>forward</i>	TTCTGCAGGCAAAAAGCTGAC	+ 316-416 (exón 1)	104
	<i>reverse</i>	TTTTGGAACCTGCATAGACACC	+ 499-478 (exones 1-2)	
Tmem30c de ratón	<i>forward</i>	TACCTTCCGGAGAAAATGGAG	+ 365-385 (exón 3)	140
	<i>reverse</i>	TCACAGTTCGTAGTATCCCAAATA	+ 504-481 (exones 4-5)	
Tpn1 de ratón	<i>forward</i>	AGCCGCAAGCTAAAGACTCA	+ 46-65 (exón 1)	140
	<i>reverse</i>	TTGCGACTTGCATCATCGCC	+ 185-166 (exones 1-2)	
<u>β ACTINA de humano</u>	<i>forward</i>	GGACTTCGAGCAAGAGATGG	+ 747-776 (exón 4)	234
	<i>reverse</i>	AGCACTGTGTTGGCGTACAG	+ 980-961 (exón 5)	
<u>TBP de humano</u>	<i>forward</i>	TATAATCCCAAGCGTTTGC	+ 651-670 (exones 3-4)	170
	<i>reverse</i>	GCTGGAAAACCCAATTCTG	+ 820-801 (exón 5)	
<u>Rpl13A de ratón</u>	<i>forward</i>	ATGACAAGAAAAAGCGGATG	+ 366-385 (exones 5-6)	215
	<i>reverse</i>	CTTTTCTGCCTGTTCCGTA	+ 580-561 (exones 7-8)	
<u>Gapdh de ratón</u>	<i>forward</i>	CTGGAGAAACCTGCCAAGTA	+831-850 (exones 5-6)	223
	<i>reverse</i>	TGTTGCTGTAGCCGTATTCA	+1053-1034 (exones 6-7)	

5.6. Hibridización *in situ*.

Esta técnica permite localizar ácidos nucleicos en tejidos o células fijadas, obteniendo así información topográfica sobre la expresión de algunos genes y loci genéticos. Mediante hibridización *in situ* se determinó el patrón de transcripción de *Gpat2* en cortes de testículo de ratones de 7, 15 y 30 dpp. Para ello, se prepararon las sondas específicas de ARN de *Gpat2* digiriendo el ADNc de *Gpat2* en pcDNA3.1 en los sitios BamHI y EcoRI e incorporando el fragmento de 1456 pb en un vector pGEM11z(f)+ (Promega). Los testículos de ratón fueron fijados en paraformaldehído al 4% en PBS 0,1 M, luego embebidos en medio para congelado (O.C.T. compound, Tissue-Tek) y cortado en secciones de 10 µM. Para sintetizar la sonda antisentido, fue utilizado 1 µg de la construcción de *Gpat2* haciendo uso de polimerasa T7-RNA, mientras que para sintetizar la sonda sentido (control) se utilizó polimerasa SP6-RNA, en presencia de UTP-digoxigenina (Roche Applied Science). La digoxigenina es un esteroide que se puede unir a uracilo y que puede ser incorporado por las polimerasas y que además posee propiedades antigénicas, permitiendo entonces identificar ADN/ARN digoxigenilados por medio de anticuerpos acoplados a alguna enzima. Luego de un tratamiento con proteinasa K y prehibridización, las sondas marcadas con digoxigenina se hibridizaron por 16 horas a 65 °C en un estufa de hibridización. Luego de lavar, los cortes se incubaron con una dilución 1:2000 de un anticuerpo de oveja antidigoxigenina conjugado con fosfatasa alcalina (FAL) (Roche Diagnostics) en un buffer de bloqueo a temperatura ambiente por 3 horas. El revelado se realizó en una solución *nitroblue tetrazolium/5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate* (20 µl/ml) en la oscuridad por 16-20 horas. Luego, el material se lavó y la actividad de FAL se extinguió por fijación en paraformaldehído al 4 %. Las secciones se montaron en solución de montaje acuoso (Faramount aqueous mounting medium, DAKO) y se visualizaron en un microscopio Olympus

BX45. La preparación de tejidos, síntesis de las sondas y la hibridación *in situ* se llevaron a cabo en el *In situ* Hybridization Core Facility en la Universidad de North Carolina, Chapel Hill, EEUU. (<http://www.med.unc.edu/neuroscience/core-facilities/in-situ-hybridization>).

6. PROTOCOLOS ESPECÍFICOS DE TRABAJO CON ARN.

6.1. Incubación de líneas celulares con 5-aza-2'-desoxicitidina y tricostatina A.

Para determinar el efecto de la inhibición de la metilación del ADN sobre la expresión de *GPAT2* en células de humano y de ratón se utilizó el análogo de citosina 5-aza-2'-desoxicitidina (DAC) (Sigma). Este compuesto se incorpora en el ADN como si fuera C y se une irreversiblemente a las metiltransferasas (las enzimas encargadas de metilar el ADN en las citosinas en el contexto 5'-CG-3'), generando una desmetilación pasiva, re-activando genes que se encontraban silenciados epigenéticamente. Para determinar el efecto de la acetilación de H en la expresión de *GPAT2* en células de humano y de ratón, se trabajó con el inhibidor de la desacetilación, Tricostatina A (TSA) (Sigma). Ambas se disolvieron en DMSO a las concentraciones recomendadas por el fabricante. Se trabajó con las células MDA-MB-231, HEK 293, MCF7, HeLa y RAW 263.7 y se estudió el efecto de cada droga por separado y en forma conjunta. Las células se plaquearon en medio completo en placas 12-MW de manera tal de obtener una confluencia del 20-30% (aproximadamente 1×10^5 células/pocillo). A las 24 horas se reemplazó el medio de cultivo por medio completo fresco y se agregó DAC a una concentración final 2 μ M, agregando el mismo volumen de DMSO a los pocillos control. Esto se repitió a las 48, 72 y 96 horas. Al día 5 se reemplazó el medio de cultivo y, además de DAC, se agregó TSA a una concentración final 500 nM para los tratamientos "TSA" o "DAC+TSA". El día 6 se retiró el medio de cultivo, las células se lisaron con TRIzol y se procedió a extraer el ARN como se describió anteriormente. Una vez obtenido el ARN, se sintetizó el ADNc y se midió el nivel de transcripción del ARNm de *GPAT2* por qPCR.

7. PROTOCOLOS DE TRABAJO CON PROTEÍNAS.

7.1. Anticuerpos utilizados.

Anticuerpos primarios:

- Anti-GPAT2: reconoce específicamente la isoforma 2 de GPAT y cruza con las isoformas de humano, rata y ratón (Sigma). Se utilizó en una dilución 1/500 en leche descremada al 1% p/v en PBST para Western blot y 1/35 para inmunohistoquímica.

- Anti-GAPDH: producido en ratón contra la región entre los aminoácidos 1-335 de la isoforma humana, cruza con GAPDH de rata y ratón (Santa Cruz Biotechnology). Se utilizó en una dilución 1/5000 en leche descremada al 1% p/v en PBST.
- Anti- β Actina: producido en conejo contra el segmento de 1-100 aminoácidos de la isoforma humana, cruza con las isoformas de rata, ratón, oveja, vaca, perro, entre otros. Se utilizó en una concentración 1/5000 en leche descremada al 1% p/v en PBST (Santa Cruz Biotechnology).

Anticuerpos secundarios:

- Anti-IgG de conejo conjugado a peroxidasa: anticuerpo policlonal comercial (Pierce), diluido 1/5000 en leche descremada al 1 % p/v.
- Anti-IgG de ratón conjugado a peroxidasa: anticuerpo policlonal comercial (Pierce), diluido 1/5000 en leche descremada al 1 % p/v.

7.2. Identificación de proteínas por Western blot.

7.2.1. Obtención de homogenatos de testículo de ratón.

Se extrajo el órgano y se sumergió en buffer H suplementado con un 0,002% v/v de cocktail inhibidor de proteasas (Sigma), en hielo. La cantidad de buffer H agregada dependió del peso del tejido, manteniendo una relación de 5 ml/gramo. El tejido se disgregó mecánicamente con un homogeneizador de vidrio/teflón tipo Potter utilizando un sistema motorizado (Tri-R Instruments, 1000 rpm). Se utilizaron varios ratones para la confección de la curva de edad, procesando los testículos de cada edad en simultáneo.

7.2.2. Cuantificación de proteínas.

Se utilizó el método de Bradford [77], el cual se basa en el cambio de color del colorante Comassie Brilliant Blue G-250 en presencia de distintas concentraciones de proteínas. La interacción del colorante con aminoácidos básicos y aromáticos provoca un cambio en su máximo de absorción, de 465 a 595 nm (rojo y azul, respectivamente). Para determinar la concentración de proteínas de una determinada muestra, se realizaron diluciones 1/100, 1/50 o 3/33 y, en paralelo, una curva de calibración con albúmina 1mg/ml. Luego de agregar el reactivo de Bradford a la muestra, se incubó 5 minutos a temperatura ambiente y luego se leyó su absorbancia en las dos longitudes de onda en un lector de placas DTX 880 Multimode Detector (Beckman Coulter). Luego se restó Abs 594nm-Abs 465nm y con ese valor se construyó la curva de calibración y se determinó la concentración de proteínas de las muestras. Sólo se utilizaron los valores de las muestras problema cuyo valor estuviera dentro de los límites de la curva de calibración.

7.2.3. Separación de proteínas en geles de poliacrilamida.

Para la separación de las proteínas de una muestra en función de su tamaño se utilizó un gel de poliacrilamida, en presencia del detergente aniónico dodecilsulfato de sodio (SDS). El método fue descrito por Laemmli [78] e implica una desnaturalización previa de las proteínas por calor y en presencia de β -mercaptoetanol y SDS (se rompen los puentes disulfuro, se interrumpen las interacciones débiles y la proteína se carga negativamente) para luego separar las distintas cadenas polipeptídicas en función de su tamaño a través de un gel al 10-15% de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE).

Entre 50-100 μ g de proteínas totales en buffer muestra se calentaron a 100 °C por 10 minutos y luego se sembraron en el SDS-PAGE, en paralelo con un marcador de peso molecular (Dual Color Standards, BioRad), utilizando un equipo Mini-Protean III de BioRad para la corrida electroforética, siguiendo las instrucciones del fabricante. La corrida se llevó a cabo en buffer de corrida, a 120 V utilizando la fuente de poder PowerPac Basic Power Supply (BioRad).

7.2.4. Transferencia.

Luego de la corrida electroforética, se retiró el gel y las proteínas fueron transferidas a una membrana de polifluoruro de vinilideno (PVDF, Immuno-Blot PVDF membrane, BioRad) utilizando el método húmedo Mini Trans-Blot Cell de BioRad. La transferencia se realizó en buffer de transferencia por 1 hora a 100 V en la misma fuente de poder. Previo a la transferencia, los papeles de filtro, las esponjas y las membranas fueron equilibradas por 10 minutos en buffer de transferencia.

7.2.5. Incubación con anticuerpos.

Luego de la transferencia, las membranas se bloquearon por 1 hora a temperatura ambiente con agitación suave o toda la noche a 4 °C con leche descremada al 5 % p/v en PBST. A continuación, se agregó el anticuerpo primario correspondiente durante dos horas a temperatura ambiente con agitación suave o toda la noche a 4 °C, a las concentraciones detalladas anteriormente. Luego, se retiró el anticuerpo y la membrana se lavó 6 veces por 5 minutos con PBST y agitación, a temperatura ambiente. Posteriormente, se procedió a agregar el anticuerpo secundario a la concentración detallada anteriormente durante 2 horas, con agitación leve a temperatura ambiente. Finalmente, se retiró el anticuerpo secundario y se lavó la membrana 6 veces por 5 minutos con PSBT y agitación a temperatura ambiente y se procedió al revelado.

7.2.6. Revelado.

Para el revelado por quimioluminiscencia se prepararon dos soluciones:

Solución 1:

- 50 µl de luminol (Sigma) 0,044 gr/ml en DMSO
- 22 µl de ácido p-cumárico (Sigma) 0,015 gr/ml en DMSO
- 335 µl de buffer Tris 1,5M pH 8,5

Llevar a 5ml con H₂O

Solución 2:

- 335 µl de buffer Tris 1,5M pH 8,5
- 3,2-8 µl de H₂O₂ 40 vol.

Llevar a 5ml con H₂O

Luego del último lavado con PBST, éste se retiró y se secó la membrana. En la oscuridad, se mezclaron las soluciones 1 y 2 e inmediatamente se volcaron sobre la membrana. Luego de 1 minuto se sacó la membrana de la solución de revelado y se colocó en un casete de exposición Kodak y por encima una placa radiográfica (Hyperfilm ECL, Amersham Biosciences), por 1-10 minutos. Luego la placa se sumergió en solución reveladora hasta la aparición de bandas, se enjuagó rápidamente con agua corriente, se colocó en solución fijadora por unos minutos, se enjuagó con agua corriente y se dejó secar. Teniendo en cuenta el marcador de peso molecular de la membrana, se procedió a analizar las bandas obtenidas.

7.3. Identificación de proteínas por inmunohistoquímica (IHQ).

Esta técnica se utilizó tanto para determinar la presencia y distribución de GPAT2 en cortes de testículos de ratón a distintas edades y en testículos de ratones inyectados con partículas lentivirales, como también para la determinación de GPAT2 en microarreglos de cortes de tejidos (*tissue microarray*, TMA) mamarios humanos cancerosos (N= 36) y normales (N= 6) (Origene, CT565863).

7.3.1. Obtención de tacos de parafina y cortes histológicos de testículo de ratón.

Los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical por el personal autorizado del Bioterio de la FCM y los testículos fueron extirpados e inmediatamente sumergidos en solución de fijación de Bouin por un mínimo de 30 minutos. Luego, los testículos fueron deshidratados por pasajes sucesivos por etanol en graduaciones crecientes, luego por xileno e incluidos en tacos de parafina que fueron cortados en láminas de 4 µm de espesor para luego ser montados sobre portaobjetos previamente silanizados. Esto fue realizado en la Cátedra de Patología de FCM.

7.3.2. Inmunohistoquímica.

Una vez obtenidos los cortes de testículo, éstos fueron re-hidratados en xilol y luego en soluciones de etanol de concentraciones decrecientes (100 %, 95%, 70% y 50%). Después, se bloqueó la peroxidasa endógena colocando los portaobjetos por 15 minutos en peróxido de hidrógeno (40 vol.): metanol 1/100. Luego, se lavaron 3 veces con PBS, se escurrieron bien y,

para el bloqueo, se colocaron en cámara húmeda con suero equino al 20% en PBS/BSA 1%, por 15 minutos. A continuación, se lavaron 3 veces con PBS y se colocaron en buffer citrato calentado a hervor por 15 minutos para la recuperación antigénica. Se lavaron con PBS, se agregó el anticuerpo primario anti-GPAT2, en la dilución mencionada, en PBS/BSA 1% y se incubaron en cámara húmeda por toda la noche a 4 °C. Pasada la incubación, se realizaron 3 lavados con PBS, se agregó el anticuerpo secundario anti-conejo conjugado a peroxidasa, a la dilución especificada, en PBS/BSA 1 % y se incubaron por 1 hora a temperatura ambiente en cámara húmeda. Luego de lavar 3 veces con PBS se revelaron con diaminobencidina (DAB). Para ello, se disolvieron 5 mg de DAB en 5 ml de PBS, se filtró y se agregaron 10 µl de H₂O₂ 40 vol. Esta solución se volcó sobre los cortes y se incubó por 15 minutos a temperatura ambiente, en ausencia de luz. El compuesto DAB es una sustancia que, junto con el peróxido de hidrógeno, forma un sustrato para la peroxidasa, que da lugar a un producto marrón, que precipita. Luego, se lavaron 3 veces con PBS y se contratiñeron con hematoxilina (Biopack), por 5-15 minutos. Se enjuagaron con agua corriente primero y agua destilada después y se deshidrataron pasando por el tren de alcoholes en concentraciones crecientes de etanol y finalmente por xilol. Para el montaje se colocó una gota de bálsamo de Canadá (Biopack) sobre cubreobjetos limpios y se colocaron sobre los portaojetos, cuidando que no queden burbujas. Se dejaron secar en estufa a 45 °C por dos días y se procedió a su análisis en microscopio Olympus BX45.

En paralelo, se realizaron tinciones con hematoxilina-eosina. Para ello, luego de la rehidratación de los cortes, se sumergieron en coplins con hematoxilina por 10-15 minutos, luego se lavaron con agua corriente y se tiñeron con eosina (Biopack) por 5-10 minutos. Luego de enjuagar con etanol al 50 %, se deshidrataron y se montaron con bálsamo de Canadá.

8. SILENCIAMIENTO *IN VIVO* DE GPAT2 EN TESTÍCULO DE RATÓN.

Se silenció la expresión del gen *Gpat2 in vivo*, en testículos de ratón, mediante la inoculación de partículas lentivirales que portan un RNA de interferencia (del tipo shRNA) contra el ARNm de *Gpat2*. En el Anexo 2 se amplían las características de los lentivirus, se describen las generaciones en las que se clasifican los sistemas lentivirales y se muestran los mapas de los vectores usados.

8.1. Vectores.

Para este trabajo de tesis se usó un sistema lentiviral de segunda generación, compuesto por los siguientes tres vectores:

- Vector con el transgen: los vectores con el DNA que codifica para un RNA de interferencia (shRNA) contra el transcripto de *Gpat2* de ratón o para un shRNA que no aparea con ningún transcripto (vector con secuencia *scramble*, SCR) fueron adquiridos en la empresa

Thermo Scientific (GIPZ Lentiviral shRNA Vectors). Estos vectores poseen el gen del shRNA o SCR y el de la proteína TurboGFP (GFP: *Green fluorescent protein*) en un mismo transcripto bicistrónico (permitiendo identificar microscópicamente a las células que expresan el shRNA), genes de selección procariota (ampicilina) y eucariota (puromicina), entre otras características.

- Vector de empaquetamiento: psPAX2 (Addgene, # 12260). Contienen los genes virales: *gag*, *pol*, *tat* y *rev* y también el gen de resistencia a ampicilina para la selección de bacterias transformantes durante su amplificación.
- Vector de envoltura: pMD2.G (Addgene, # 12259). Contiene el gen de la proteína de envoltura VSV-G y el gen de resistencia a ampicilina.

Estos vectores fueron amplificados en bacterias JM109 como se describió anteriormente y su purificación se llevó a cabo utilizando el kit QIAprep Spin Miniprep (Qiagen) o por medio de la maxipreparación de plásmidos.

8.2. Selección del vector shRNA que mejor silencia la expresión de *Gpat2* de ratón.

Cinco vectores con un shRNA contra *Gpat2* de ratón fueron adquiridos (shRNA-*Gpat2*) (GIPZ Lentiviral shRNA Vectors, Thermo Scientific) además de un vector con una secuencia shRNA *scramble*. Estos cinco vectores portan shRNA contra distintos segmentos del ARNm de *Gpat2* de ratón. Para determinar cuál es el shRNA que mejor silencia su expresión, se co-transfectaron células 293T con un vector que expresa *Gpat2* de ratón en pcDNA 3.1 (Invitrogen) (293T-*Gpat2*) y con los distintos vectores shRNA-*Gpat2* o con el vector SCR (sección 2.13). A las 48 horas, se extrajo su ARN con TRIzol y se procedió a analizar el nivel de expresión de *Gpat2* por qPCR. Se usó *TBP* de humano como gen *housekeeping*. El vector que más silenció la expresión de *Gpat2* en las 293T-*Gpat2* en comparación con las células transfectadas con el vector SCR fue el elegido para la producción de partículas lentivirales para el silenciamiento de *Gpat2* *in vivo*.

Tabla 8. Secuencias de los shRNA contra *Gpat2* de ratón adquiridos.

Clon	N° de identificación del clon	Secuencia
1	V2LMM_105431	TGTACATTCAGGAAGAGGC
2	V3LMM_499833	TGAGGTAGCAGGTGCAGCA
3	V3LMM_499830	AGGTCTTGAGGTAGCAGGT

4	V3LMM_499834	TGAACGTCCAGACTGCACT
5	V3LMM_499835	ACAACACTACATTACCTA

8.3. Producción de lentivirus.

La línea celular HEK293 y sus derivadas genéticamente modificadas son las principales líneas celulares utilizadas para la producción de lentivirus. La forma más común de obtención de lentivirus es la de transfección transitoria de los vectores lentivirales en una línea celular empaquetadora y luego la purificación de los mismos por ultracentrifugación. Se usó la línea celular HEK 293T (293T) que, además de ser alta y fácilmente transfectable, fue modificada de manera tal que expresa constitutivamente el antígeno T grande del virus SV40, lo que permite la replicación de los plásmidos que tengan el SV40 Ori en células eucariotas, aumentando así el número de plásmidos por célula y permitiendo que estos se diseminen a través de la línea celular cuando las células se dividen. Este origen de replicación eucariota está presente en dos de los 3 vectores usados en la producción de lentivirus.

Para la obtención de partículas lentivirales se siguió el siguiente protocolo:

Día 1: se plaquearon las células 293T en placas de 100 mm en medio DMEM completo (5 % de SFB y antibióticos) de manera tal que su confluencia al día siguiente no fuera más que de 40 % (entre $1-2 \times 10^6$ células/placa). Se plaquearon mínimo 2 placas de células: una para producir lentivirus con el shRNA y otra para producir lentivirus SCR. En general, la cantidad de virus obtenida a partir de una placa era suficiente para inocular un ratón.

Día 2: se procedió a la transfección de las 293T mediante la técnica de fosfato de calcio [79]. En comparación con los métodos basados en cationes lipídicos, este método tiene la ventaja de que las células pueden estar a una baja confluencia y aun así transfectarse eficientemente y que es mucho más económico, particularmente importante en este tipo de técnicas por la cantidad de placas de células que se deben transfectar para obtener un título de virus aceptable. Para ello se prepararon los siguientes tubos (tantos tubos como placas a transfectar) en tubos de 15 ml, dentro del flujo laminar:

Tubo A: Vectores + Ca^{+2}	Tubo B: HEPES
- 20 μg de vector shRNA o SCR	- 840 μl de Solución de HEPES 2X
- 10 μg de vector pMD2.G	
- 20 μg de vector psPAX2	
+	
- 84 μl de Solución de CaCl_2 2M	
- 720 μl de H_2O MiliQ estéril	

Luego se colocó gota a gota la preparación del tubo A en el tubo B y se incubó por 20 minutos a temperatura ambiente. El agregado de una solución a la otra tiene que ser lento para permitir la formación de los complejos de ADN y Ca_2PO_4 . Después de la incubación, se adicionaron los complejos gota a gota sobre las placas con 293T con medio completo. Las placas se incubaron por 5-6 horas en estufa de cultivo, luego se retiró el medio de transfección y se lavó tres veces la monocapa con PBS tibio para eliminar el exceso de partículas precipitadas de Ca_2PO_4 . Se agregaron 10 ml de medio completo fresco y se devolvieron las placas a la estufa hasta el día siguiente.

Día 3: se observaron las placas al microscopio óptico invertido Olympus CKX41 equipado con una lámpara fluorescente y se chequeó que las células se hayan transfectado eficientemente (70-90 % de células verdes). Se retiró completamente el medio de cultivo conteniendo partículas lentivirales, se colocó en tubos de 50 ml para conservarlo a 4 °C, y se reemplazó por 10 ml de DMEM completo fresco. Esto se repitió con todas las placas, que luego se devolvieron a la estufa de cultivo hasta el día siguiente.

Día 4: ídem anterior.

Día 5: se retiró el medio de cultivo de las placas, se juntaron todos los sobrenadantes provenientes de placas 293T productoras de lentivirus shRNA y todos aquellos provenientes de placas productoras de lentivirus SCR y se procedió a su concentración por ultracentrifugación. Para ello, primero se centrifugaron los tubos de 50 ml a baja velocidad (10 minutos a 1800 rpm 4 °C) para pelletear aquellas células que se hayan despegado de la placa y detritos celulares. Luego, éstos sobrenadantes se ultracentrifugaron a 21000 rpm en un rotor SW 32 Ti en una ultracentrífuga Beckman Coulter LE-80K, por 2 horas y media a 4 °C. A continuación, los sobrenadantes se descartaron y los tubos se invirtieron sobre gasas estériles para eliminar el exceso de medio de cultivo. Luego se agregaron 150 µl de PBS frío sobre el pellet, se taparon los tubos y se dejaron toda la noche a 4 °C, para permitir que el pellet de partículas lentivirales se hidrate bien.

Día 6: dentro del flujo laminar, se pipeteó 30 veces el pellet de lentivirus en PBS y se alicuotó de a 50 µl en microtubos de 500 µl y se guardaron inmediatamente a -70 °C. Una alícuota de cada lentivirus se conservó para evaluar el título obtenido.

8.4. Evaluación del título de lentivirus obtenido.

Una vez obtenidas las partículas lentivirales fue necesario determinar la cantidad de unidades transformantes por unidad de volumen. Para ello, se siguió el siguiente protocolo (GIPZ Technical Manual, Thermo Scientific):

Día 1 (que coincide con el día 5 del protocolo anterior): se plaquearon 293T en placas de 24-MW en DMEM completo, de manera tal que al día siguiente no estuvieran a más del 50 % de confluencia (5×10^4 células por pocillo, aproximadamente).

Día 2 (día 6 del protocolo anterior): se realizaron diluciones seriadas de los lentivirus obtenidos. Para ello, para cada lentivirus (shRNA o SCR) se dispusieron 5 microtubos con 80 μ l de DMEM incompleto. En el primer tubo, se agregaron 20 μ l de la suspensión de lentivirus (dilución 1/5), se pipeteó 10 veces y 20 μ l de esta dilución se agregaron en el segundo tubo (dilución 1/25). Luego de pipetear 10 veces, 20 μ l se colocaron en el tercer tubo (dilución 1/125) y así sucesivamente hasta lograr 5 diluciones.

A continuación se retiró el medio de cultivo de las 293T, se agregaron 225 μ l de DMEM incompleto y a cada pocillo se le agregaron 25 μ l de una de las diluciones de lentivirus junto con 2 μ l de una dilución de polibreno 1 mg/ml (125 X, concentración final: 8 μ g/ml). Se devolvió la placa a la estufa de cultivo y se incubó toda la noche.

Día 3: se retiró el medio de transducción y se agregó DMEM completo (10 % SFB y antibióticos). Las células se incubaron por 48 horas más, cambiando el medio de cultivo si fuera necesario e inspeccionándolas diariamente con lámpara fluorescente para monitorear la presencia de células transformantes verdes.

Día 5: se contaron el número de colonias transducidas (células verdes). Para ello, se tomaron 4 fotografías de cada pocillo con luz fluorescente con un microscopio invertido Olympus IX71, con aumento 200 X (Figura 1). Luego se contaron el número de colonias verdes, se promedió y ese número se extrapoló al área total del pocillo (el área abarcada por el objetivo 200 X se calculó previamente con una cámara de Neubauer). Para calcular el número de unidades transformantes (TU) se utilizó la siguiente fórmula: $N^\circ \text{ colonias contadas} \times \text{factor de dilución} \times 40 = N^\circ \text{ TU/ml}$. En general, se trabajó con suspensiones de lentivirus con concentraciones entre $1 \times 10^7 - 10^8 \text{ TU/ml}$.

Figura 1. Imágenes obtenidas para el cálculo del número de TU proveniente de la transducción de células 293T con diluciones seriadas de lentivirus.

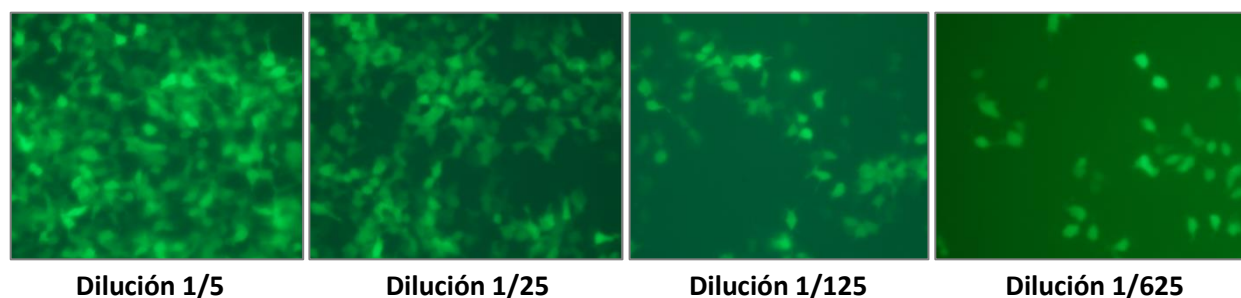


Figura 1. Ejemplo de imágenes obtenidas al microscopio óptico con luz fluorescente para el cálculo del número de TU proveniente de la transducción de células 293T con diluciones seriadas de lentivirus. Para el cálculo de TU sólo se consideraron aquellas fotos en las que las colonias estuvieran separadas de manera tal que fuera posible contarlas. Aumento: 200 X.

8.5. Inoculación de partículas lentivirales en testículos de ratón.

Ratones macho de la cepa Balb/c de 11 días fueron anestesiados con isoflurano al 1 % en oxígeno. Se abrió la cavidad abdominal, previamente higienizada con una mezcla de etanol-yodopovidona 1:1, haciendo uso de pinzas y tijeras de cirugía. Una vez localizados los testículos, estos se ubicaron por fuera de la misma y se inyectaron cada uno dos veces con aproximadamente 60 μ l de suspensión de lentivirus con azul de tripán (50 μ l de suspensión de lentivirus + 10 μ l de una dilución 0,04 % p/v de azul de tripán). El colorante vital se agrega para monitorear la penetración de la suspensión de lentivirus a través de los túbulos seminíferos. Se realizaron dos inyecciones en cada testículo con agujas 30G de 8 mm, penetrando el tejido de manera superficial. Debido al tamaño relativamente pequeño de los testículos de ratón a esta edad, se pudo observar como rápidamente éstos se volvían azules cuando se inyectaba la mezcla de lentivirus-azul de tripán. A continuación, los testículos se devolvieron a la cavidad abdominal y se procedió a suturar la incisión con hilo Vicryl, calibre 8-0 (Figura 2). Sobre la sutura, se agregó una gota del anestésico local lidocaína (10 mg/ml), se retiró la anestesia inhalatoria y se mantuvo al animal sobre manta térmica a 37 °C hasta observar movilidad. Luego, se devolvieron a la jaula con la madre hasta el destete. Los ratones se observaron diariamente, para evaluar movilidad y la presencia de signos de dolor. Este procedimiento fue realizado con el Dr. Pablo Stringa en el Laboratorio de Transplantes de Órganos y Tejidos, de la FCM, UNLP.

Figura 2. Inoculación intratesticular de partículas lentivirales en ratones Balb/c de 11 dpp.

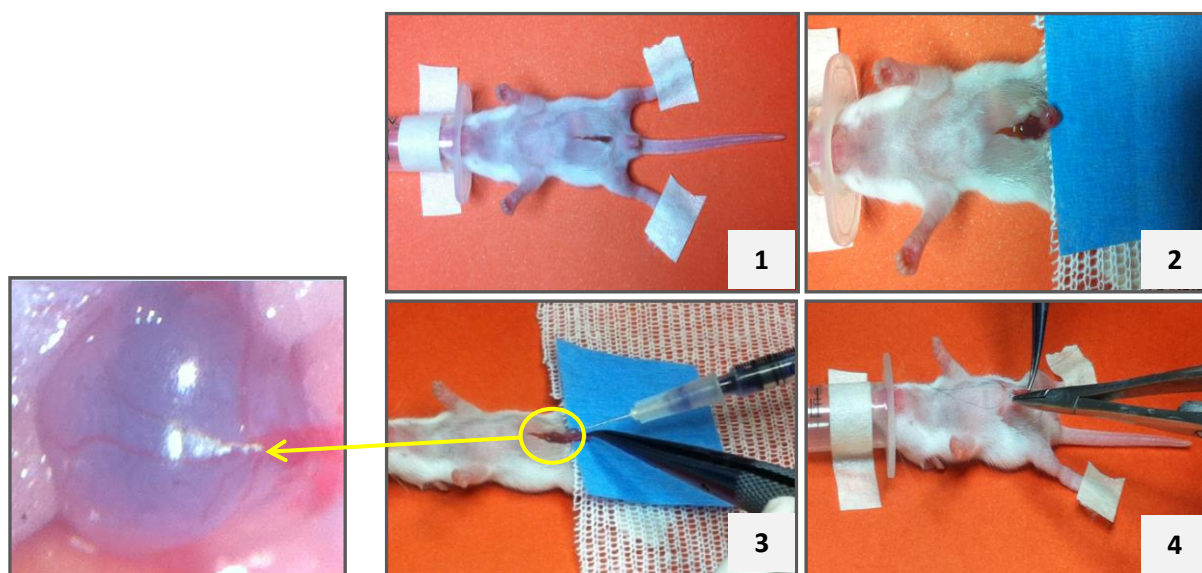


Figura 2. Protocolo para la inoculación intratesticular de PBS-azul de tripán o de partículas lentivirales en ratones Balb/c de 11 días. Pasos para la inoculación de partículas lentivirales: incisión en la cavidad abdominal (1), colocación de testículos por fuera de la misma (2), inyección de cada uno de ellos dos veces con PBS-azul de tripán (prueba) o lentivirus-azul de tripán (3 e imagen insertada) y sutura de la cavidad abdominal (4).

Una vez que los ratones inyectados con lentivirus alcanzaron la madurez sexual:

- Se sacrificaron, se extirparon los testículos y se realizaron preparaciones histológicas.
- Se realizaron test de fertilidad: un mes posterior a la inoculación de ratones macho con lentivirus shRNA-*Gpat2* o SCR, se colocó a cada uno con dos hembras Balb/c, hasta que cada una de ellas tuviera tres camadas de crías con el objetivo de observar si aquellos ratones inoculados con shRNA-*Gpat2* tenían una fertilidad reducida con respecto a los SCR.
- Se realizaron medidas de expresión de genes marcadores por qPCR. A partir de la bibliografía disponible se seleccionaron genes que se expresen en niveles elevados en momentos específicos de la espermatogénesis y de la meiosis con el objetivo de evaluar el efecto del silenciamiento de *Gpat2 in vivo* en la maduración de células germinales. Se midieron los genes *Nanos3* (espermatogonia), *Tmem30c* (espermatocono en paquiteno) y *Tnp1* (espermátide) (Tabla 7) [1].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

PRIMERA SECCIÓN

1. CARACTERÍSTICAS DE GPAT2 DE RATÓN EN SU CONTEXTO FISIOLÓGICO.

La primera espermatogénesis u ola espermatogénica en ratón inicia poco después de su nacimiento y progresa sincrónicamente en todos los túbulos, por lo que es posible determinar varios momentos clave para la aparición de distintos tipos celulares. Testículos de ratones de 7 dpp poseen sólo células de Sertoli y espermatogonias en sus túbulos seminíferos; a los 9 dpp aparecen los primeros espermatoцитos; a los 10 dpp comienza la meiosis; entre los 10 dpp y los 12 dpp alcanzan los estadios de diploteno y zigoteno, luego en el día 14 sobreviene el paquiteno que dura hasta el día 18 y luego entran en diploteno. En el día 20 aparecen las espermátides redondas, al día 30 alcanzan la etapa de elongación y aproximadamente a los 35 días se pueden ver los primeros espermatozoides en el lumen de los túbulos seminíferos. Luego de esta primera ola, las espermatogénesis sucesivas avanzan asincrónicamente en los distintos túbulos seminíferos. Por lo tanto, el análisis de la presencia de GPAT2 en testículo de ratón a distintas edades dentro de la primera espermatogénesis permite una determinación bastante aproximada del tipo celular en el que más se expresa este gen y proteína.

1.1. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE GPAT2 DURANTE LA MADURACIÓN TESTICULAR EN RATÓN.

1.1.1. Perfil de expresión del ARNm de *Gpat2* durante la maduración testicular.

Se analizó por qPCR el contenido de ARNm de *Gpat2* en ARN total obtenido de testículos enteros de ratón Balb/c a distintas edades. Se usaron como genes *housekeeping* *Gapdh*, uno de los genes recomendados en el trabajo de Zu Kang, G. *et al.* [80] y *Rpl13a*, cuyo patrón de expresión durante la maduración sexual en ratón es similar al de *Gapdh* (resultados propios). Se observó que la expresión de *Gpat2* se mantiene en niveles bajos hasta los 15 dpp, momento en el que su expresión aumenta abruptamente y luego disminuye y se mantiene relativamente constante, aunque en valores más elevados que los detectados en los primeros días: a los 15 dpp *Gpat2* se expresa 15 veces más que a los 3 dpp y a los 50 dpp, 7,5 veces más que a los 3 dpp. En la figura 1.1 se muestran los valores obtenidos normalizados a los genes *housekeeping*.

Figura 1.1. La expresión de *Gpat2* es máxima a los 15 dpp.

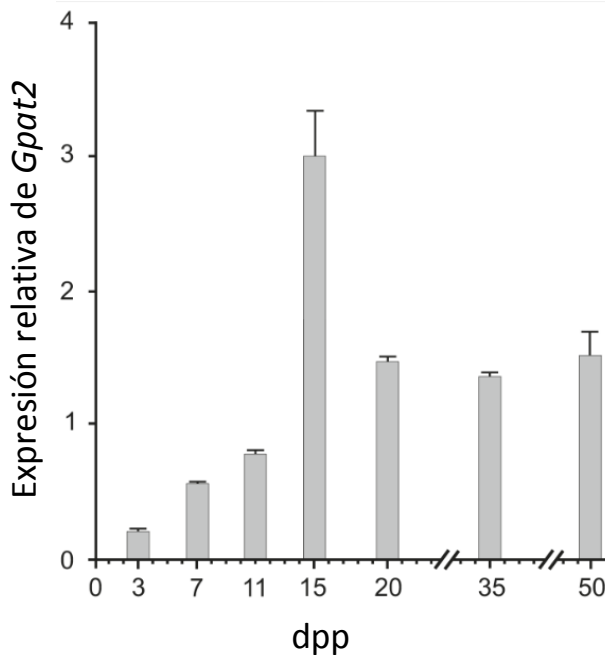


Figura 1.1. Perfil de expresión de *Gpat2* en testículo entero de ratón. Se midió el nivel de expresión de *Gpat2* por qPCR en testículo entero de ratón a distintas edades y se calcularon las expresiones relativas de cada edad con respecto a los genes *housekeeping* (*Gapdh* y *Rpl13a*) con el programa qBase. Se muestran los promedios de los duplicados de dos experimentos independientes \pm DE.

1.1.2. Perfil de expresión de *Gpat2* en testículo de ratón durante la maduración testicular a partir de datos *in silico*.

A partir de información obtenida de *microarrays*, se elaboró el perfil de expresión de *Gpat2* en testículo de ratón durante la maduración testicular pre y postnatal. Para ello se analizaron los resultados obtenidos en dos estudios disponibles en una base de datos pública. Brevemente, se descargaron los archivos .CEL del sitio web GEO de NCBI (*Gene Expression Omnibus*, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) proveniente de los estudios GSE4818 (n=21, desarrollo testicular prenatal) y GSE12769 (n=20, desarrollo testicular posnatal), en los cuales se utilizó un microchip de la compañía Affymetrix (Affymetrix Genechip Mouse Genome 430 2.0. Platform: Mouse430_2) para analizar los perfiles de expresión de distintos genes en testículo de ratón durante su desarrollo. El nivel de expresión del ARNm de *Gpat2* se estimó utilizando los valores de expresión de la sonda de Affymetrix 1456208_AT. Se observa que la información de expresión de *Gpat2* posnatal obtenida *in silico* (Figura 1.2) es coherente con nuestros resultados obtenidos por qPCR (Figura 1.1).

Figura 1.2. El perfil de expresión de *Gpat2* obtenido *in silico* durante la maduración testicular en ratón coincide con el obtenido experimentalmente.

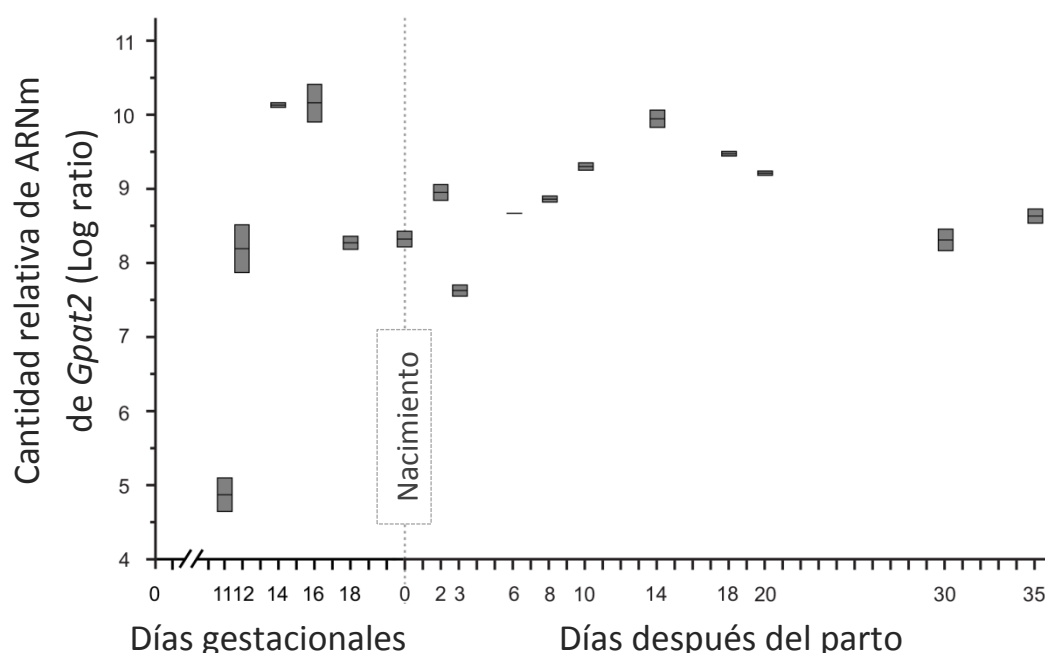


Figura 1.2. Perfil de expresión de *Gpat2* durante el desarrollo pre y postnatal de testículo de ratón. Datos obtenidos *in silico*, a partir de los estudios GSE4818 y GSE12769, descargados de la base de datos pública GEO, de NCBI. El perfil posnatal observado coincide con el perfil obtenido por qPCR.

1.1.3. Perfil de expresión de la proteína GPAT2 durante la maduración testicular.

Se analizó por Western blot la presencia de GPAT2 en testículo entero de ratón a distintas edades. En la figura 1.3 se observa que el pico de aumento en la cantidad de proteína ocurre a los 20 dpp, es decir, con un desfase de 5 días con respecto al pico de expresión del ARNm de *Gpat2*. Esto se podría explicar de la siguiente manera: por un lado, el aumento en la cantidad de proteína puede no coincidir exactamente con el pico de ARNm ya que el momento de máxima transcripción y máxima traducción pueden estar desfasados temporalmente y cada uno puede estar regulado de forma independiente. Además la tasa de degradación del ARNm y de la proteína codificada por el mismo en general no coinciden y, por otro lado, el nivel de transcripción del ARNm de *Gpat2* a los 20 dpp, si bien es menor que a los 15 dpp, se mantiene en niveles elevados, comparables con el nivel de transcripción detectado a los 50 dpp. Por lo tanto, el pico en la cantidad de proteína GPAT2 observado a los 20 dpp probablemente se deba a la acumulación de la misma como consecuencia de su síntesis principalmente a partir del pico de ARNm a los 15 dpp y por la elevada tasa de transcripción que aún se observa a los 20 dpp.

Figura 1.3. La cantidad de proteína GPAT2 es máxima a los 20 dpp.

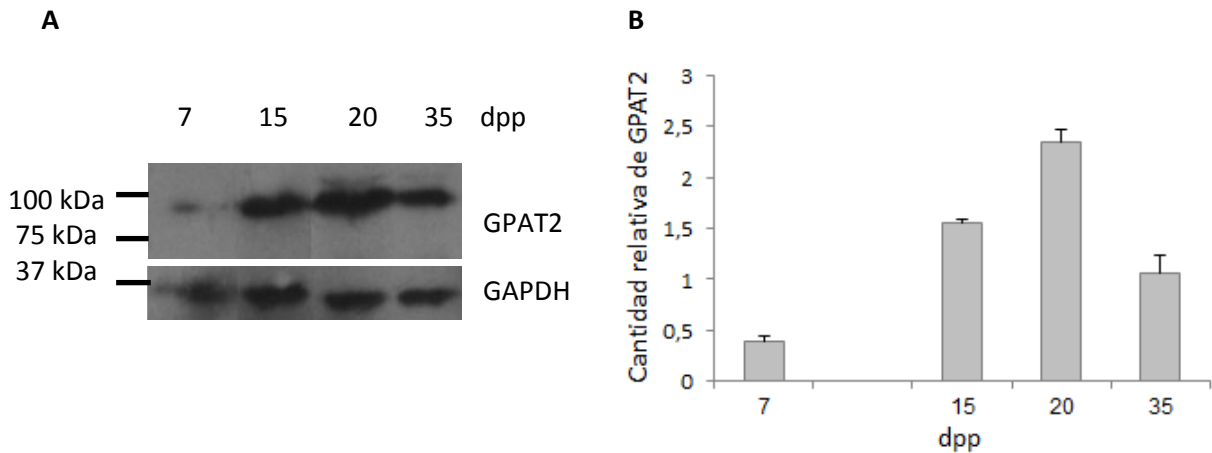


Figura 1.3. Análisis de la presencia proteína GPAT2 en testículo entero de ratón. En A se muestra el Western blot para testículo de ratón entero a distintas edades. Se sembraron 50 μ g de proteína de cada muestra y se reveló con anticuerpos anti-GPAT2 y anti-GAPDH. La banda de GPAT2 pesa aproximadamente 80 kDa y la de GAPDH 30 kDa. La cantidad de proteína GPAT2 se cuantificó con respecto al control de carga utilizando el programa Image J y se graficó en B. Se muestran los promedios de los resultados de dos experimentos independientes \pm DE.

1.1.4. Hibridización *in situ* (HIS) en cortes de testículo de ratón a distintas edades.

Esta técnica permitió determinar en cortes de testículo de ratón cuáles son las células que transcriben *Gpat2*, como así también su distribución espacial, en los cuales una coloración marrón-violácea representa una reacción positiva. En la figura 1.4 se puede observar que la transcripción de *Gpat2* a los 7 dpp es prácticamente indetectable, mientras que a los 15 dpp todas las células tubulares presentan marca, exceptuando las más basales, en donde se ubican las espermatogonias y las células de Sertoli. A los 30 dpp, la marca se localiza específicamente en un tipo celular en un estadio particular. Este resultado correlaciona y enriquece lo visto por qPCR ya que, el hecho de que la mayoría de las células germinales estén transcribiendo *Gpat2* a los 15 dpp y que luego a los 30 dpp sólo un tipo específico de células lo haga, explicaría el pico de expresión en esa edad y el descenso posterior, además de aportar información sobre la distribución espacial de las células que están transcribiendo *Gpat2* a distintas edades. Dado que la ubicación de las células positivas para *Gpat2* a los 30 dpp corresponde a la de espermatocitos primarios (ver figura 1.6) y que a los 15 dpp, momento en el que las células que entraron en meiosis están atravesando el estadio de paquiteno, la mayoría de las células tubulares son positivas, se podría afirmar que *Gpat2* se expresa en espermatocitos primarios que específicamente están atravesando la etapa de paquiteno.

Figura 1.4. Detección del ARNm de *Gpat2* en cortes de testículo de ratón a distintas edades.

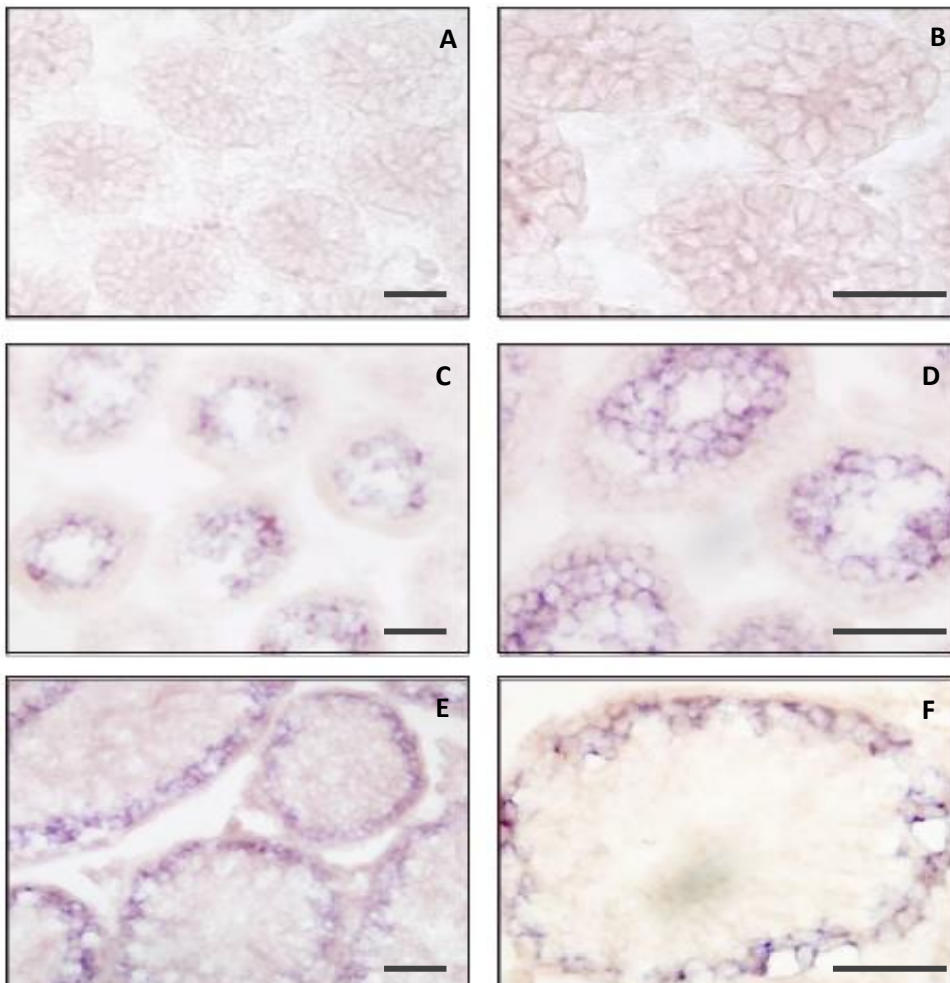


Figura 1.4. Hibridización *in situ* en cortes de testículo de ratón a distintas edades. Imágenes A y B, 7 dpp; C y D, 15 dpp; E y F, 30 dpp. Se muestran 6 imágenes representativas del análisis de 6 cortes de cada edad hibridados con las sonda antisentido para *Gpat2*. Los cortes hibridados con la sonda sentido (controles) no mostraron marca (no mostrado). Imágenes A, C y E, aumento: 400 X. Imágenes B, D y F, aumento: 1000 X. Barras de escala: 50 μ M.

1.1.5. Inmunohistoquímica (IHQ) en cortes de testículo de ratón a distintas edades.

Mediante IHQ se pudo determinar la distribución espacio-temporal de la proteína GPAT2 durante la maduración testicular en ratón durante la primera espermatogénesis u ola espermatogénica. La reacción positiva de la peroxidasa (marrón) indica la presencia de GPAT2. En los cortes de testículo de 7 dpp (Figura 1.5) se puede observar una señal bastante difusa y tenue, a los 15 dpp, cuando la mayoría de las células espermáticas se encuentran transitando la etapa de paquiteno (que ocurre entre los 12 dpp y 18 dpp), se observa una fuerte marca en todas las células germinales de túbulo seminífero y a los 30 y 40 dpp se observa una fuerte marca positiva en un tipo celular determinado, pero más difusa en el resto de las células germinales que se ubican hacia la luz del túbulo seminífero. Estos patrones de marca observados se correlacionan con lo observado por qPCR y Western blot, como así también con los resultados de la HIS.

Figura 1.5. Detección de la proteína GPAT2 en cortes de testículo de ratón a distintas edades.

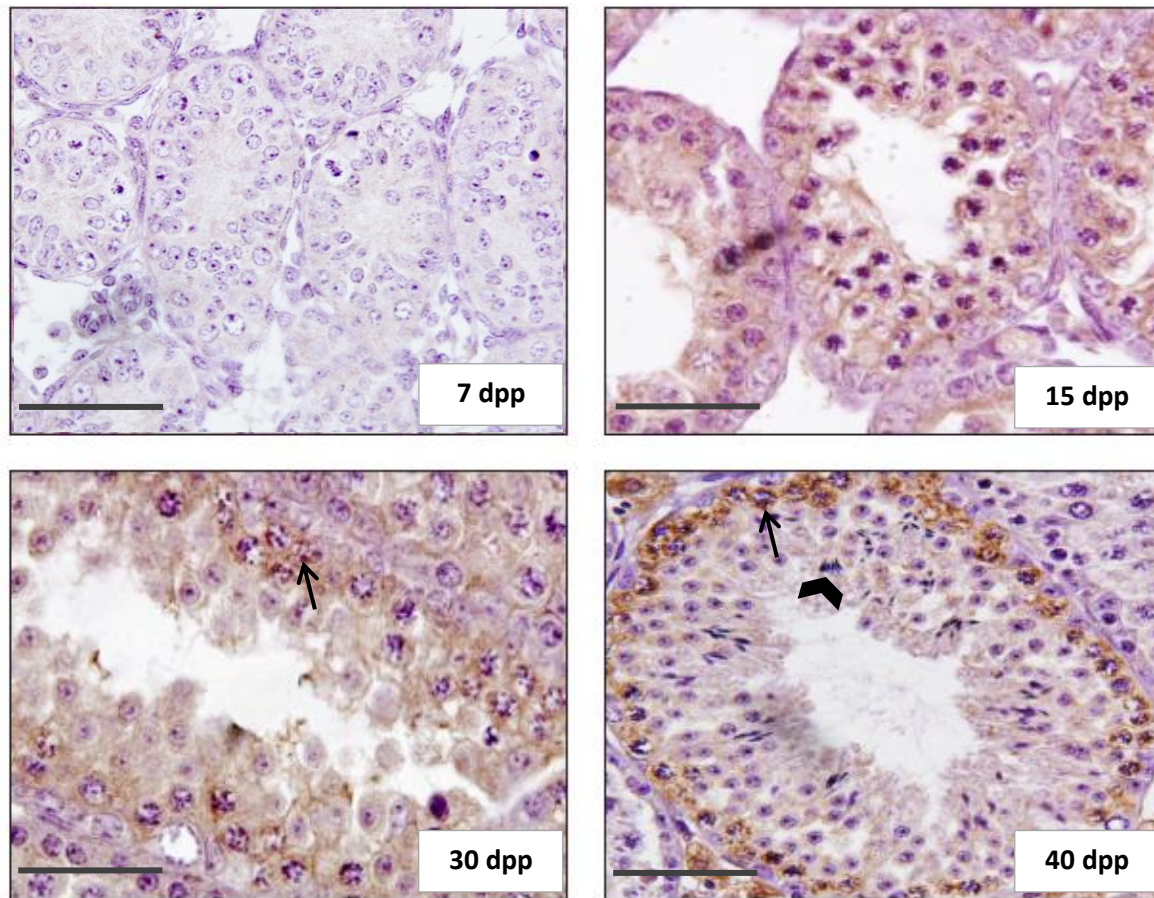


Figura 1.5. Inmunohistoquímica de cortes de testículo de ratón a distintas edades para la detección de GPAT2. Se realizó una IHQ sobre cortes de testículo de ratón de 7, 15, 30 y 40 dpp para evaluar el perfil de expresión tisular de GPAT2. Los cortes se contratiñeron con hematoxilina. Con flechas se indican las células con la marca más intensa a los 30 y 40 dpp, que coincide con el lugar que ocupan y con la morfología de espermatozoides en paquíteno. Con punta de flecha se indican espermatozoides. Aumento 600 X. Barras de escala: 50 μ M.

Analizando el perfil de expresión obtenido por qPCR e *in silico* para la cantidad de ARNm de *Gpat2* presente durante la maduración testicular posnatal en ratón, se observa un aumento abrupto en la cantidad de su transcrito a los 15 dpp, momento en el cual la gran mayoría de las células germinales que entraron en la primera meiosis se encuentran atravesando la etapa de paquíteno [2, 24, 26, 59]. Esta observación concuerda con lo visto por HIS a los 15 dpp. Además, la fuerte expresión de GPAT2 en esta etapa de la meiosis también se confirmó a nivel de proteína por IHQ en testículo de ratón a distintas edades: se detecta una fuerte señal positiva para GPAT2 a los 15, 30 y 40 dpp, pero no así a los 7 dpp. A pesar que la distribución de la señal detectada es distinta entre las edades analizadas, su ubicación coincide con la posición que ocupan los espermatozoides en paquíteno al comparar la ubicación y morfología de estas

células y la morfología y las características tintoriales de su núcleo con la bibliografía disponible [2, 26, 81]. En la HIS se obtuvieron resultados similares en lo que respecta a la cantidad y la ubicación de las células que están transcribiendo *Gpat2*. **Por lo tanto, nuestros resultados indican que tanto la expresión del ARNm como de la proteína GPAT2 son máximas en un tipo de célula en un estadio en particular de la espermatogénesis: los espermátocitos en paquitenio.** Esto se muestra de manera unificada en la figura 1.6, en la que se incluyen dos cortes de túbulos seminíferos murinos y la IHQ en testículo de ratón a los 40 dpp en la que se detalla la presencia de diferentes tipos celulares.

Figura 1.6. La máxima expresión de GPAT2 en testículo ocurre en espermátocitos en paquitenio.

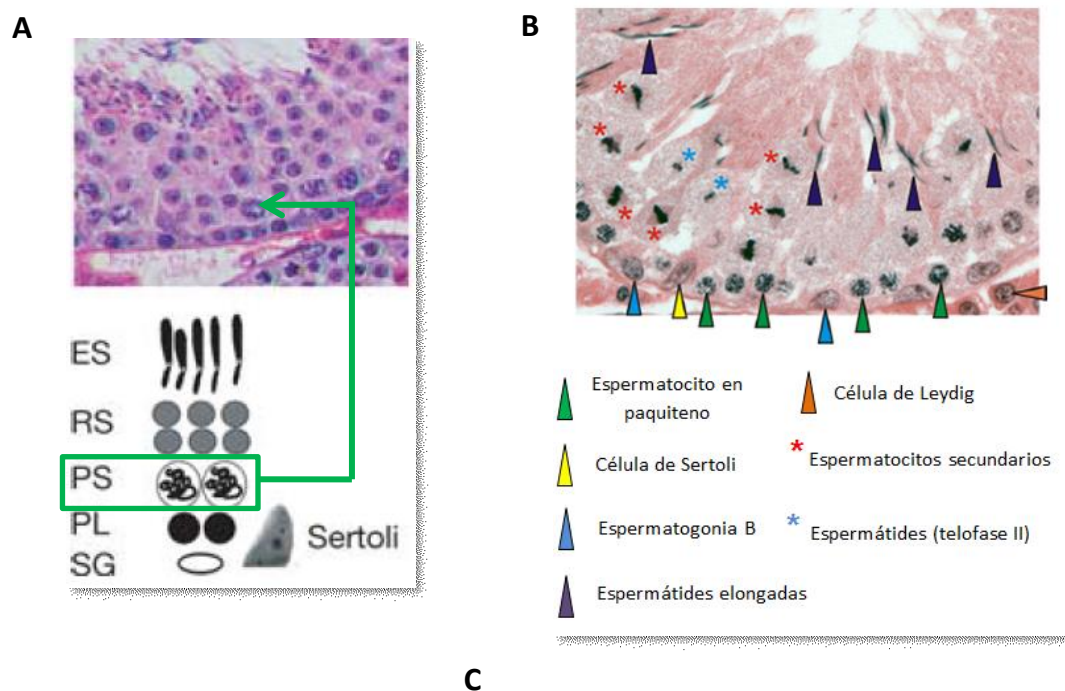


Figura 1.6. La máxima expresión de GPAT2 en testículo de ratón ocurre en espermátocitos en paquitenio. En A se muestra un corte de túbulo seminífero de ratón y un esquema de la ubicación relativa de cada tipo célula [81]. En B se muestra un corte de túbulo seminífero de rata (estadio XIV) [2] y en C se identifican algunos tipos celulares en la IHQ de ratón a los 40 dpp. Eg y SG: Espermatogonia, PL: espermátocitos preleptoténicos EP y PS: espermátocitos en paquitenio, ER y RS: espermátide redonda, EE y ES: espermátide elongada. La señal más intensa para GPAT2 se encuentra en los EP (punta de flecha). Aumento: 600X.

Es interesante destacar que **el perfil de expresión observado para GPAT2 durante el desarrollo pre y posnatal coincide con el de *Mili* y con las dos “olas” de expresión de piRNA observadas en células germinales de ratón durante la maduración testicular** (Figura 1.7). Desde el descubrimiento de los piRNA su estudio se ha focalizado principalmente en la línea germinal masculina [82], en donde la expresión de los piRNAs y de las proteínas PIWI es elevada y en la cual la mutación de los genes *Piwi* en ratón resulta en una severa infertilidad [83]. En modelos de ratón KO para *Miwi*, *Mili* o *Miwi2* (proteínas PIWI en ratón) quedó demostrado que los piRNA cumplen un rol central en la protección del genoma de la línea germinal contra los elementos transponibles, ya que en éstos además de verse severamente afectada la espermatogénesis y la biogénesis de piRNA, se reactivan los retrotransposones LINE1 e IAP [84]. La importancia de *Mili* específicamente en la espermatogénesis ha sido documentada en varios trabajos [51, 85-87]. En modelos de ratón KO para esta proteína los machos son estériles, y la espermatogénesis se detiene en zigoteno-paquiteno, se reduce la cantidad de piRNAs y aumenta la expresión de retrotransposones [51]. Cabe destacar que en este modelo se ve afectada la metilación *de novo* y particularmente se observa una hipometilación en las regiones reguladoras de la expresión de estos retrotransposones [85]. Entonces si bien las proteínas PIWI poseen actividad *slicer* (“cortadora”) *in vitro* operando a nivel del ARN postranscripcionalmente de manera similar al resto de los iRNA [88], también ejercerían un control sobre la metilación del ADN. Tal es así, que el fenotipo de ratones KO para *Dnmt3l* es semejante al KO de *Mili* [89, 90]. El mecanismo a través del cual las proteínas PIWI o el sistema PIWI/piRNA regulan la metilación del ADN no está aún del todo esclarecido. Además, la regulación epigenética por esta maquinaria demostró no sólo ser a nivel de la metilación de ADN, sino también a nivel de la metilación de H [91, 92].

Los análisis de co-expresión génica a partir de datos de microarrays, como el mostrado en la figura 1.7, son esenciales para plantear y determinar interacciones y correlaciones funcionales entre los genes. Tal es así que, en un trabajo de Shiromoto Y *et al.*, **GPAT2 se vio sorprendentemente involucrada en la biogénesis de piRNA** [58]. Los autores demuestran que GPAT2 interacciona físicamente con MILI ya que coinmunoprecipitan al usar anticuerpos anti-MILI y anti-GPAT2 en testículo y al co-transfectar ambos genes en la línea celular HEK 293. **Al silenciar a *Gpat2* en células derivadas de la línea germinal provenientes de testículos de ratones neonatos se observó que la cantidad de piRNAs disminuye drásticamente**, sin verse afectada la expresión de *Mili* (entre otros genes) y que la distribución de tamaños de ARN pequeños resultante es similar a la obtenida en modelos KO para *Mili*. Mediante secuenciación de estos ARN pequeños, se demostró que GPAT2 tendría importancia en la síntesis de piRNA por la vía primaria. Por último, al mutar el motivo que la define como aciltransferasa y expresarla en la línea celular con la expresión de *Gpat2* silenciada, los autores observaron que se recupera la producción de piRNA. Por lo tanto, quedó demostrado que **GPAT2 interacciona con MILI, una proteína de la familia PIWI, que cumple una función de importancia en la biogénesis de piRNA y que ésta es independiente de su sitio catalítico hasta ahora propuesto**

[58]. **Este hallazgo deja en evidencia que GPAT2 tendría alguna actividad diferente a la de aciltransferasa.** Cabe destacar que una situación similar se presentó con otra proteína de membrana mitocondrial externa llamada MitoPLD, que posee un sitio catalítico para hidrolizar cardiolipinas generando ácido fosfatídico y que se demostró que es necesaria para la producción de piRNAs. Se había propuesto entonces que el metabolismo de lípidos mitocondrial era importante en la generación de estos ARN pequeños, sin embargo recientemente se demostró que esta proteína tiene además actividad nucleasa y que podría participar en la producción primaria de piRNA, generando los extremos 5' y 3' de estos ARNs [93-95].

Por lo tanto, proponemos que el rol fisiológico de GPAT2 en testículo es diferente de la función clásica de las aciltransferasas. El hecho de que la importancia de GPAT2 en la producción de esta clase de ARNs pequeños sea independiente de la integridad de su motivo aciltransferasa, hace pensar que una posible función para GPAT2 es que sea una proteína de “andamiaje”, es decir, que sea el sitio de nucleación de MILI y otras proteínas necesarias para la producción primaria de piRNAs [58]. De hecho, hoy se conoce que MILI, junto con otras proteínas necesarias para el procesamiento de piRNAs, se ubican en gránulos citoplasmáticos llamados Cemento Intermitocondrial (o Cuerpo Cromático, según la etapa de la espermatogénesis en la que se encuentre la célula germinal) [52], una región citoplasmática no membranosa electrondensa que se encuentra entre “clústeres” de mitocondrias. Entonces, una posibilidad es que GPAT2 también pertenezca a este sistema. Otra posibilidad es que, además de pertenecer a esta estructura, posea algún sitio catalítico aún no identificado.

Figura 1.7. Los perfiles de expresión de *Gpat2*, *Mili* y piRNA durante el desarrollo testicular embrionario y posnatal coinciden.

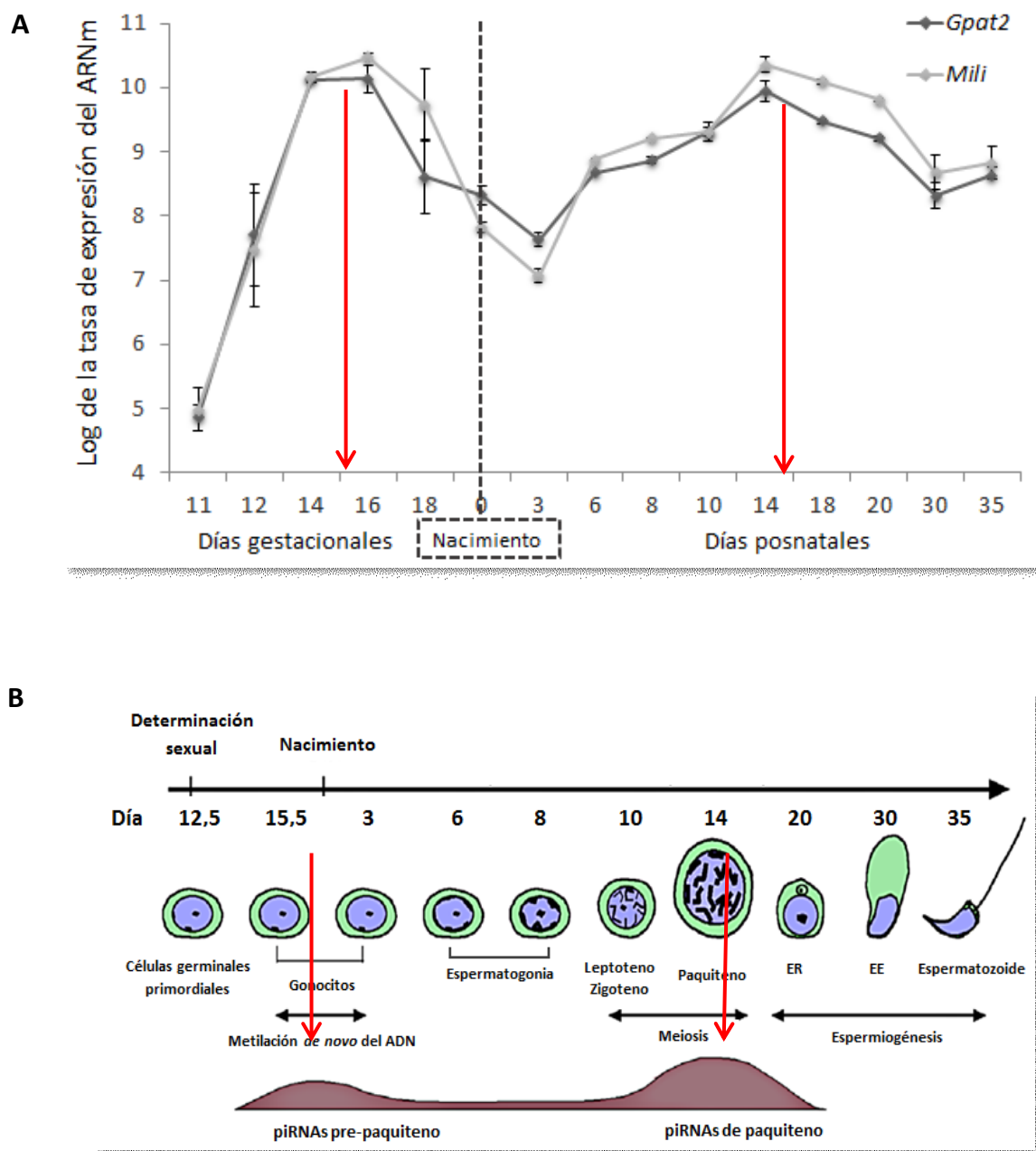


Figura 1.7. Correlación entre los perfiles de expresión de *Gpat2*, *Mili* y piRNAs durante el desarrollo testicular embrionario y posnatal. En A se muestra el resultado del análisis de datos obtenidos *in silico*, a partir de los estudios GSE4818 (n=21, desarrollo testicular prenatal) y GSE12769 (n=20, desarrollo testicular posnatal) (GEO Datasets, NCBI). El nivel de expresión de *Gpat2* y *Mili* se calculó utilizando los valores de expresión de las sondas 1456208_AT (Figura 1.2) y 1449170_AT (Affymetrix) respectivamente. En B se muestra un esquema de los perfiles de expresión de piRNA pre-paquiteno (prenatal) y paquiteno (posnatal). ER: espermátide redonda, EE: espermátide elongada (figura adaptada de [26]).

1.2. REGULACIÓN DE LA TRANSCRIPCIÓN DE *Gpat2*.

1.2.1. Análisis de la actividad del promotor de *Gpat2* en el vector pGL3-BV.

Con el objetivo de identificar la región mínima de actividad del promotor de *Gpat2*, se clonaron segmentos de distintos tamaños de la región corriente arriba del inicio de la traducción en el vector pGL3-BV que porta el gen de la luciferasa como gen reportero. Para el estudio de la actividad promotora basal, las construcciones de distintos tamaños fueron transfectadas en la línea celular CHO-K1, a las 48 horas se midió la actividad luciferasa y ésta se graficó normalizada a la actividad proveniente del control interno (pRL-TK) (Figura 1.8). Se observa que la actividad transcripcional se detecta hasta la construcción -156 P inclusive, por lo que la región de actividad promotora mínima se puede acotar a la región que va de -156 a +1.

Figura 1.8. El promotor mínimo de *Gpat2* está entre -156 y +1.

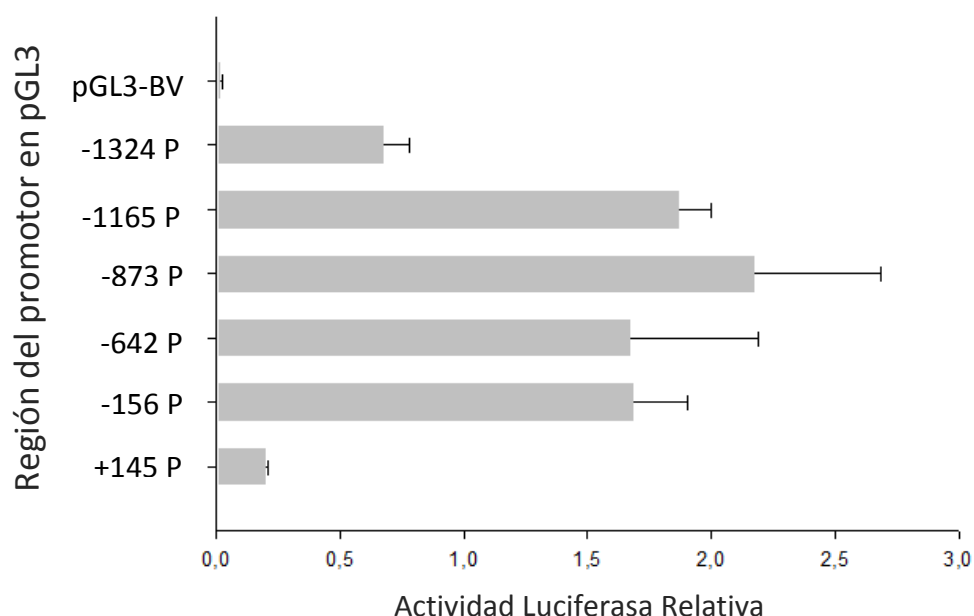


Figura 1.8. Evaluación del promotor mínimo de *Gpat2*. Se muestra la actividad luciferasa relativa al vector normalizador (pRL-TK) de las distintas construcciones elaboradas a partir de la región promotora de ratón. Como control se transfectó el vector pGL3-BV vacío. Se muestran para cada caso los promedios de los duplicados \pm DE de tres experimentos independientes.

1.2.2. Análisis *in silico* de las secuencias de consenso para hormonas en la región promotora de *Gpat2* de ratón.

La regulación endócrina de la espermatogénesis suele atribuirse principalmente a la interacción de las gonadotropinas y esteroides con las células somáticas de los testículos (células de Leydig y de Sertoli). Las células de Leydig responden a LH y sintetizan testosterona; las células de Sertoli están reguladas por FSH y testosterona y son las que le dan soporte físico y

nutricional a las células germinales. Si bien la importancia de estas hormonas en la espermatogénesis está bien descripta hoy en día, el rol esencial de la vitamina A en este proceso empezó a ser estudiado y comprendido hace pocos años. Históricamente, estaba generalmente aceptado que las células germinales no expresaban receptores hormonales y que por lo tanto, las hormonas llevaban a cabo su acción en las células germinales a través de las células de Sertoli. Sin embargo, hoy está ampliamente reportado la presencia de varias isoformas de receptores de ácido retinoico en las células de la línea germinal [96]. Además, en los últimos años también se ha reportado que el estradiol, la hormona sexual “femenina”, es importante para el desarrollo y maduración testicular, como también para la espermatogénesis y la capacidad fértil en el ratón macho [97] y se han detectado los dos tipos de receptores de estrógenos (α y β), no sólo en células de Leydig y Sertoli, sino también en células de la línea germinal [98].

La presencia de *Gpat2* en las células germinales nos condujo a preguntarnos si su transcripción estaría relacionada con la acción de alguna de las hormonas sexuales masculinas. Haciendo uso del programa Alibaba2.0 para analizar la región promotora de *Gpat2* y con una disimilaridad máxima del 1 % se han detectado varias secuencias consenso posiblemente regulatorias de su transcripción. Este programa utiliza la base de datos pública TRANSFAC, que contiene una exhaustiva compilación de sitios de unión para factores de transcripción eucarióticos, sus sitios de unión experimentalmente probados y los genes regulados por ellos. Se estudió la secuencia promotora de *Gpat2* de ratón, desde la posición -1324 hasta la posición +2105, que marca el inicio de la traducción. El primer intrón fue incluido en el análisis ya que se han reportado casos en los que los factores de transcripción actúan en esta región [99, 100]. Se detectaron varias secuencias consenso. Algunos de los sitios consenso encontrados que pueden tener relevancia biológica y que se han tenido en cuenta para diseñar los ensayos *in vitro* son: 9 para el receptor de ácido retinoico (teniendo en cuenta los receptores RAR y RXR), 4 para el receptor de estrógenos y 8 para el receptor de glucocorticoides. Para observar el análisis completo de la región promotora analizada mediante Alibaba2.0 ver Anexo 2.

1.2.3. Análisis *in vitro* del efecto de hormonas sobre la región promotora de *Gpat2* de ratón.

Se estudió si algunas de aquellas hormonas cuyas secuencias consenso para sus receptores fueron encontradas en el promotor de *Gpat2* afectaban la actividad del promotor de *Gpat2 in vitro*. Como se describió en la sección 3.2. de Materiales y Métodos, la hormona en estudio determinó la línea celular utilizada, ya que en cada caso fue necesario que la misma expresara el receptor de la hormona de interés. Luego de la transfección de la construcción correspondiente del promotor de *Gpat2* se agregó la hormona y a las 48 horas se midió la luminiscencia de cada muestra. A las concentraciones estudiadas, no se observaron diferencias

significativas sobre la actividad del promotor de *Gpat2* en presencia de corticosterona (glucocorticoide), FSH y estradiol (resultados no mostrados). Sin embargo, se detectaron diferencias significativas en presencia de los dos isómeros activos del ácido retinoico: ATRA y 9cisRA. Primero, se estudió el efecto de distintas concentraciones de cada isómero sobre la construcción -1324 P para determinar cuál era la concentración a la que se detectaba mayor respuesta y luego se evaluó el efecto de esa concentración sobre la actividad de las construcciones de distinta longitud. Estos ensayos se realizaron transfectando la línea celular derivada de ratón TM4, cuya capacidad de respuesta al agregado de retinoides se probó con anticipación transfectando un vector pGL3 cuya luciferasa se encuentra regulada por el promotor de la enzima Colina Citidiltransferasa α (CCT), que responde a la presencia de ácido retinoico [101] (Figura 1.9).

Figura 1.9. La línea celular TM4 responde al agregado de ácido retinoico.

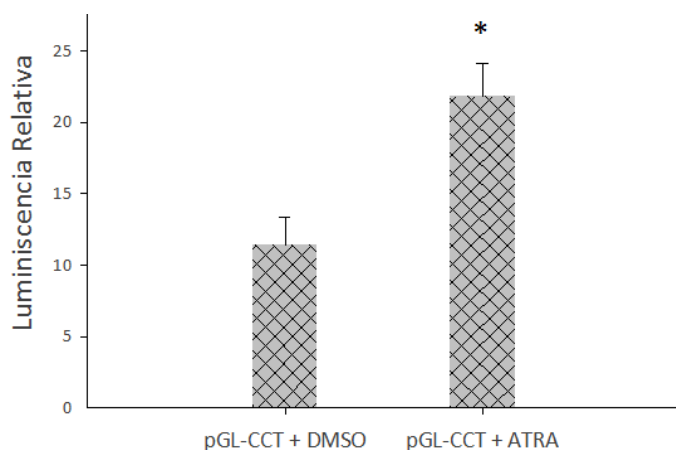


Figura 1.9. Prueba de la respuesta de la línea celular TM4 al agregado de ácido retinoico. Se transfectaron las células con el vector pGL3-CCT, se agregó ATRA (10 μ M) al medio de cultivo y 48 horas después se midió la luminiscencia. La actividad promotora fue significativamente mayor en presencia de ATRA en comparación con el control (DMSO). La construcción fue amablemente cedida por el Lic. Pablo Domizi y la Dra. Claudia Banchio (Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario).

En la figura 1.10 se muestra la respuesta a cada concentración de cada retinoide sobre la construcción -1324 P y en la figura 1.11 la respuesta de cada construcción del promotor de *Gpat2* frente a la presencia de 8 μ M de 9cisRA o de 20 μ M de ATRA. Además se probó si la presencia de ambos isómeros tenía un efecto sinérgico en el aumento de la actividad del promotor de *Gpat2*, obteniendo resultados negativos (resultados no mostrados).

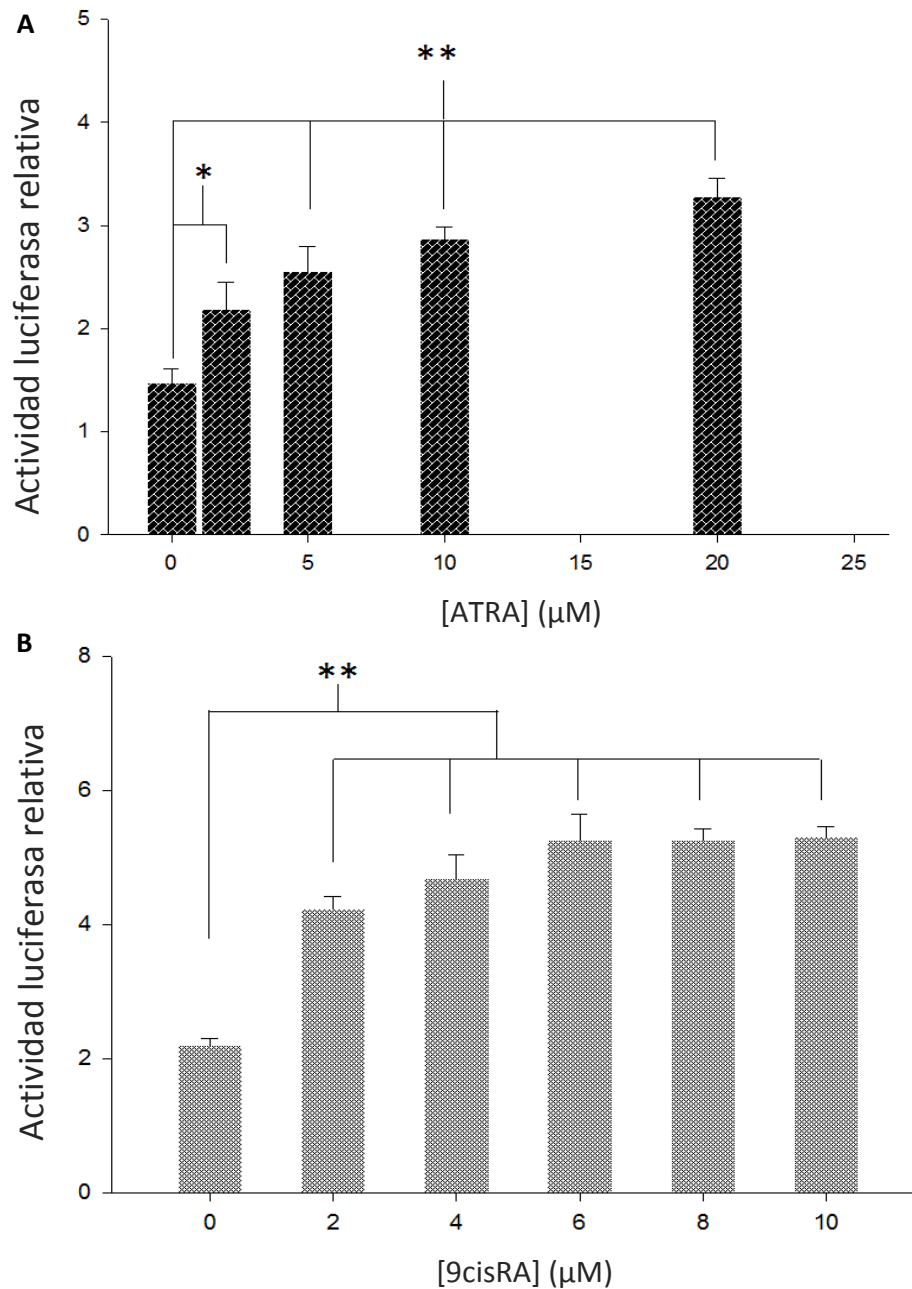
Figura 1.10. El ATRA y el 9cisRA aumentan la actividad del promotor de *Gpat2* de ratón.

Figura 1.10. Efecto de distintas concentraciones de ATRA (A) y 9cisRA (B) en la actividad de la construcción -1324 P del promotor de *Gpat2*. Se muestran los promedios de la actividad relativa al control interno pRL-TK de los duplicados de tres experimentos independientes \pm DE. Con asteriscos se indican las concentraciones que aumentan significativamente la actividad del promotor *Gpat2*, analizando los datos mediante ANOVA y test de Tukey. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Figura 1.11. La presencia de ATRA (20 μ M) o de 9cisRA (8 μ M) aumenta la actividad de las construcciones de distinto tamaño del promotor de *Gpat2* de ratón.

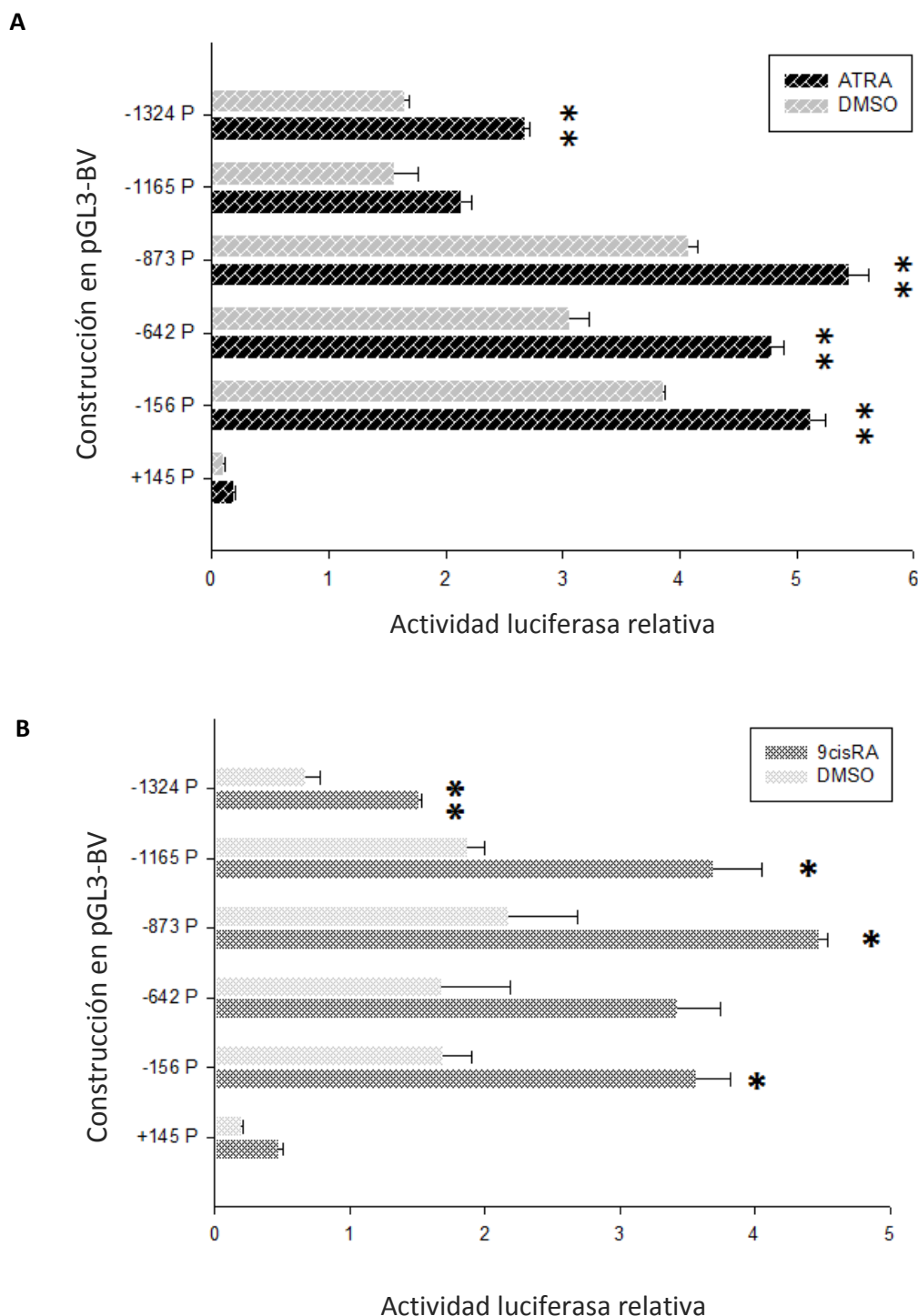


Figura 1.11. Efecto de ATRA (20 μ M) (A) y 9cisRA (8 μ M) (B) sobre la actividad de las construcciones del promotor de *Gpat2* de ratón. Esta hormona aumenta significativamente la actividad de todas las construcciones activas del promotor de *Gpat2*. Como control se evaluó la actividad del promotor en presencia del disolvente de la hormona (DMSO). Se muestran los promedios de la actividad relativa al control interno pRL-TK de los duplicados de tres experimentos independientes \pm DE. Con asteriscos se muestran los aumentos significativos en la actividad de la construcción del promotor de *Gpat2*. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ (Prueba t de Student).

En resumen, al analizar la actividad de construcciones del promotor de *Gpat2* inserto en un plásmido con luciferasa como gen reportero en presencia de RA, se observó para ambos isómeros bioactivos (9cisRA y ATRA) un aumento de hasta más del doble en la misma con respecto a los controles. Dado que en varios trabajos se ha demostrado la importancia del RA en la espermatogénesis [34, 37] y que las células de la línea germinal expresan los receptores para estas hormonas [37] es muy probable que este mecanismo de regulación opere *in vivo*. Teniendo en cuenta las secuencias consenso para la unión de los receptores de RA en la región analizada corriente arriba del inicio de la traducción, que el aumento en la actividad del promotor se detecta en todas las construcciones activas del promotor de *Gpat2* y considerando que la activación de la transcripción de un gen por medio de la interacción del complejo formado por ácido retinoico y sus receptores con el sitio de unión al ADN implica el reclutamiento de cofactores que actúan modificando la cromatina en cercanías del inicio de la transcripción [102, 103], se hipotetiza que el sitio consenso en donde se uniría el receptor de retinoides es el RARA ubicado en la posición +90 - +99 (ver Anexo 2). Para confirmar esto, serán necesarios experimentos de cambio en la corrida electroforética (EMSA, *Electrophoretic Mobility Shift Assay*).

Es interesante mencionar que en el trabajo de Raverdeau *et al.* se demuestra que el RA se produciría en espermatocitos preleptoténicos y que actuaría de manera autócrina para estimular la transcripción de *Stra8* y por lo tanto el inicio de la meiosis. Además, en este trabajo se propone la hipótesis de que el RA producido por espermatocitos en paquiteno estimularía parácrinamente a las espermatogonias para inducir su diferenciación [35]. **Por lo tanto, se podría proponer un mecanismo de activación de la expresión de *Gpat2* dependiente de RARA similar al propuesto para *Stra8*, en el cual el RA generado por los mismos espermatocitos sea el ligando de RARA/RXR, activando así la transcripción de *Gpat2* en el inicio de la meiosis.**

1.2.4. Análisis *in silico* de la regulación epigenética de la transcripción de *Gpat2* de ratón.

Las modificaciones epigenéticas, como la metilación del ADN, la modificación de H y el remodelado de la cromatina son eventos regulatorios de importancia en varios procesos biológicos, entre ellos la espermatogénesis. Varios genes en el testículo están regulados a través de estos mecanismos, lo que demuestra la influencia directa de la epigenética en ese proceso. Entonces, se buscó información *in silico* para investigar si la regulación de la transcripción de *Gpat2* podría estar también regulada por alguno de ellos.

Cuando se habla de metilación como mecanismo de regulación de la transcripción de un gen, se hace referencia a la metilación de citosinas (C) que están en los promotores o en las cercanías de primer exón de los genes en las denominadas “Islas CpG”[104]. Existen varios programas *online* que detectan estas regiones en secuencias de ADN, entre ellos la aplicación

Epigenomics que pertenece a NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/epigenomics>) y el sitio *MethPrimer*, del Departamento de Urología de UCSF (<http://www.urogene.org/cgi-bin/methprimer/methprimer.cgi>). En la figura 1.12 se muestra una captura de pantalla donde se observan las Islas CpG que se detectaron en *Epigenomics*. Al igual que muchas otras Islas CpG en otros genes [105, 106], las que se encontraron en el gen de *Gpat2* se encuentran en las cercanías del primer exón.

Figura 1.12. Análisis de la presencia de Islas CpG circundando el primer exón de *Gpat2* de ratón.

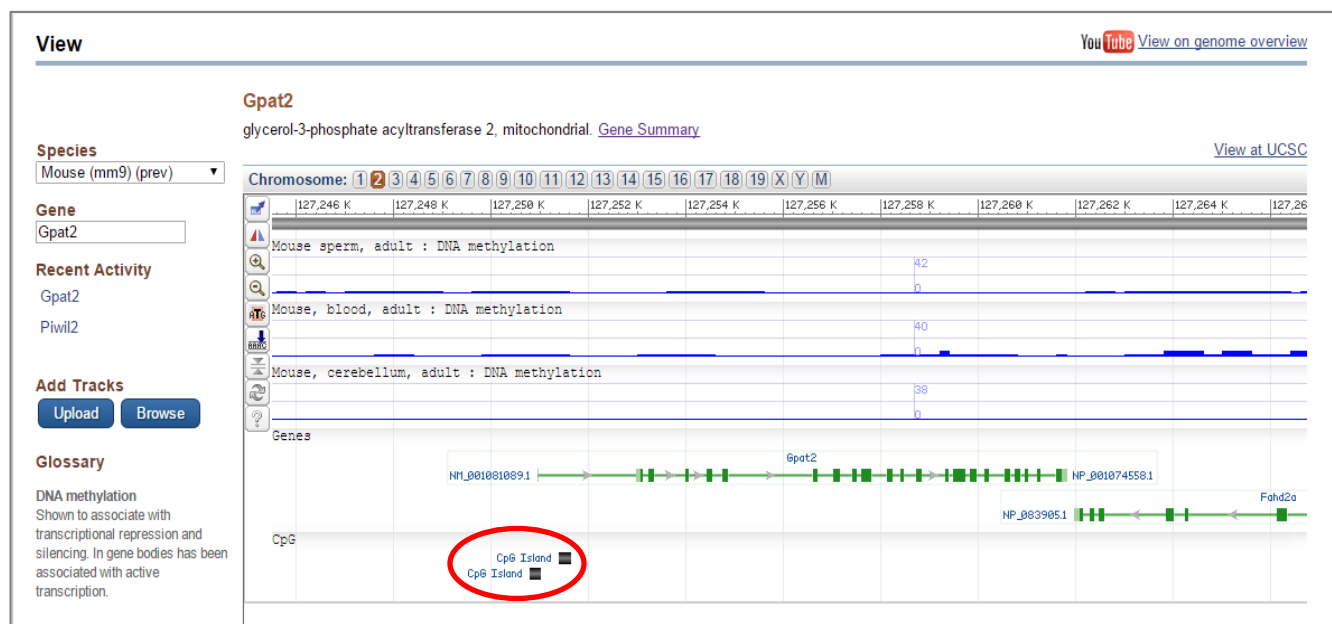


Figura 1.12. Análisis de la presencia de Islas CpG en el gen de *Gpat2* de ratón. Se muestra una captura de pantalla del análisis de *Gpat2* de ratón en *Epigenomics* de NCBI. Se detectaron dos posibles Islas CpG alrededor del primer exón (círculo rojo).

Esta información fue el puntapié para estudiar en detalle cuáles son las C susceptibles a ser metiladas y determinar si su estado de metilación influye y/o se correlaciona con el perfil de expresión de *Gpat2* durante la maduración testicular. Para el diseño de *primers* para amplificar la región CpG post tratamiento con bisulfito de sodio, se analizó la región promotora de *Gpat2* con el *software* disponible en el sitio web *MethPrimer*. Para evitar errores, se diseñaron *primers* para aparear por fuera de la isla predicha, que abarquen la mayor parte posible de las C de los pares CGs blanco de las metiltransferasas. En la figura 1.13 se muestra una captura de pantalla del análisis de la región promotora de ratón desde -1324 hasta el inicio de la traducción. En lugar de detectar dos Islas CpG como *Epigenomics*, detecta una gran Isla CpG que abarca ambas que va desde la posición -92 a +32. Algunos pares de *primers* sugeridos fueron adquiridos para amplificar por PCR la zona de interés post tratamiento con bisulfito de sodio.

Figura 1.13. Diseño de *primers* post tratamiento con bisulfito de sodio para analizar la metilación de la región circundante al primer exón de *Gpat2* de ratón.

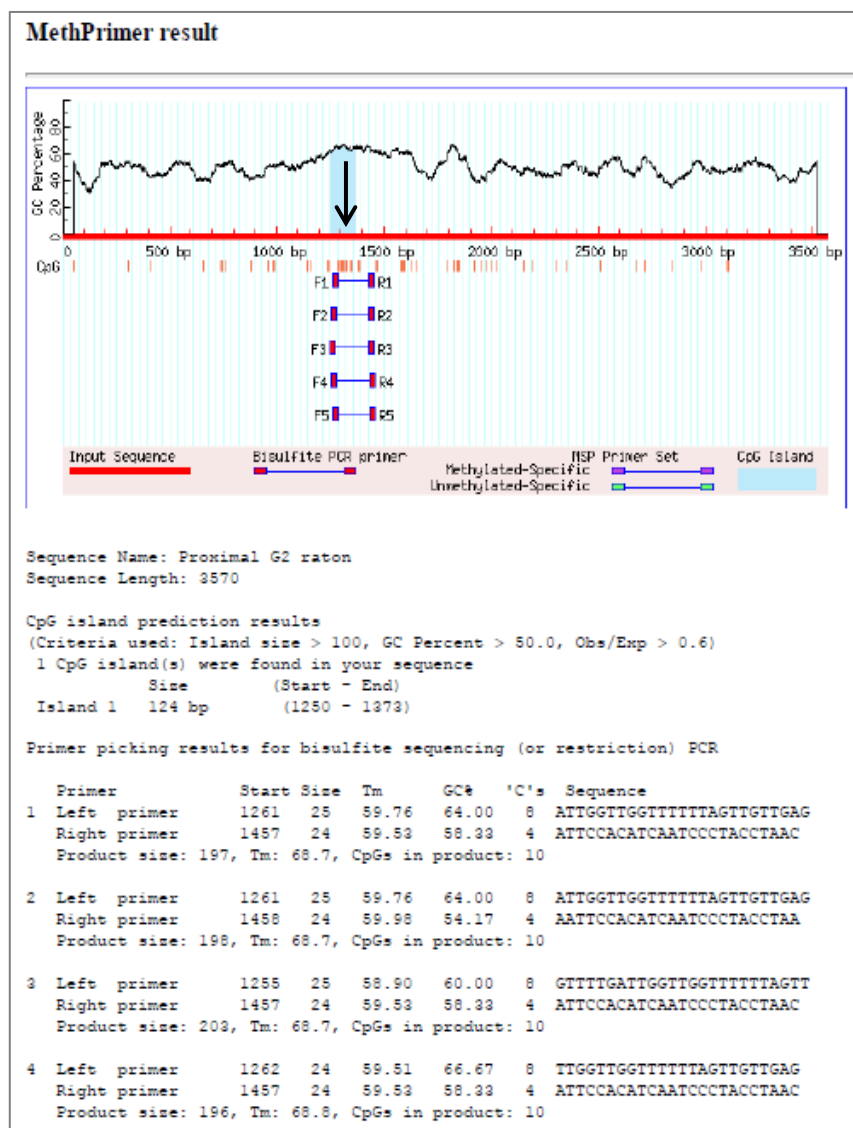


Figura 1.13. Análisis de la región circundante al primer exón de *Gpat2* de ratón con el sitio web *MethPrimer* para el diseño de *primers* para amplificar por PCR la Isla CpG post tratamiento con bisulfito de sodio del ADN genómico. En lugar de detectar dos Islas CpG como *Epigenomics*, detecta una gran Isla CpG que abarca ambas. Con una flecha se indica el inicio de la transcripción.

La modificación de H, como su acetilación/desacetilación, es otro tipo de regulación epigenética posible. Haciendo uso de la aplicación *GEO Profiles* de NCBI se encontró el histograma de la figura 1.14 al ingresar las palabras clave "*Gpat2 histone deacetylase*" (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geoprofiles/?term=Gpat2+histone+deacetylase>). Los niveles de expresión de *Gpat2* se obtuvieron del análisis del transcriptoma de células miocárdicas de ratones KO para el gen de la enzima HDAC2.

Figura 1.14. Resultado *in silico* que demuestra la influencia de la acetilación de H en la regulación de la transcripción de *Gpat2*.

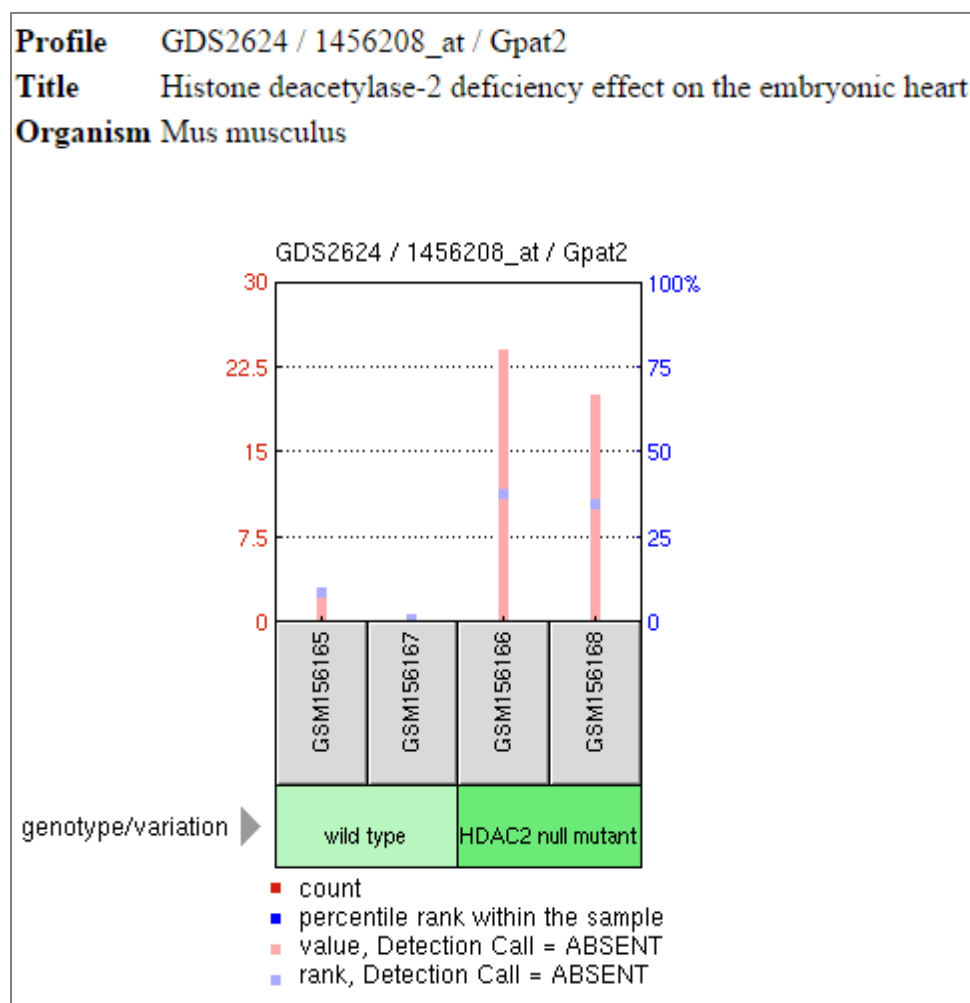


Figura 1.14. Resultado *in silico* que evidencia la regulación epigenética de la expresión de *Gpat2*. Captura de pantalla del resultado encontrado en *GEO Profiles* de NCBI bajo las palabras clave “*GPAT2 histone deacetylase*”. La expresión de *Gpat2* aumenta abruptamente en ratones KO para *Hdac2* en un tejido en donde no se expresa normalmente, como el músculo cardíaco.

Generalmente, la acetilación de H denota regiones transcripcionalmente activas, mientras que la hipoacetilación de las mismas ocurre en regiones transcripcionalmente inactivas [107]. Este proceso está regulado por las enzimas HATs, quienes activan la transcripción, y las HDACs, quienes silencian la transcripción génica [42]. Por lo tanto, si un organismo carece de HDAC, sus H permanecerían acetiladas y por lo tanto la transcripción estará activa, a menos en lo que respecta a nivel de apertura de la cromatina por acetilación de H. En la figura 1.14 se observa cómo al *knockear* la expresión de la HDAC2 en ratón se dispara la expresión de *Gpat2* en músculo cardíaco, un tejido donde normalmente no se expresa esta enzima. Por lo tanto, se decidió evaluar experimentalmente si tanto la metilación del ADN como la modificación de H afectan la transcripción de *Gpat2* en células de ratón.

1.2.5. Análisis *in vitro* de la regulación epigenética de la transcripción de *Gpat2* de ratón.

1.2.5.1. Efecto de la metilación *in vitro* del promotor de *Gpat2* de ratón sobre su actividad.

Con el objetivo de determinar si la metilación de las C de la Isla CpG de *Gpat2* de ratón afecta su actividad, se metiló *in vitro* a la construcción -156 P, que contiene a la Isla CpG predicha *in silico* y el gen reportero de la luciferasa. Para ello se usó la metiltransferasa SssI, que metila a todas las citosinas en el carbono 5 de todos los dinucleótidos 5'-CG-3'. Los plásmidos metilados (-156 P M) o sin metilar (-156 P s/M, control) fueron transfectados en la línea celular CHO-K1 en paralelo con el vector pRL-TK como control de transfección interno. En la figura 1.15 se muestran las luminiscencias relativas en cada caso, normalizadas al control interno.

Figura 1.15. La metilación de la región circundante al sitio de inicio de la transcripción de *Gpat2* disminuye la actividad de su promotor.

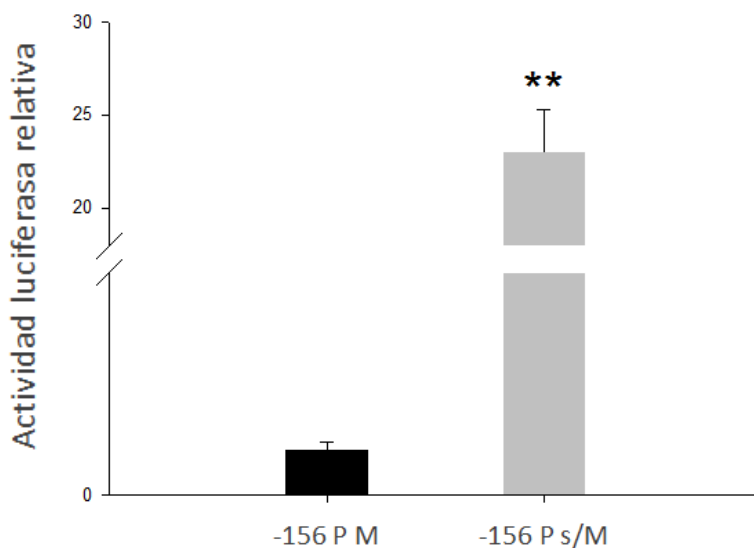


Figura 1.15. Efecto de la metilación sobre la actividad del promotor de *Gpat2*. Se muestran los promedios de los duplicados de la luminiscencia relativa de la construcción -156 P metilada (-156 P M) o sin metilar (-156 P s/M, control) de dos experimentos independientes. ** $p < 0,01$ (Prueba t de Student).

Como se observa en la figura 1.15, la metilación afecta sensiblemente la actividad del promotor de *Gpat2*, ya que la actividad luciferasa relativa de la construcción -156 P M se reduce en un 90% con respecto a la actividad del control (-156 P s/M). Esto demuestra que la metilación de la Isla CpG encontrada regula la expresión de *Gpat2*.

1.2.5.2. Efecto de la inhibición de metilación y de la desacetilación sobre la expresión de *Gpat2* en la línea celular de ratón RAW 264.7.

Para analizar el efecto de la inhibición de la metilación y de la inhibición de la desacetilación de H en células en cultivo se emplearon las drogas 5-aza-2'-desoxicitidina (DAC) y Tricostatina A (TSA), respectivamente. La droga DAC es un análogo a la desoxicitidina y se incorpora al ADN durante su síntesis, con la particularidad de unirse irreversiblemente a la enzima metiltransferasa, inhibiéndola [108]. La droga TSA es un inhibidor no competitivo reversible de la actividad H desacetilasa en células de mamífero en cultivo a concentraciones nanomolares [109]. Para este experimento se utilizó la línea celular de ratón RAW 264.7, que presenta bajos niveles basales de expresión de *Gpat2*. La misma se incubó con DAC, TSA, DAC+TSA o DMSO (control). Se midió el nivel de transcripción de *Gpat2* por qPCR y se lo normalizó al gen *housekeeping Gapdh* (Figura 1.16).

Figura 1.16. La inhibición de la metilación del ADN y la inhibición de la desacetilación de H aumentan la expresión de *Gpat2* en la línea celular RAW 264.7.

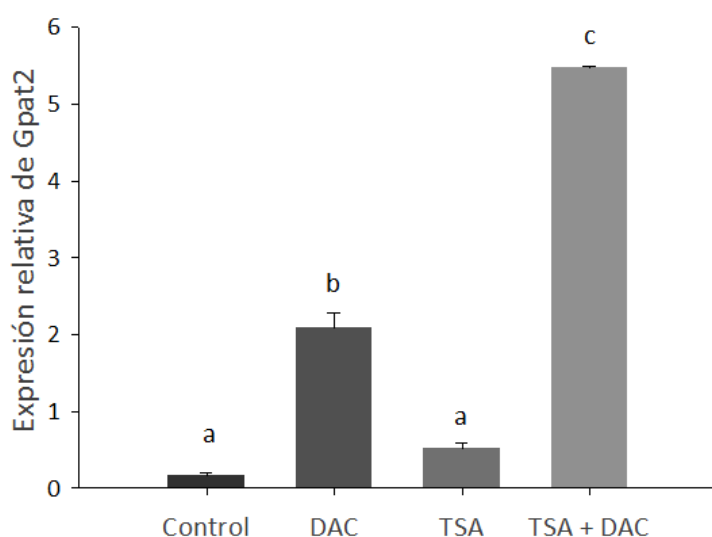


Figura 1.16. Expresión de *Gpat2* relativa al gen *housekeeping Gapdh* en presencia de 5-aza-2'-desoxicitidina (DAC), Tricostatina A (TSA), TSA+DAC o DMSO (control) en la línea RAW 264.7. Se muestran los niveles de expresión normalizados de *Gpat2* \pm DE de las réplicas de dos experimentos independientes. Cada medida se realizó por triplicado. Letras iguales indican igualdad estadística y letras distintas indican diferencia estadística con una significancia $p < 0,01$ (ANOVA y test de Tukey). Concentraciones usadas: DAC: 2 μ M, TSA: 500 nM.

En la figura 1.16 se observa que el aumento en la expresión de *Gpat2* producido por DAC es significativo con respecto al control y al tratamiento con TSA sólo y que el aumento en la expresión de este gen producido por la combinación de DAC y TSA es mayor que el aumento producido por estas drogas cuando se agregan por separado. Es decir, la DAC y la TSA actúan en forma sinérgica sobre la expresión de *Gpat2*, efecto ya reportado para otros genes [110]. Entonces, se podría afirmar que la hipermetilación en la Isla CpG de este gen es dominante sobre la actividad HDAC en el mantenimiento de la represión génica, por lo menos en esta línea celular. Sin embargo, la actividad HDAC cobraría importancia cuando los niveles de metilación se reducen.

1.2.6. Análisis *in vivo* de la regulación epigenética de la transcripción de *Gpat2* de ratón.

Con el objetivo de determinar si el nivel de metilación de la Isla CpG encontrada tiene relevancia *in vivo* y si el mismo correlaciona con el perfil de expresión de *Gpat2* observado durante la maduración testicular posnatal, se trató con bisulfito de sodio al ADN genómico de testículo de ratón de distintas edades para conocer, si las hubiera, cuáles son las citosinas que al metilarse reprimirían la transcripción de *Gpat2*. Para ello, se extrajo ADN de testículo entero de 7 dpp y de células germinales aisladas de testículos de 11, 15 y 30 dpp, se trató con bisulfito de sodio, haciendo uso de los primers diseñados con *Methprimer* se amplificó por PCR la región CpG de interés y luego se clonó el producto en el vector pGEM-T Easy para su secuenciación (6-10 clones de cada edad). En la figura 1.17 se muestra un esquema de los pares CG comprendidos en esa región indicando el estado de metilación promedio entre todos los clones para cada posición para cada edad. Es interesante destacar que a los 15 dpp, cuando por qPCR se observa un máximo en el contenido de ARNm en testículo entero, el promotor de *Gpat2* esté completamente metilado. Sin embargo a los 11 dpp se observó una desmetilación masiva en el mismo. Además, como se muestra en la figura 1.17, a los 30 dpp se obtuvieron dos tipos de clones: con el promotor de *Gpat2* desmetilado (37 % de los clones, con un 10 % o menos de pares CG metilados) y con el promotor de *Gpat2* metilado (63 % de los clones, con un 80 % o más de pares CG metilados). Como cada clon obtenido por PCR de la región CpG proviene del ADN genómico tratado con bisulfito de sodio de una célula, el análisis de la proporción de clones con el promotor de *Gpat2* metilado o sin metilar es un reflejo de la proporción de células germinales con el promotor de *Gpat2* metilado o sin metilar a esa edad.

Figura 1.17. El estado de metilación del promotor de *Gpat2* *in vivo* es mínimo a los 11 dpp.

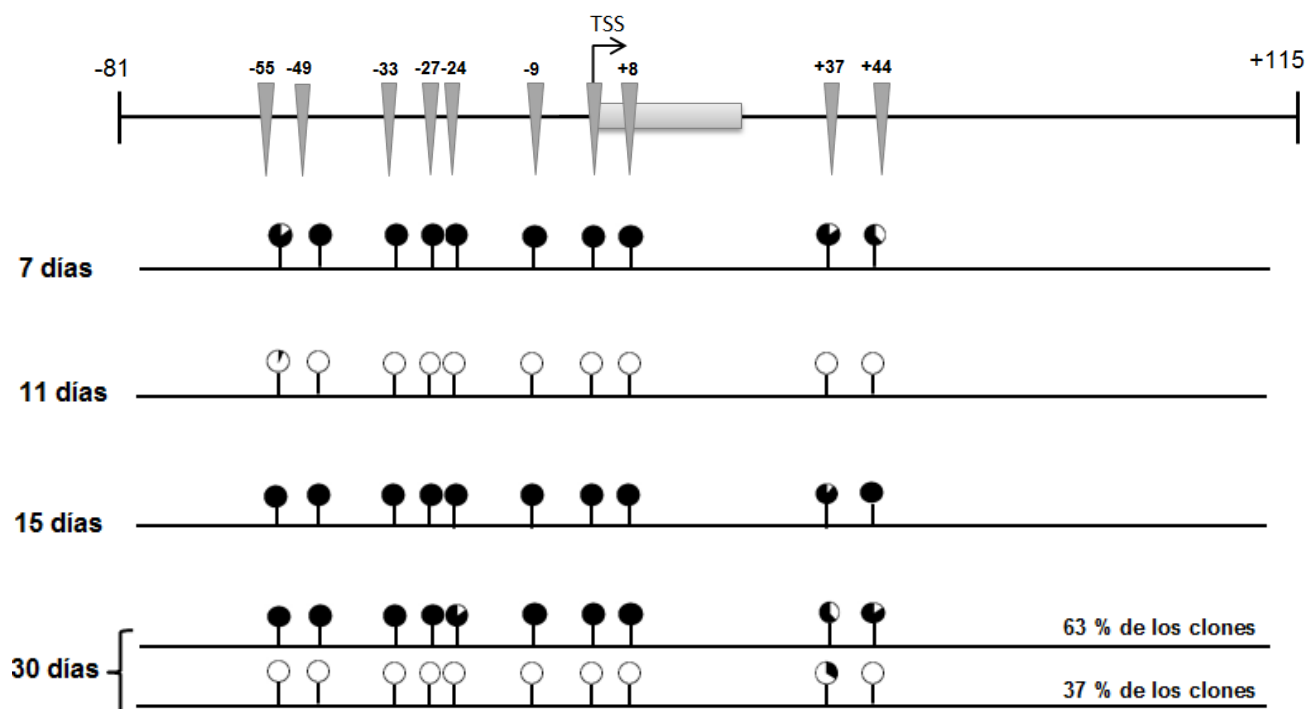


Figura 1.17. Evaluación del estado de metilación de la región circundante al inicio de la transcripción de *Gpat2* en células de testículo de ratón de distintas edades. Se extrajo ADN de testículo entero de ratones de 7 dpp o de células germinales de ratones de 11, 15 y 30 dpp, se trató con bisulfito de sodio, se amplificó por PCR y se clonó la región de 196 pb que contiene a la Isla CpG y se secuenció. Se muestra para cada edad la proporción promedio de metilación de esa posición teniendo en cuenta a todos los clones. Cada círculo representa una C de un par CG. Un círculo negro completo indica 100 % de metilación de esa posición entre todos los clones, un círculo blanco indica 0 % de metilación de esa posición entre todos los clones y círculos parcialmente pintados indican proporciones intermedias de metilación. Dado que a los 30 dpp se obtuvieron dos tipos de clones, éstos se agruparon según su estado de metilación para dejar en claro la existencia de dos poblaciones en lo que respecta al nivel de metilación del promotor de *Gpat2*. Por encima se muestra un esquema de la región promotora analizada y la ubicación de los pares CG se muestra con triángulos invertidos. TSS: sitio de inicio de la transcripción (+1).

Nuestros resultados experimentales, con el sustento de la información obtenida a partir de datos *in silico*, indican indudablemente una regulación epigenética de la transcripción de *Gpat2*. El efecto de la acetilación/desacetilación de H como mecanismo regulatorio de la expresión de *Gpat2* se comprobó *in vitro* y el efecto de la metilación/demetilación de la Isla CpG de *Gpat2* se corroboró tanto *in vitro* como *in vivo*. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos *in vivo*, se observó que a los 11 dpp toda la región CpG analizada se encontraba hipometilada. Sin embargo, a los 15 dpp, momento en el que se observa un abrupto aumento en la cantidad de ARNm de *Gpat2* en testículo entero por qPCR (y también visto *in silico*), toda la Isla CpG se encuentra metilada. Entonces hipotetizamos que la transcripción de *Gpat2* debe

de comenzar después de los 11 dpp y su mensajero debe ser lo suficientemente estable como para acumularse hasta los 15 dpp. Además, a los 30 dpp se obtuvieron dos tipos de clones con respecto a su estado de metilación: un 37 % de los clones resultaron hipometilados y un 63 % hipermetilados. Como cada clon proviene de una célula individual, esta proporción de clones da cuenta de la proporción de células germinales cuya Isla CpG de *Gpat2* se encuentra hipo o hipermetilada, lo que nos permite postular que existen dos poblaciones de células germinales a los 30 dpp en relación al nivel de metilación de la misma: una mayoritaria de alto grado de metilación y una minoritaria de bajo grado de metilación. Estos porcentajes de clones correlacionan con los datos de expresión de ARNm en cuanto a las proporciones de células germinales que son positivas y negativas en la HIS (Figura 1.4) y podrían explicar el patrón de expresión *on-off* para este gen.

Si bien los mecanismos de regulación de la transcripción por transactivación y los epigenéticos parecieran operar independientemente, **varios autores han demostrado que el RA actúa de manera coordinada con procesos epigenéticos para regular la expresión génica** [111, 112]. El modelo actual de regulación por RARs explica que en ausencia de ligando, el heterodímero RAR-RXR se une al elemento de respuesta RARE en el promotor del gen regulado por RA y recluta correpresores que a su vez reclutan complejos de alto peso molecular que poseen actividad HDAC. Una vez que se une al RA, el heterodímero RAR-RXR cambia de conformación liberando a los correpresores, permitiendo el reclutamiento de coactivadores, quienes a su vez reclutan grandes complejos con distintas actividades enzimáticas, como HAT, H-metiltransferasas (HMT), H-demetilasas (HDM) y ATPasas ADN-dependientes [102]. Todos estos complejos alteran la estructura de la cromatina alrededor de la región promotora de los genes blanco y crean marcas o sitios de unión que forman el llamado “código de H”, que es leído por proteínas específicas y cuyas consecuencias pueden ser diversas [102, 113, 114]. Por ejemplo, este código coordina el reclutamiento de HAT, HMT o HDM adicionales para crear una cromatina aún menos compacta. Además también dirige el reclutamiento de remodeladores de la cromatina, que usan la energía del ATP para reposicionar a los nucleosomas, dejando así a la región promotora libre de nucleosomas. Luego los RAR-RXR activados reclutan al resto de la maquinaria necesaria para el inicio de la transcripción (ARN polimerasa II y factores generales de inicio de la transcripción) [102]. Además, el efecto del RA a nivel epigenético no sólo se ha demostrado a nivel de H, sino también a nivel de metilación del ADN, ya que se ha observado *in vitro* que la presencia de ATRA regula el estado de metilación de promotores de ciertos genes relacionados con la apoptosis [115, 116] e *in vivo* que la presencia de ATRA disminuye el estado de metilación global de todo el ADN [117]. Varios de estos autores han demostrado que el nivel de transcripción y traducción de las enzimas de la familia de las DNMTs disminuye en presencia de ATRA [111, 116], proponiendo al RA como un regulador del nivel de expresión de las enzimas que se encargan de la metilación *de novo* del ADN (DNMT3) o del mantenimiento de las marcas epigenéticas luego de la replicación (DNMT1). El mecanismo por el cual se lleva a cabo no está aún esclarecido.

Por lo tanto, **todos estos procesos podrían estar actuando de manera coordinada para regular la expresión de *Gpat2* in vivo**. La sinergia observada cuando se utilizan DAC+TSA en la transcripción de *Gpat2* demostró que la desacetilación de H, además de la metilación de las C, es un importante represor de su expresión. Es posible entonces que, en ausencia de RA, el heterodímero RARA-RXR al unirse al sitio RARE reclute correpresores con actividad HDAC, inhibiendo la transcripción de *Gpat2*. Por lo tanto, en presencia de RA (autócrino o parácrino) se induciría una hipometilación general y específicamente la hipometilación de la Isla CpG que circunda al primer exón de *Gpat2*, liberando de grupos metilo inhibidores a las C de la región adyacente al inicio de la transcripción. Luego, el RA al unirse al complejo RARA-RXR, reclutarían complejos que acetilarían las H circundantes y que a su vez reclutarían los elementos de transcripción basales necesarios para activar la transcripción de *Gpat2*. Por lo tanto, **este mecanismo de represión/activación de la transcripción explicaría los resultados observados, relacionando la acción del RA y de modificaciones epigenéticas como reguladores de la transcripción de *Gpat2***.

1.3. SILENCIAMIENTO IN VIVO DE *Gpat2* EN TESTÍCULO DE RATÓN. IMPORTANCIA DE *Gpat2* EN LA ESPERMATOGÉNESIS.

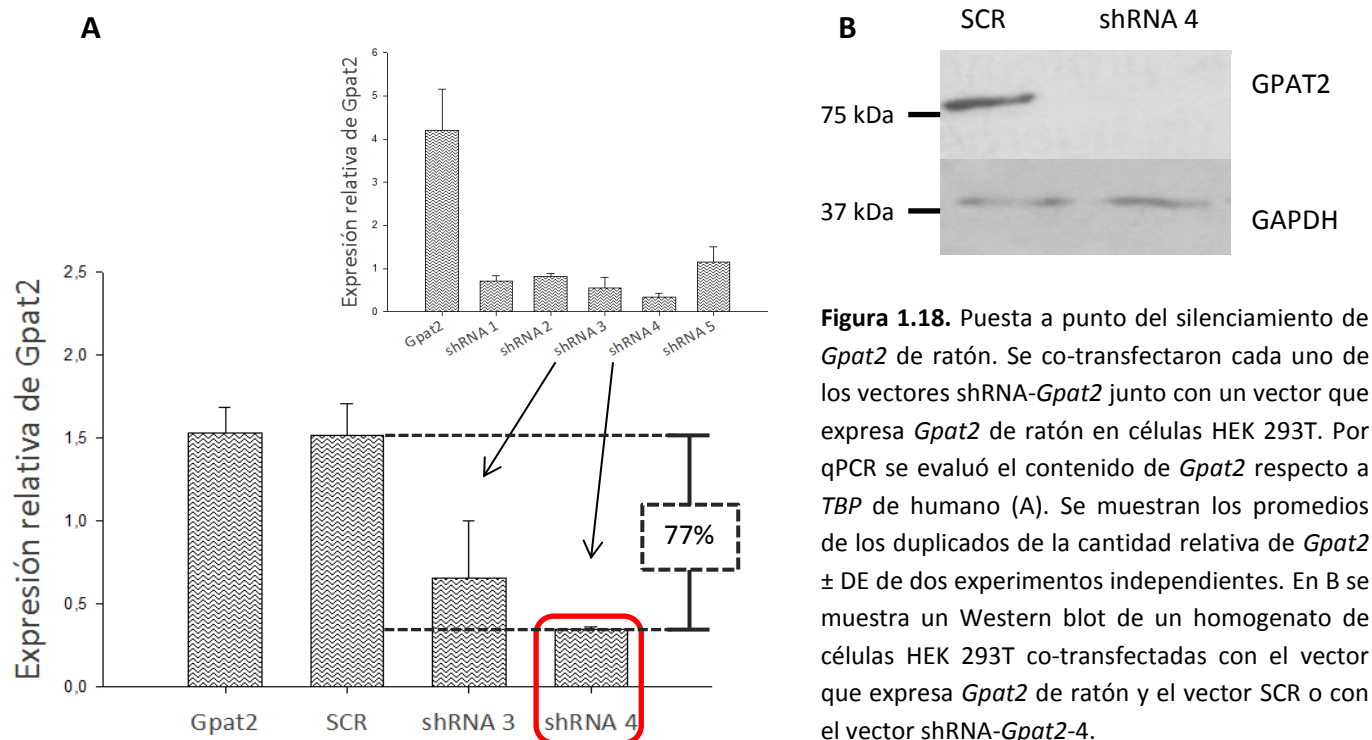
1.3.1. Puesta a punto de la técnica.

1.3.1.1. Selección del shRNA que silencia más eficientemente la expresión del ARNm de *Gpat2*.

Cinco vectores que portan un shRNA contra *Gpat2* más un control SCR fueron adquiridos y, para evaluar cuál de ellos silenciaba más la expresión de *Gpat2*, se co-transfectaron células HEK 293T con un vector de expresión pcDNA 3.1 con el ADNc codificando a *Gpat2* de ratón [57] y con cada uno de los vectores silenciadores por separado. Luego de 48 horas, se extrajo el ARN y se midió por qPCR la expresión de *Gpat2*. En el recuadro de la figura 1.18 se muestran los niveles de expresión de *Gpat2* en la línea HEK 293T luego de las co-transfecciones con los distintos vectores que portan el shRNA. Una vez elegidos los dos vectores que más silenciaban la expresión de *Gpat2* (shRNA 3 y 4), se repitió la co-transfección de los mismos con *Gpat2*, en paralelo con el vector control SCR y *Gpat2* (Figura 1.18.A) y la expresión de *Gpat2* se midió por qPCR. Como se observa en la figura 1.18.A, el vector shRNA que más eficientemente silenció *Gpat2* fue el 4 (77% de silenciamiento con respecto a la expresión de *Gpat2* en la muestra co-transfectada con SCR). Además, el silenciamiento de *Gpat2* se testeó a nivel de proteína: se co-transfectaron células HEK 293T con el vector que expresa *Gpat2* y el vector SCR o con el vector que expresa *Gpat2* y con shRNA-*Gpat2*-4 y 48 horas después se analizaron por Western blot, revelando con anti-GPAT2 y con anti-GAPDH como control de carga. En la figura 1.18.B se observa que la proteína GPAT2 no se pudo detectar en la muestra co-transfectada con el vector

silenciador, aunque sí en la co-transfectada con el vector SCR. Se siguió trabajando con el vector shRNA-*Gpat2*-4 para construir un lentivirus silenciador de *Gpat2* *in vivo*.

Figura 1.18. Puesta a punto *in vitro* del silenciamiento de *Gpat2* de ratón.



1.3.1.2. Prueba de sobrevida y fertilidad después de la inyección testicular.

Previo a la inyección con lentivirus, se realizaron pruebas de inyección intratesticular en ratones de 11 dpp con una solución de PBS estéril y el colorante vital azul de tripán (20 mg/ml concentración final). Se eligió esta edad para la inyección con el objetivo de inocular los lentivirus antes del pico de expresión de *Gpat2* observado a los 15 dpp. Para ello, 4 ratones fueron anestesiados, se realizó una incisión en la cavidad abdominal, los testículos se colocaron por fuera de la misma y se inyectaron ambos (Figura 2 de Materiales y Métodos). Luego de la sutura del abdomen, los ratones se devolvieron a la jaula con su madre y se monitorearon diariamente, teniendo en cuenta la presencia de signos de dolor y prestando especial atención al descenso normal de los testículos. No se observaron signos de dolor o malestar y al cabo de los diez días posteriores de la inoculación ya se podía ver el descenso normal de los testículos.

Dos semanas después de la inyección (a los 25 dpp), se sacrificaron dos ratones para realizar cortes histológicos. En los mismos se puede observar la espermatogénesis normal de un testículo que aún no ha alcanzado la madurez sexual, en donde se observan principalmente espermátides redondas (Figura 1.19). Después de alcanzar la pubertad (a los 40 dpp), los otros dos ratones se colocaron en jaulas con 2 hembras cada uno para evaluar si la inyección traía

problemas en su capacidad reproductiva. Se observó que los ratones se reproducían normalmente ya que al cabo del mes de haberse reunido con hembras empezaron a tener cría. El número de crías que cada uno tuvo estuvo también dentro de los parámetros normales (entre 6 y 10 crías por parto). Entonces, dado que la técnica empleada para la inoculación de testículos no mostró signos de haber afectado la sobrevivencia del ratón ni su capacidad fértil, se procedió a inocular testículos de ratón con lentivirus que silencien la expresión de *Gpat2* o con el lentivirus *scramble* (a partir de ahora SH-*Gpat2* y SCR, respectivamente).

Figura 1.19. Corte histológico de testículos de ratones inoculados con PBS y Azul de tripán para evaluar el efecto del procedimiento de la inoculación testicular a nivel tisular.

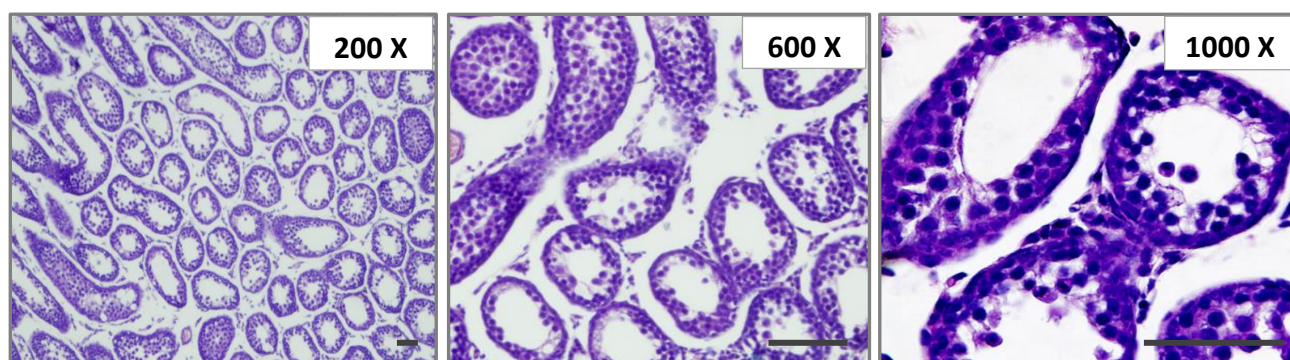


Figura 1.19. Corte histológico de testículos de ratones de 25 dpp inoculados con PBS y Azul de tripán para evaluar el efecto del procedimiento de inyección a nivel tisular. Se analizaron 4 cortes de cada testículo. Los cortes se tiñeron con hematoxilina-eosina. Se observa la presencia de principalmente espermátides redondas. Barras de escala: 50 μ M.

1.3.2. Silenciamiento de *Gpat2* *in vivo* y sus consecuencias.

1.3.2.1. Evaluación histológica del efecto de silenciamiento de *Gpat2* *in vivo*.

Una vez purificados los lentivirus y calculado el número de TU, si la concentración fue favorable (entre 10^7 y 10^8 TU/ml), se procedió a la inyección de ratones macho. Se inyectaron 4 ratones de 11 dpp con el lentivirus SH-*Gpat2* (construido con el shRNA 4) y 4 ratones con el lentivirus SCR. Se inyectaron ambos testículos, cada uno con aproximadamente 60 μ l de la suspensión de lentivirus-azul de tripán. Luego de 30 días post inyección (41 dpp) los ratones fueron sacrificados, los testículos fueron extirpados y se realizaron tinciones con hematoxilina-eosina (HE) para observar la presencia o no de anomalías en la espermatogénesis e IHQ para confirmar el silenciamiento de *Gpat2*. En la figuras 1.20, 1.21 y 1.22 se muestran las imágenes obtenidas más representativas de cada tratamiento. En la figura 1.20 se muestran cortes de testículos provenientes de ratones SH-*Gpat2* y ratones SCR teñidos con HE. En el caso de los cortes de testículos de ratones SH-*Gpat2* (en 3 de los 4 ratones estudiados) se destaca la presencia de una considerable proporción de túbulos seminíferos en donde la espermatogénesis está detenida, ya que no se observan espermatozoides, sino un

empobrecimiento en células germinales en división. La proporción de túbulos afectados fue variable entre los ratones inyectados con el lentivirus SH-*Gpat2*: desde cortes de testículo con aproximadamente un 30 % de túbulos afectados hasta testículos cuya arquitectura tisular se encontraba totalmente alterada (Figura 1.22). Esto podría explicarse teniendo en cuenta que la penetrancia del lentivirus durante la inoculación puede no ser homogénea en todo el tejido, entonces el silenciamiento de *Gpat2* es posible que no se vea reflejado en todos los túbulos seminíferos. En el caso de los cortes de testículos SCR, se observa una espermatogénesis normal en prácticamente toda la extensión del corte de testículo y, como se observa en la figura 1.20, claramente se advierte la presencia de espermatozoides.

Las figuras 1.21 y 1.22 muestran la IHQ para la detección de la proteína GPAT2. En los cortes de testículos SCR, la imagen es análoga a la obtenida por IHQ a los 40 dpp (Figura 1.5). En cortes de testículos de ratones SH-*Gpat2* (en 3 de los 4 ratones analizados) se observa una señal muy débil o nula para GPAT2. Como se dijo antes, en uno de los testículos analizados además de no haber podido detectar a GPAT2 por IHQ, la arquitectura tisular estaba totalmente alterada (Figura 1.22). Posiblemente, en este ejemplar la penetrancia del lentivirus haya sido mayor que en el resto de los testículos, lo que explicaría la extensión del daño del parénquima testicular observado por histología.

Figura 1.20. El silenciamiento de *Gpat2* *in vivo* en testículo de ratón afecta la espermatogénesis.

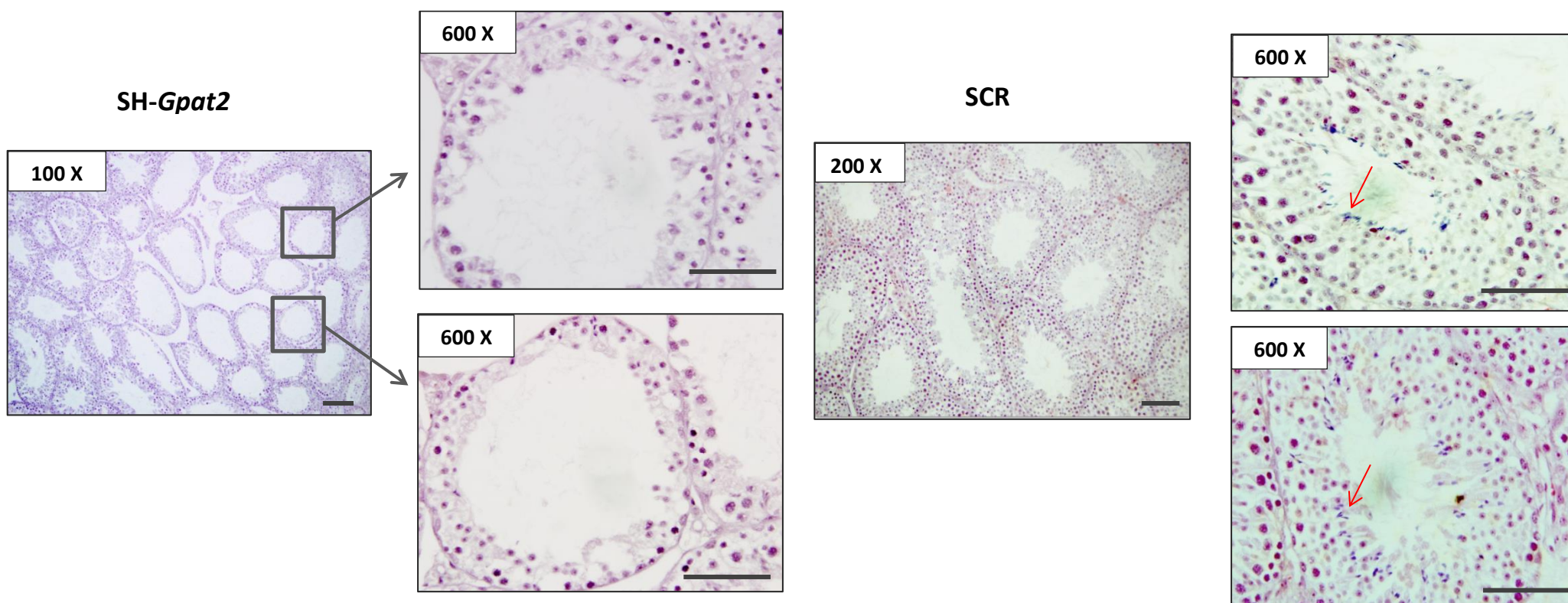


Figura 1.20. El silenciamiento de *Gpat2* en testículo de ratón afecta la espermatogénesis. Histologías representativas de cortes histológicos provenientes de dos experimentos independientes (8 ratones inyectados en total) mostrando las consecuencias de la inyección intratesticular en ratones de 11 dpp de lentivirus que silencian *Gpat2* (SH-*Gpat2*, N=4) o lentivirus con una secuencia *scramble* (SCR, N=4). En cada caso se analizaron 6 cortes histológicos. Un mes después de la inyección los ratones fueron sacrificados, los testículos removidos, fijados en solución de Bouin, incluidos en tacos de parafina y cortados en secciones de 10 μ m. Los mismos fueron teñidos con hematoxilina-eosina. Los aumentos de cada foto se indican en la esquina superior izquierda de las mismas. Las flechas rojas indican espermatozoides. Barras de escala: 50 μ M.

Figura 1.21. El silenciamiento de *Gpat2* *in vivo* en testículo de ratón afecta la espermatogénesis. Evaluación de la presencia de la proteína GPAT2 por IHQ de cortes de testículos inyectados con lentivirus SH-*Gpat2* o SCR.

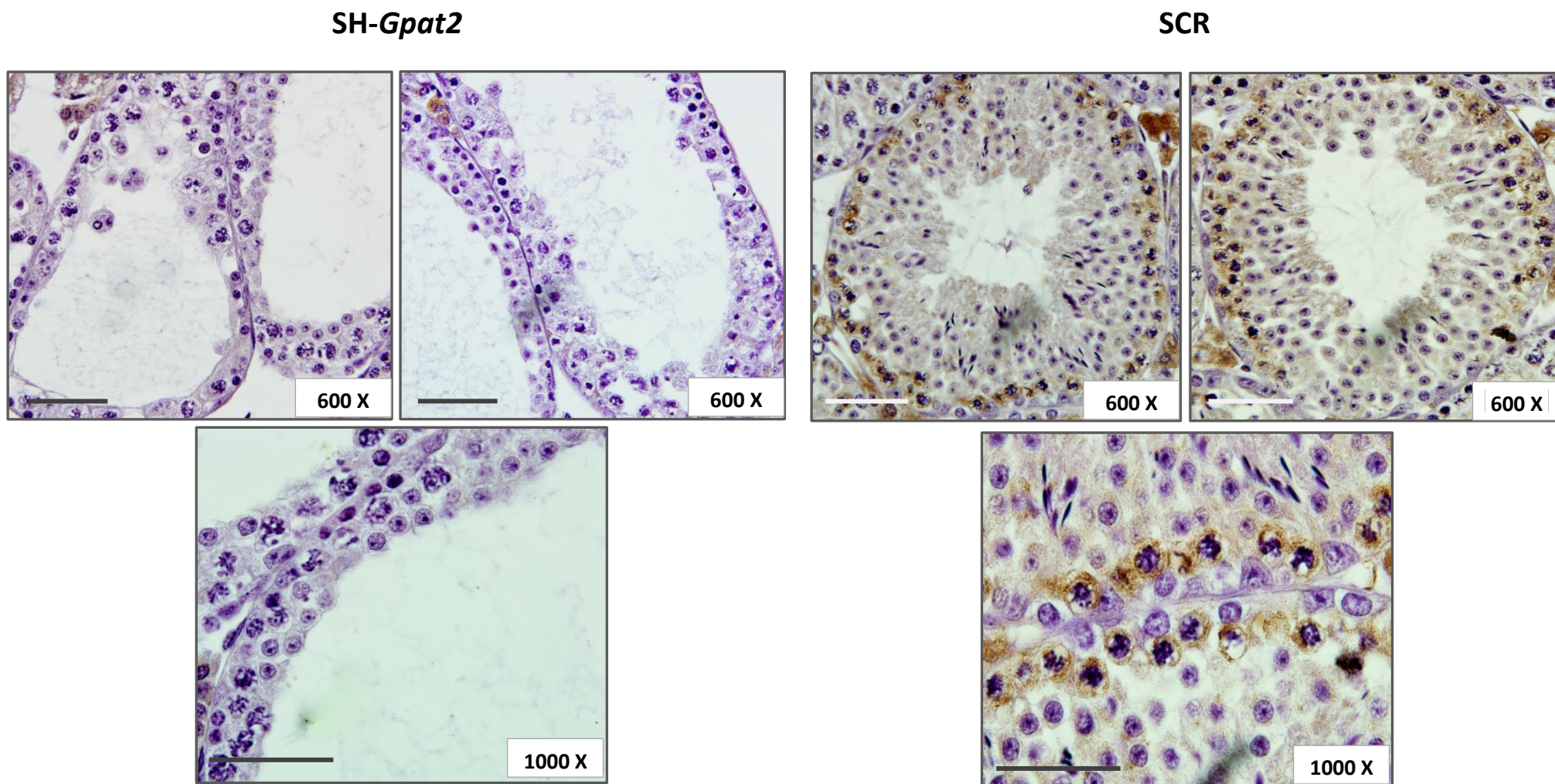


Figura 1.21. Evaluación de la presencia de GPAT2 por IHQ en cortes de testículos inyectados con lentivirus SH-*Gpat2* o SCR. Se muestran dos IHQ representativas de los resultados obtenidos de dos experimentos en los que se inyectaron 4 ratones de 11 dpp con lentivirus SH-*Gpat2* y 4 ratones con un lentivirus SCR en total. Se analizaron las IHQ de 6 cortes histológicos de los testículos de cada ratón. Los núcleos se contratiñeron con hematoxilina. Los aumentos de cada foto se indican en la esquina inferior derecha de las mismas. Barras de escala: 50 μ M.

Figura 1.22. Arquitectura tisular afectada de un testículo de ratón inyectado con lentivirus SH-*Gpat2*.

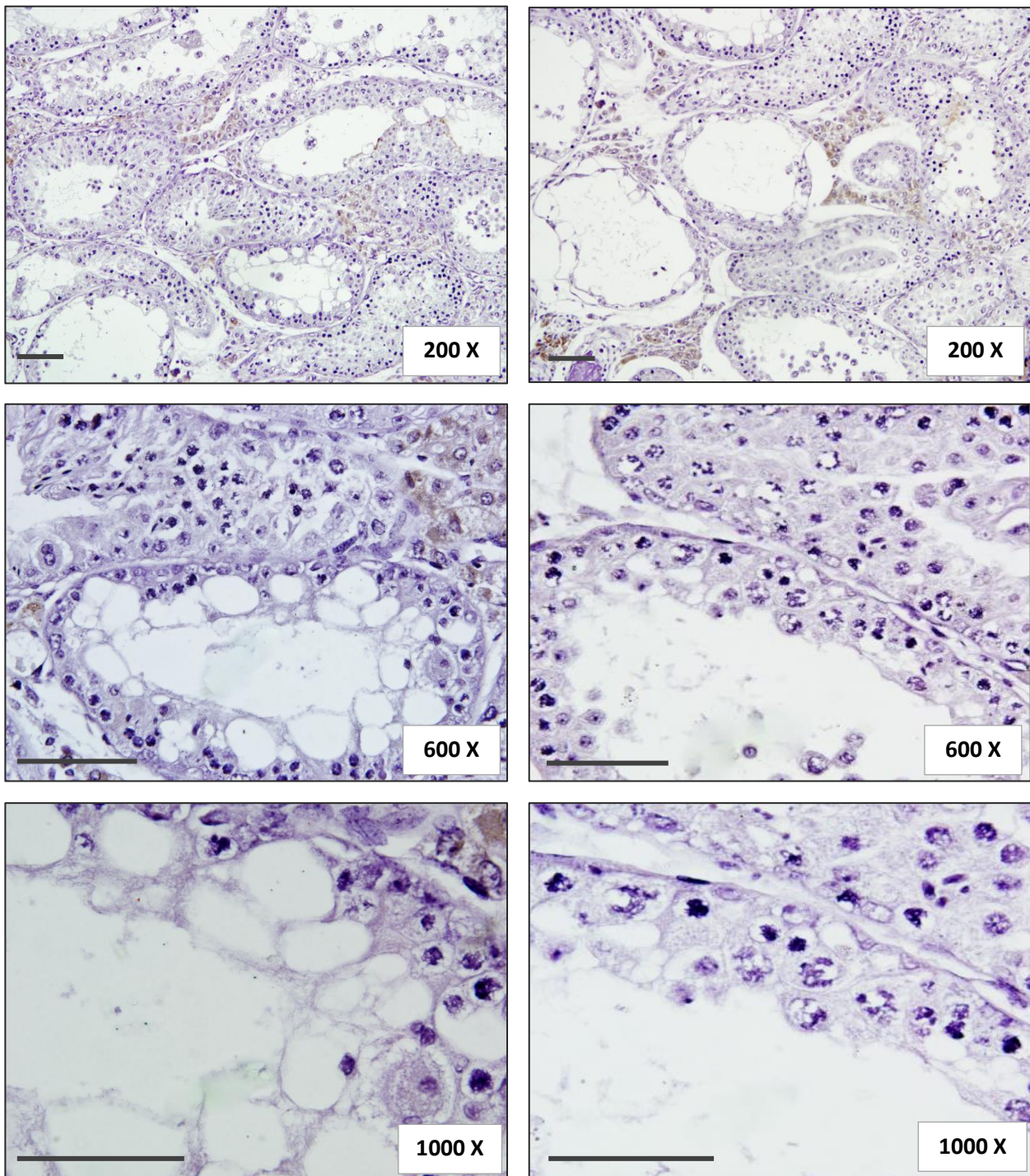


Figura 1.22. Arquitectura tisular totalmente afectada de un testículo inyectado con partículas lentivirales SH-*Gpat2*. IHQ de uno de los testículos de ratones SH-*Gpat2*. La señal para GPAT2 es nula o muy tenue (probablemente artefactos de la preparación histológica). Los núcleos se contratiñeron con hematoxilina. Se muestran 3 aumentos distintos, indicados en la parte inferior derecha de cada fotografía. Barras de escala: 50 μ M.

1.3.2.2. Evaluación del efecto de silenciamiento de *Gpat2* *in vivo* en la expresión de genes marcadores de la espermatogénesis y en la capacidad reproductiva.

Se inocularon los testículos de nueve ratones Balb/c de 11 días con partículas lentivirales SH-*Gpat2* y cinco con partículas SCR. Una vez que alcanzaron la madurez sexual (un mes post inyección, 41 dpp) se colocaron en jaulas separadas con 2 hembras Balb/c adultas cada uno, con agua y alimento *ad libitum*. Los mismos se monitorearon diariamente y se registró el número de crías que tuvo cada hembra. Luego de que cada una tuviera 3 camadas, los ratones se sacrificaron y se procedió a realizar los cálculos estadísticos. Como se observa en la figura 1.23, la cantidad de crías que tuvo el grupo de ratones SCR por parto fue significativamente mayor que la cantidad que tuvo el grupo SH-*Gpat2* en la primera camada y luego, si bien no se alcanzaron valores significativos, se mantiene esta tendencia. Es altamente probable que esto se deba por un lado, a que el silenciamiento con lentivirus sea más efectivo en el corto plazo y que aquellas células que no hayan sido transducidas logren reemplazar a las infectadas en el transcurso de varios ciclos espermatogénicos, reestableciendo entonces paulatinamente una espermatogénesis y, por lo tanto, una fertilidad normal. Por el otro, a pesar de haber observado una cantidad considerable de túbulos seminíferos afectados por el silenciamiento de *Gpat2*, el efecto podría verse enmascarado por la gran cantidad de espermatozoides que son liberados en cada eyaculación.

Figura 1.23. El silenciamiento de *Gpat2* *in vivo* reduce el número de crías por parto.

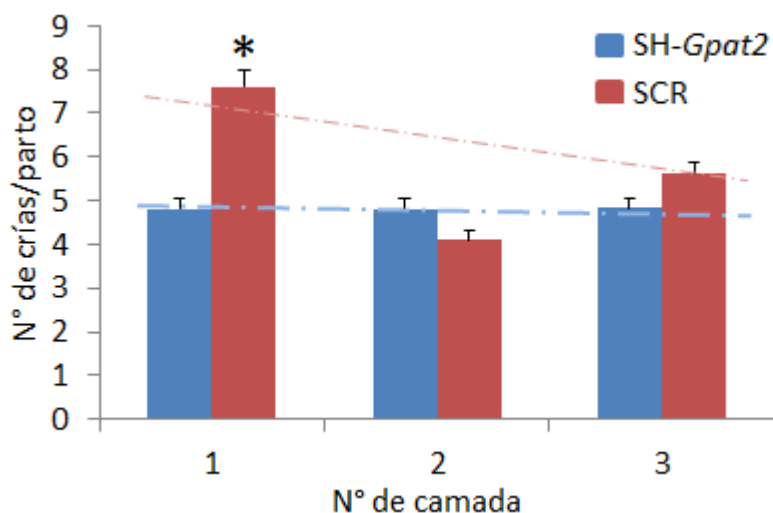


Figura 1.23. El silenciamiento de *Gpat2* en testículo disminuye el número de crías por parto que tiene cada hembra con la que se apareó. Se inyectaron 9 ratones macho con lentivirus SH-*Gpat2* y 5 con partículas SCR. El experimento se extendió hasta que cada hembra tuviera 3 camadas de crías. * $p < 0,05$ (Prueba t de Student).

Sin embargo, a nivel de expresión génica aún se pudieron observar diferencias entre los dos grupos de ratones al finalizar este experimento. Luego del sacrificio de los animales, los testículos fueron removidos y se analizaron por qPCR la expresión de algunos genes marcadores de la espermatogénesis con el objetivo de determinar el momento en el que se detiene el ciclo espermatogénico cuando se silencia la expresión de *Gpat2*. Se eligieron genes que se expresaran en altos niveles específicamente en ciertas etapas de la meiosis o del proceso

espermatogénico. Se midió la expresión relativa de los genes marcadores *Nanos3* (espermatogonia), *Tmem30* (espermatocono en paquitenos), *Tnp1* (espermátide) [1] y *Gpat2*. En la figura 1.24 se muestran los resultados obtenidos. Como era esperable, la expresión de *Gpat2* fue significativamente mayor en el grupo SCR. Al observar los niveles de expresión de los genes marcadores de la espermatogénesis, se observa que mientras que no hay diferencias significativas en la expresión del gen marcador de espermatogonias, la expresión de los genes marcadores de espermatocono en paquitenos y de espermátide es significativamente mayor en el grupo SCR. Por lo tanto, estas medidas correlacionan con lo visto por histología: el silenciamiento de *Gpat2 in vivo* afecta la espermatogénesis deteniendo el proceso inmediatamente antes o en la etapa de paquitenos y por esto, no se observan diferencias estadísticas en la expresión del gen marcador de los estadios anteriores (como de *Nanos3*, de espermatogonia) pero sí en los marcadores de esta etapa y las sucesivas (como *Tmem30* y *Tnp1*).

Figura 1.24. El silenciamiento de *Gpat2 in vivo* detiene la espermatogénesis en el estadio de paquitenos.

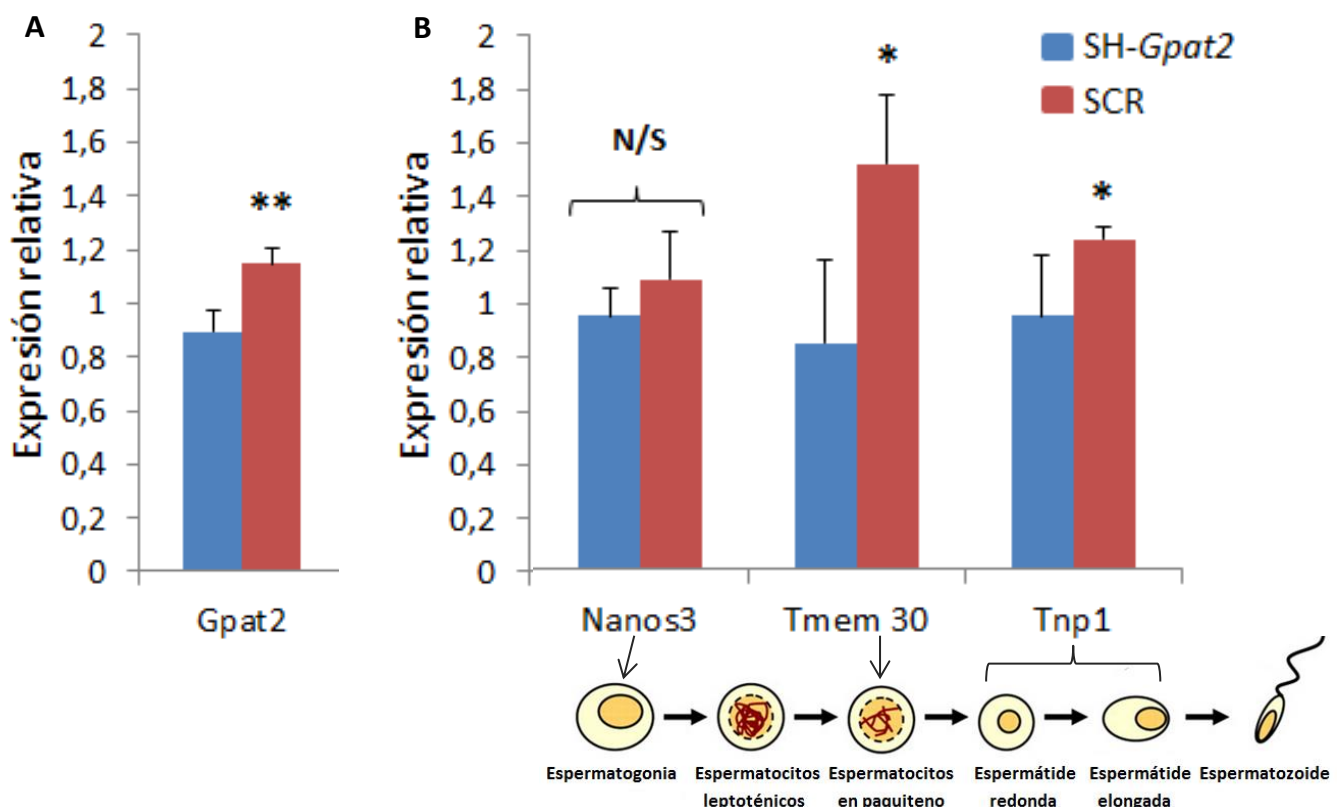


Figura 1.24. El silenciamiento de *Gpat2 in vivo* afecta al proceso espermatogénico, deteniendo la maduración de células germinales en o previo al estadio de paquitenos. Se midió por qPCR la expresión de *Gpat2* y de genes marcadores de los distintos estadios de la meiosis o de la espermatogénesis. En A se muestra la expresión relativa de *Gpat2* en los dos grupos de ratones y en B la expresión de los genes marcadores, usando a *Rpl13a* como gen *housekeeping*. Bajo el histograma de la derecha se muestra un esquema de la espermatogénesis para indicar el estadio en donde

principalmente se expresa cada gen (adaptado de [118]). Se muestran los valores promedio de las medidas realizadas por duplicado para cada gen de dos experimentos independientes. ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$ (Prueba t de Student), N/S: no significativo.

Con el objetivo de intentar responder el interrogante acerca de la función de GPAT2 en las células germinales masculinas, que permita explicar su restringido patrón de expresión tisular y la disparidad en sus características con respecto al resto de las GPATs, se decidió silenciar la expresión de esta proteína en testículos de ratones prepuberales. El análisis histológico reveló en 3 de 4 ratones inyectados **con el lentivirus SH-Gpat2 la presencia de considerables alteraciones tubulares y tisulares**. Como se esperaba, en aquellos túbulos afectados, no se pudo detectar a GPAT2 por IHQ, mientras que en los cortes de testículo de ratones SCR se detectó a GPAT2 con el mismo patrón observado en la IHQ en ratones *wild type* de 40 dpp (Figura 1.5). A diferencia de los ratones SCR en los cuales se observa una espermatogénesis normal, en los ratones SH-Gpat2 se destaca la presencia de túbulos seminíferos carentes de espermatocitos en división meiótica. Es decir, en estos túbulos afectados no se observan espermátides redondas o espermatozoides maduros, sino que **la espermatogénesis está detenida antes de la meiosis o en sus primeros estadios**. Sin embargo, el número de espermatogonias no parece verse afectado. Esto se corroboró también por qPCR y se observó que el silenciamiento de *Gpat2* afecta al proceso espermatogénico en la etapa de paquiteno o en alguna etapa previa, pero posterior la fase de espermatogonia, ya que en los testículos de ratones SH-Gpat2 se observó una menor expresión de genes marcadores de espermatocitos en paquiteno y de espermátide en comparación con el grupo SCR, mientras que la expresión del gen marcador de espermatogonias fue igual en ambos grupos (Figura 1.24).

A partir de las observaciones histológicas realizadas en los testículos de estos ratones, se hipotetizó que **el silenciamiento de Gpat2 afectaría la capacidad reproductiva de los ratones SH-Gpat2** y que por lo tanto, tendrían un número menor de crías por camada en comparación con los ratones control (SCR). **El número de crías fue significativamente menor en la primera camada de los SH-Gpat2 en comparación con los SCR** y en las otras dos camadas, si bien no se obtuvieron diferencias significativas, la tendencia general se mantuvo (Figura 1.23).

Por lo tanto, se puede concluir que la presencia de GPAT2 es imprescindible para la correcta progresión de la primera ola espermatogénica y el inicio de la capacidad reproductiva en el ratón. Teniendo en cuenta lo discutido previamente, una posible explicación para este hecho es que el silenciamiento de GPAT2 afecte la actividad conjunta con MILI, lo que alteraría la biogénesis de los piRNA de paquiteno. Cabe destacar que el fenotipo de ratones KO para *Mili* en lo que respecta a la progresión de la espermatogénesis y a nivel histológico se asemeja a lo que se observa en los túbulos afectados de los ratones SH-Gpat2, ya que los primeros, además de resultar estériles, presentan un arresto espermatogénico en el estadio de zigoteno/paquiteno temprano [51]. Entonces, **esto sustenta la hipótesis que la interacción de MILI y GPAT2 sea necesaria para la síntesis de piRNA de paquiteno por la vía primaria y que**

éstos a su vez sean cruciales para el inicio de la espermatogénesis. Si bien aún no está del todo esclarecida la función de los piRNA de paquitenos, su ausencia provoca un daño masivo en el ADN postmeiótico y serían los encargados de la eliminación de la mayor parte de los ARNm durante la espermiogénesis [26, 119].

Los resultados expuestos claramente demuestran que GPAT2 es una proteína de importancia en la espermatogénesis e invitan al desarrollo de ratones KO para *Gpat2* para conocer cuál es el precisamente el proceso en el cual está involucrada esta proteína dentro del marco de la maduración espermática.

SEGUNDA SECCIÓN

2. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE GPAT2 DE HUMANO Y CARÁCTERÍSTICAS EN SU CONTEXTO PATOLÓGICO.

2.1. EXPRESIÓN DE GPAT2 EN TEJIDOS HUMANOS NORMALES Y TUMORALES.

2.1.1. Evaluación *in silico* de la expresión de GPAT2 en tejidos humanos normales y tumorales.

Con el objetivo de determinar el patrón de expresión de *GPAT2* en humano (en qué tejidos o líneas celulares se expresa y en qué proporción), se utilizó información de *microarrays* que se encuentra disponible en la base de datos pública de NCBI GEO Data Sets. Se utilizó el estudio GSE7307 titulado *Human body index-transcriptional profiling*, el cual incluye muestras normales y patológicas, como así también líneas celulares. Para este análisis, sólo se tuvieron en cuenta las muestras provenientes de tejidos humanos normales (N=393). Se utilizaron los datos de expresión para la sonda de *GPAT2* humana de Affimetryx, 235557_AT. Para la normalización de los resultados se utilizó el algoritmo estadístico fRMA (*Frozen Robust Multitarray Analysis*) [120]. Para simplificar el análisis, aquellas muestras provenientes de distintas partes de un mismo órgano se las agrupó bajo un mismo nombre (por ejemplo, los datos de expresión para cerebelo, hipocampo, lóbulo parietal, lóbulo temporal, etc., se las agrupó bajo el nombre de “Cerebro”) y se omitieron aquellas muestras que no tuvieran réplicas. Como se observa en la figura 2.1 A, **la expresión de *GPAT2* en humano, al igual que lo que hemos determinado en el caso del ratón, es máxima en el testículo**. Además, teniendo en cuenta que previamente se había propuesto a este gen como un nuevo “Antígeno Cáncer Testículo”, por su expresión en muestras de mieloma múltiple y en testículo [121], se realizó un análisis comparativo de la expresión de *GPAT2* en tejidos tumorales humanos. Para ello se combinaron los datos provenientes de *oligo-microarrays*, disponibles en la base de datos pública GEO Data Sets y para trabajar con un conjunto de datos homogéneos se descargaron del sitio InSilicoDB las matrices de expresión pre-procesadas por fRMA de los estudios: GSE37642 (leucemia mieloide aguda, LMA, N=140), GSE7553 (melanoma primario, melanoma metastásico, carcinoma de células escamosas y basales, N=15), GSE11151 (cáncer de riñón, N=67), GSE31684 (carcinoma de vejiga, N=93), GSE9843 (carcinoma hepatocelular, N=91), GSE18842 (cáncer de pulmón, N=46), GSE14333 (cáncer colorrectal, N=290), GSE21653 (cáncer de mama, N=266), GSE20685 (cáncer de mama, N=327), GDS5072 (cáncer de próstata, N= 11) y GSE39671 (leucemia linfocítica crónica, LLC, N=154). Todos ellos fueron llevados a cabo con la plataforma de Affymetrix *Human Genome U133 Plus 2.0 Array* (GPL570). Se consideraron los datos de expresión de la sonda 235557_AT (*GPAT2*) y para este análisis sólo se tuvieron en cuenta las muestras provenientes de tumores, excluyendo a aquellas muestras que fueran de pacientes sanos. Los valores de expresión de *GPAT2* para cada tipo de cáncer se dividieron en 3

cuartiles, de manera tal que se muestra, para cada caso, el porcentaje de muestras analizadas con una expresión baja, moderada o alta de *GPAT2* (Figura 2.1 B). Como se observa en la figura, se puede considerar a los casos analizados de cáncer de mama, melanoma, cáncer de próstata y cáncer de pulmón como “altos expresores” de *GPAT2*, ya que presentan un número estadísticamente superior de casos con alta expresión de *GPAT2* (42%, 44%, 65% y 41% de los casos totales, respectivamente). Por el otro lado, los casos de cáncer renal, colorrectal, hepatocelular, de células basales y leucemias (LMA y LLC) mostraron una proporción significativamente más elevada de casos con una expresión baja de *GPAT2*, por lo que se los puede agrupar como “bajos expresores” de *GPAT2* (55%, 47%, 64%, 67%, 47 y 51% de los casos totales, respectivamente).

Figura 2.1. La expresión de *GPAT2* fisiológicamente es máxima en testículo y patológicamente su expresión es elevada en ciertos tipos de tumores humanos.

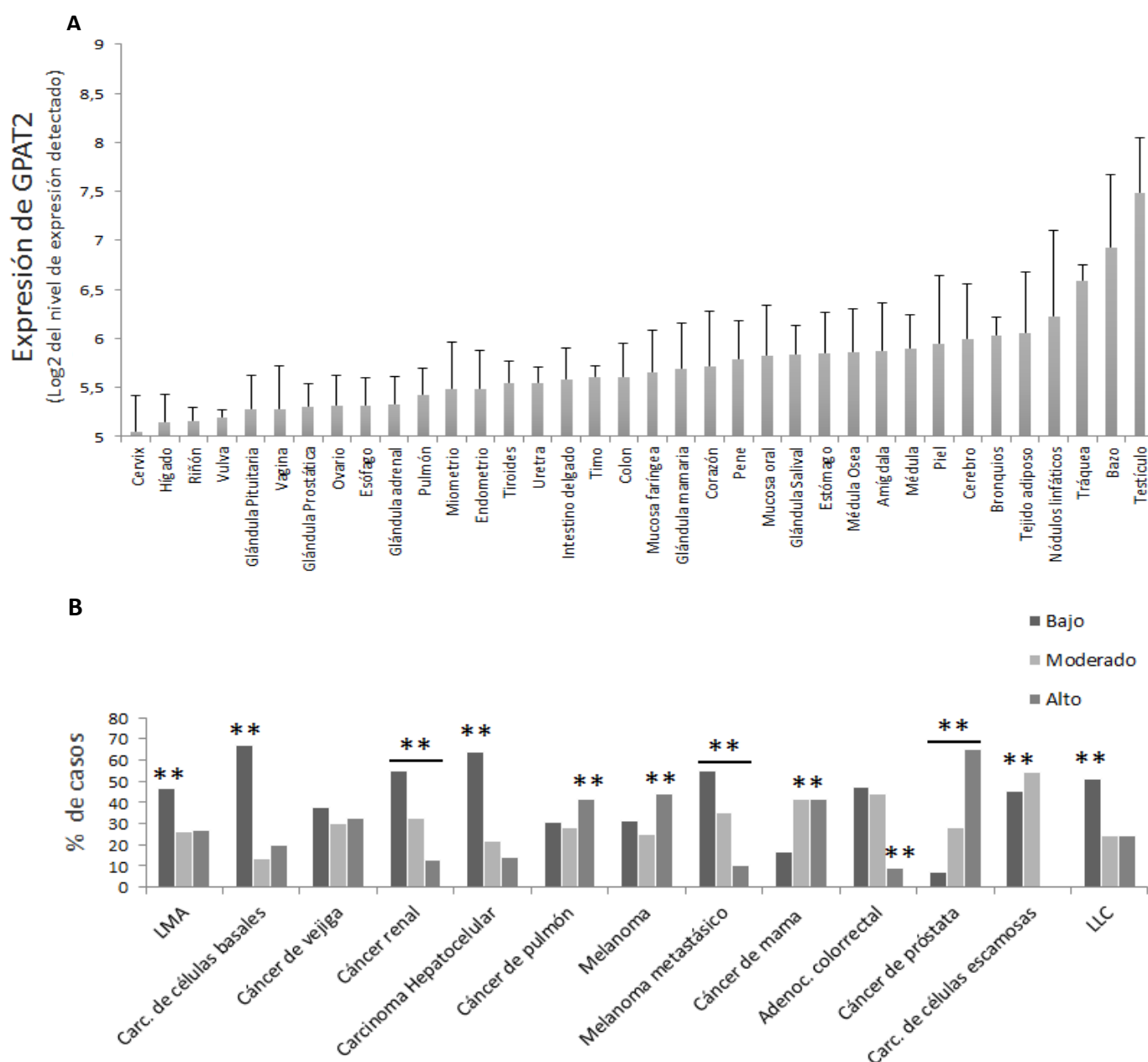


Figura 2.1. Análisis *in silico* de la expresión de *GPAT2* en tejidos normales y en tejidos tumorales humanos. En A se muestra el análisis de expresión de *GPAT2* en 393 muestras provenientes de tejidos normales humanos. En B, se muestra la expresión de *GPAT2* en distintas muestras tumorales de humano que fueron agrupadas según su nivel de expresión en “Bajo”, “Moderado” o “Alto”. ** $p < 0,01$ (ANOVA y Test de Tukey). LMA: leucemia mieloide aguda; LLC: leucemia mieloide crónica.

2.1.2. Evaluación por inmunohistoquímica de la presencia de la proteína GPAT2 en tejidos tumorales humanos.

Con el objetivo de comprobar la presencia de la proteína GPAT2 en uno de los tejidos tumorales que resultó ser “alto expresor” de GPAT2, se adquirió un *Tissue Microarray* (TMA) (Origene, CT565863) que incluía muestras de cáncer de mama (N=36) y de tejido mamario normal (N=6). No se detectó a GPAT2 en ninguno de los tejidos normales, mientras que un 37% de los carcinomas resultó positivo a la presencia de esta proteína (Figura 2.2 B). En la figura 2.2 A se muestran algunas imágenes representativas del resultado de la IHQ en el TMA. Se puede observar que la reacción para GPAT2 se localiza a nivel citoplasmático.

Además, si se tienen en cuenta las características histopatológicas del tejido tumoral de donde provienen estas muestras, se puede asociar la presencia de GPAT2 a tumores de alto grado histológico, es decir, hay una correlación positiva estadísticamente significativa entre la presencia de GPAT2 en tumores y su grado histológico. Como se observa en la figura 2.2 C, sólo un 11% de los tumores de Grado I-II (según la Escala de Nottingham) resultaron positivos, mientras que en aquellas muestras de Grado III (tumores más agresivos) un 55% de las muestras fueron positivas para GPAT2.

Figura 2.2. GPAT2 se detecta en cáncer de mama y su presencia correlaciona con el grado histológico.

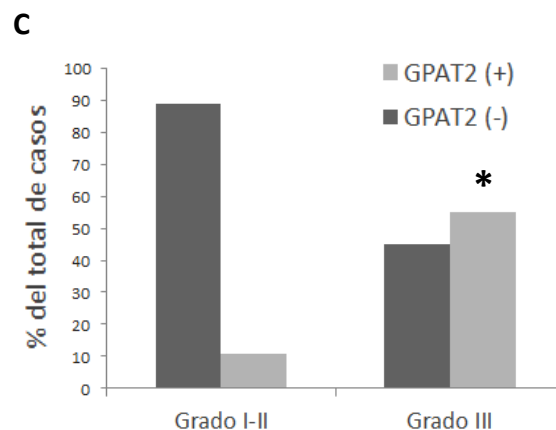
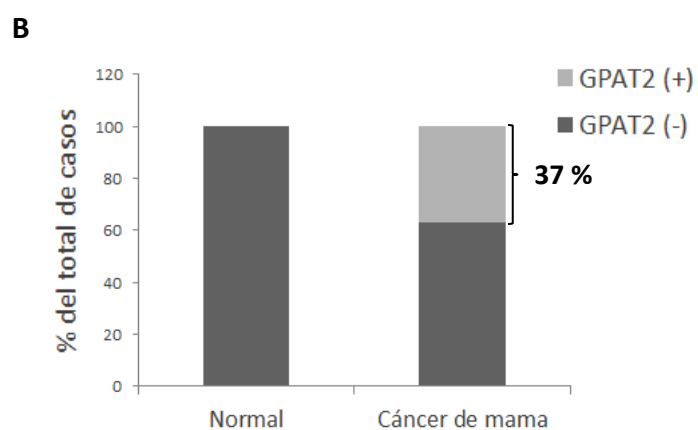
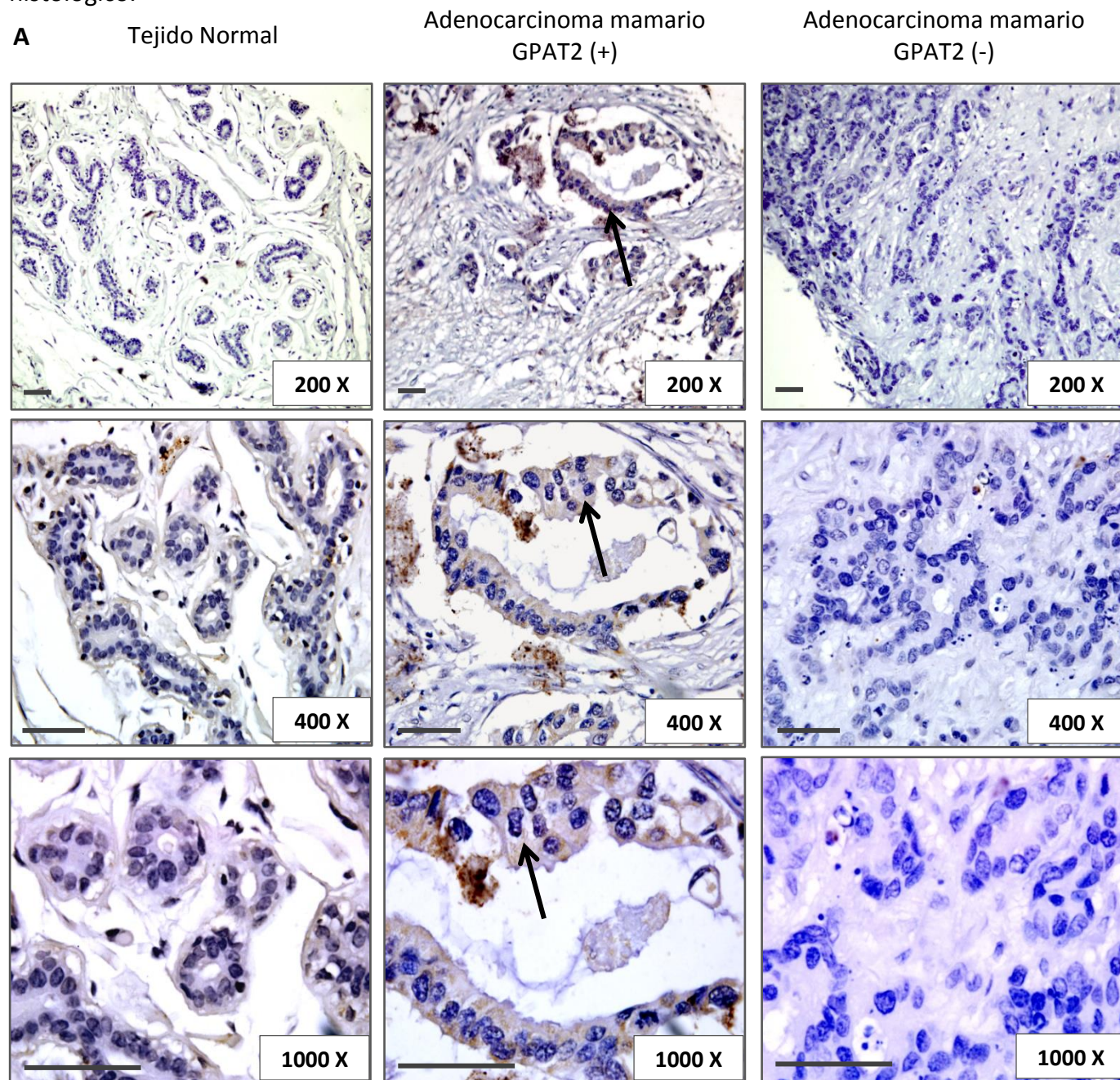


Figura 2.2. Presencia de la proteína GPAT2 en muestras de cáncer de mama. En A se muestran algunas de las imágenes obtenidas más representativas de la IHQ sobre el TMA. Se muestra un ejemplo de tejido normal (primera columna), de adenocarcinoma mamario positivo para GPAT2 (Adenocarcinoma mamario GPAT2 (+), segunda columna) y de adenocarcinoma mamario negativo para la presencia de GPAT2 (Adenocarcinoma mamario GPAT2 (-), tercera columna). Con flechas se indican las regiones citoplasmáticas positivas para GPAT2 y en la esquina inferior derecha el aumento utilizado. Los núcleos se contratiñeron con hematoxilina. Barras de escala: 50 μ m. En B se muestra un gráfico de barras mostrando la proporción de casos positivos y negativos para la presencia de GPAT2. En C se muestran los casos positivos y negativos para la presencia de GPAT2 de las muestras analizadas agrupadas según su grado histopatológico (según la Escala de Nottingham). La correlación entre la presencia de GPAT2 y el grado histológico es positivo y estadísticamente significativo (* $p < 0,05$) (Test de Fisher).

Las similitudes entre el proceso del desarrollo tumoral y el desarrollo de las células germinales son objeto de atención desde hace varios años. Durante la espermatogénesis, las células germinales muestran características semejantes a las células cancerosas, por ejemplo, las espermatogonias inmaduras mantienen su capacidad proliferativa a lo largo de toda la vida del organismo y continuamente se diferencian a espermatocitos. Las células embrionarias del trofoblasto también exhiben características compartidas con las células cancerosas, en el sentido de que son capaces de invadir y penetrar el endometrio para implantar al embrión, así como también proliferar vigorosamente para formar parte de la placenta [122]. Estas observaciones derivaron en la hipótesis de que la activación de programas propios del tejido embrionario o de gametas estaría dentro de las fuerzas impulsoras de la tumorigénesis. Este concepto se fortaleció cuando se descubrieron un gran número (aún hoy en aumento) de proteínas que están presentes sólo en células germinales masculinas, en células trofoblásticas y tumores, los llamados CTA. Este descubrimiento reforzó la teoría de que la expresión aberrante de genes de la línea germinal en células cancerosas refleja la activación de programas gametogénicos silenciados en células somáticas y que la estimulación de estos programas impulsaría el desarrollo tumoral [123]. En adultos sanos, la expresión de CTA se limita a las células germinales masculinas, pero se puede observar su expresión ectópica en células tumorales de múltiples tipos de cáncer humanos. Las células sexuales humanas masculinas carecen de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase-I, por lo que no pueden presentar antígenos a las células T que, sumado a la presencia de la BTB, resulta en que el testículo sea un sitio de inmunoprivilegio y que los CTA sean antígenos nuevos cuando son expresados ectópicamente en células cancerosas, pudiendo entonces estimular la respuesta inmune que estará estrictamente dirigida al tumor que los está expresando [122, 124]. El proceso tumorigénico implica la adquisición de capacidades esenciales como el crecimiento descontrolado, la resistencia a la apoptosis, el potencial de migrar y dividirse en sitios distantes, la capacidad de inducir la vasculogénesis y la inestabilidad genómica. Varios CTA se han visto involucrados en el otorgamiento de éstas características, lo que sugiere que estarían directamente implicados en la tumorigénesis. Entonces, los CTA son blancos prometedores para el tratamiento inmuno-específico de una amplia variedad de tumores humanos [122].

GPAT2 fue propuesta por primera vez como un CTA en el trabajo de Condomines *et al.*, en el cual se propone a esta proteína como un nuevo antígeno marcador por sus características de expresión tisular, ya que se encontró expresada diferencialmente en testículo y en mieloma múltiple [64]. Nuestros resultados a partir de datos *in silico* y a partir de la IHQ en un TMA de carcinomas mamarios confirman y refuerzan lo observado por los autores en cuanto a la clasificación de GPAT2 como un CTA basándose en criterios de expresión tisular.

Si bien no se conoce el rol en la espermatogénesis de todos los CTA detectados, se han descubierto las funciones de algunos de ellos en este proceso, como por ejemplo en la regulación de la transcripción (como las proteínas SS18-SSX), en el alineamiento cromosómico (SCP1), en la apoptosis de células germinales (proteínas MAGE), espermiogénesis (OY-TES-1) y movilidad espermática (SP17) [59, 125]. Además, si bien en lo que respecta a la mayoría de los CTA, no está del todo esclarecido si cumplen un rol esencial en el proceso tumorigénico o si son un producto secundario de los cambios a nivel de la cromatina (un evento clave en el proceso de transformación), como se mencionó, a varios de estos genes se les ha adjudicado una función “oncogénica”. Es decir, muchos CTA se han visto involucrados en el establecimiento y/o progresión del fenotipo tumoral [59, 122]. En el esquema de la figura 2.3 se muestran algunos de los CTA que han demostrado estar directamente relacionados con el establecimiento de alguna o varias características propias de la transformación tumoral.

Figura 2.3. Esquema de la función oncogénica de algunos CTA.



Figura 2.3. Representación esquemática de la función de algunos CTA en el desarrollo de las características propias del fenotipo tumoral. El crecimiento celular descontrolado, la inducción de la angiogénesis, la evasión de la apoptosis, la capacidad migratoria o metastásica y la inestabilidad genómica son todas características distintivas del proceso tumoral, en las cuales varios CTA se han visto involucrados. Esquema adaptado de Gjerstorff MF *et al.* [122].

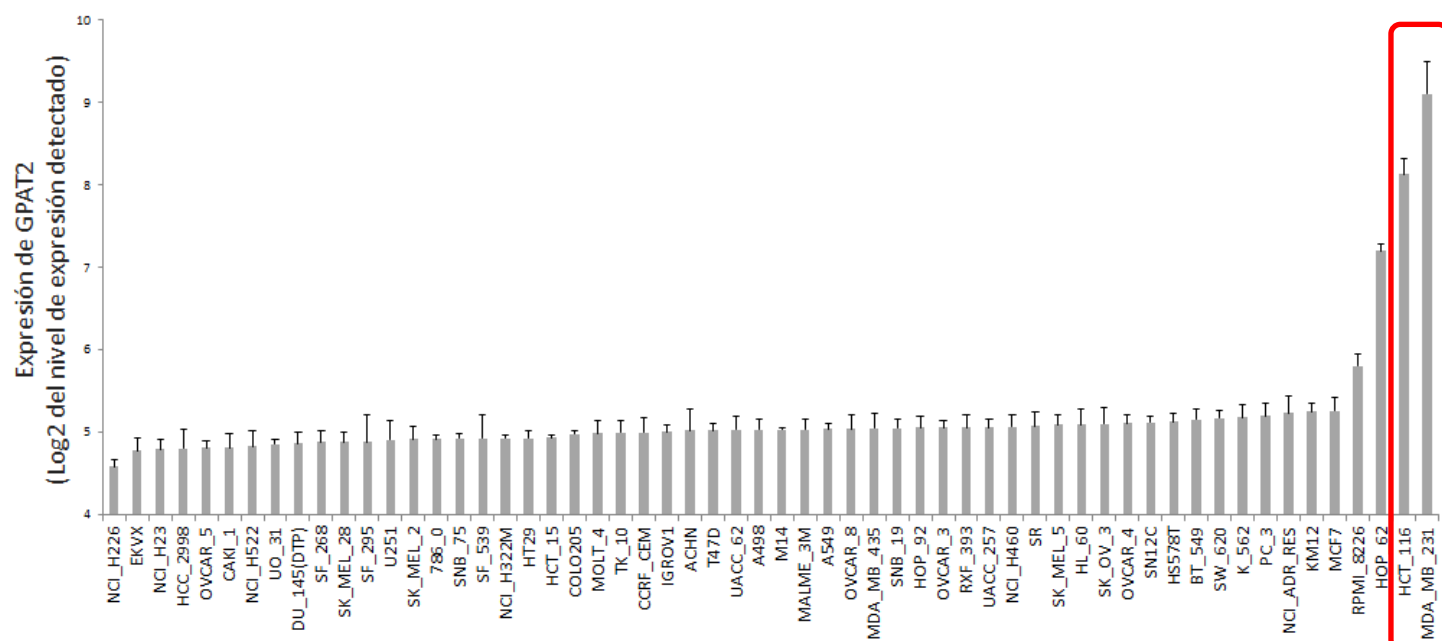
Cabe destacar que en los últimos años una gran cantidad de trabajos de investigación han vinculado a la familia de proteínas PIWI humanas con el proceso tumorigénico, ya que su expresión aberrante en varios tipos de tumores se ha visto asociada a la presencia de algunas de las características fenotípicas propias de las células cancerosas. Por lo tanto, debido a su patrón de expresión tisular, se han incluido a estas proteínas dentro del grupo de los CTA [126]. La sobreexpresión de proteínas PIWI se observó en varios tipos de cáncer (como cáncer de próstata, cervical, de colon y de mama) y en varias líneas celulares tumorales. En base a ensayos clínicos y al estudio en estas líneas celulares, esta familia de genes se ha visto involucrada en varios procesos promotores de la carcinogénesis. Además de las proteínas PIWI, también se ha demostrado que algunos piRNAs contribuyen a la tumorigénesis [126].

Por lo tanto, se decidió evaluar si GPAT2, además de cumplir con el patrón de expresión tisular de los CTA, cumpliría también alguna función en el desarrollo del fenotipo tumoral como muchos de los CTA descriptos. Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente sección.

2.2. EVALUACIÓN DE LA FUNCIÓN DE GPAT2 EN LÍNEAS CELULARES TUMORALES HUMANAS.

2.2.1. Selección de líneas celulares tumorales humanas con alta expresión de GPAT2.

Con el objetivo de conseguir un modelo para su estudio *in vitro*, se analizó *in silico* qué líneas celulares humanas derivadas de tumor expresan GPAT2. Para ello se utilizaron los datos de un *microarray* provenientes del estudio GSE32474 (*NCI-60 cancer cell line panel*), en el cual se incluyeron 59 líneas celulares humanas, provenientes de 9 tejidos tumorales distintos (N=175). Como se observa en la figura 2.4, la expresión de GPAT2 es máxima en las líneas celulares MDA-MB-231 (derivada de adenocarcinoma mamario) y en las HCT116 (derivada de carcinoma colorrectal). Ambas fueron adquiridas para su estudio.

Figura 2.4. Expresión de *GPAT2* en células humanas derivadas de tumores.**Figura 2.4.** Expresión de *GPAT2* en células humanas derivadas de tumores. Se analizó la presencia del ARNm de *GPAT2* en 175 muestras provenientes de 59 líneas celulares humanas derivadas de 9 tejidos distintos. Se adquirieron las líneas celulares que más expresan *GPAT2*: MDA-MB-231 y HCT116 (recuadro rojo).

2.2.2. Puesta a punto del silenciamiento de *GPAT2*.

Con el objetivo de silenciar la expresión de *GPAT2* en las líneas celulares MDA-MB-231 y HCT-116, se adquirieron cuatro vectores de silenciamiento, portando un shRNA contra distintas variantes transcripcionales de *GPAT2* (sh-*GPAT2*) y un vector que porta una secuencia *scramble* (SCR). Para chequear cuál de ellos silenciaba mejor la expresión de *GPAT2*, se cotransfectaron células HEK 293 con un vector comercial que expresa *GPAT2* de humano regulado por el promotor del citomegalovirus (True ORF, Origene) y el vector de silenciamiento correspondiente o el vector SCR. A las 48 horas se extrajo el ARN y se midió por qPCR el nivel de expresión de *GPAT2* de cada transfección. En la figura 2.5 A se muestra que el vector que más eficientemente silenció *GPAT2* fue el SH1, siendo la expresión en esas células un 80% más baja en comparación con las células cotransfectadas con el vector SCR. Con este vector y el SCR se continuó trabajando para silenciar a *GPAT2* en las líneas MDA-MB-231 y HCT-116. Para ello se transfectaron estas líneas el vector SH1 o el SCR y dos días después se comenzaron a seleccionar con puromicina a las células que portaban el vector, para así lograr una línea de expresión estable. Una vez alcanzado un 80 % o más de células con fluorescencia verde (indicativo del éxito de la transfección y de expresión del shRNA o del transcrito SCR a partir del vector), se extrajo el ARN tanto de las MDA-MB-231 con el vector SH1-*GPAT2* como con el vector SCR (a partir de ahora, MDA-SH o MDA-SCR), como también de las HCT-116 con SH1-

GPAT2 o con SCR (a partir de ahora, HCT-SH o HCT-SCR) y se analizó por qPCR el nivel de expresión de *GPAT2* (Figura 2.5 B y C). Como se observa en la figura 2.5, el nivel de expresión de *GPAT2* se redujo significativamente en las MDA-SH y en las HCT-SH en comparación con sus respectivos controles SCR. Entonces, debido a que el silenciamiento fue exitoso, se continuó trabajando con éstas líneas estables para evaluar el efecto fenotípico del silenciamiento de *GPAT2*. El nivel de silenciamiento se monitoreó mensualmente por qPCR.

Figura 2.5. Puesta a punto del silenciamiento de *GPAT2* en células tumorales de humano.

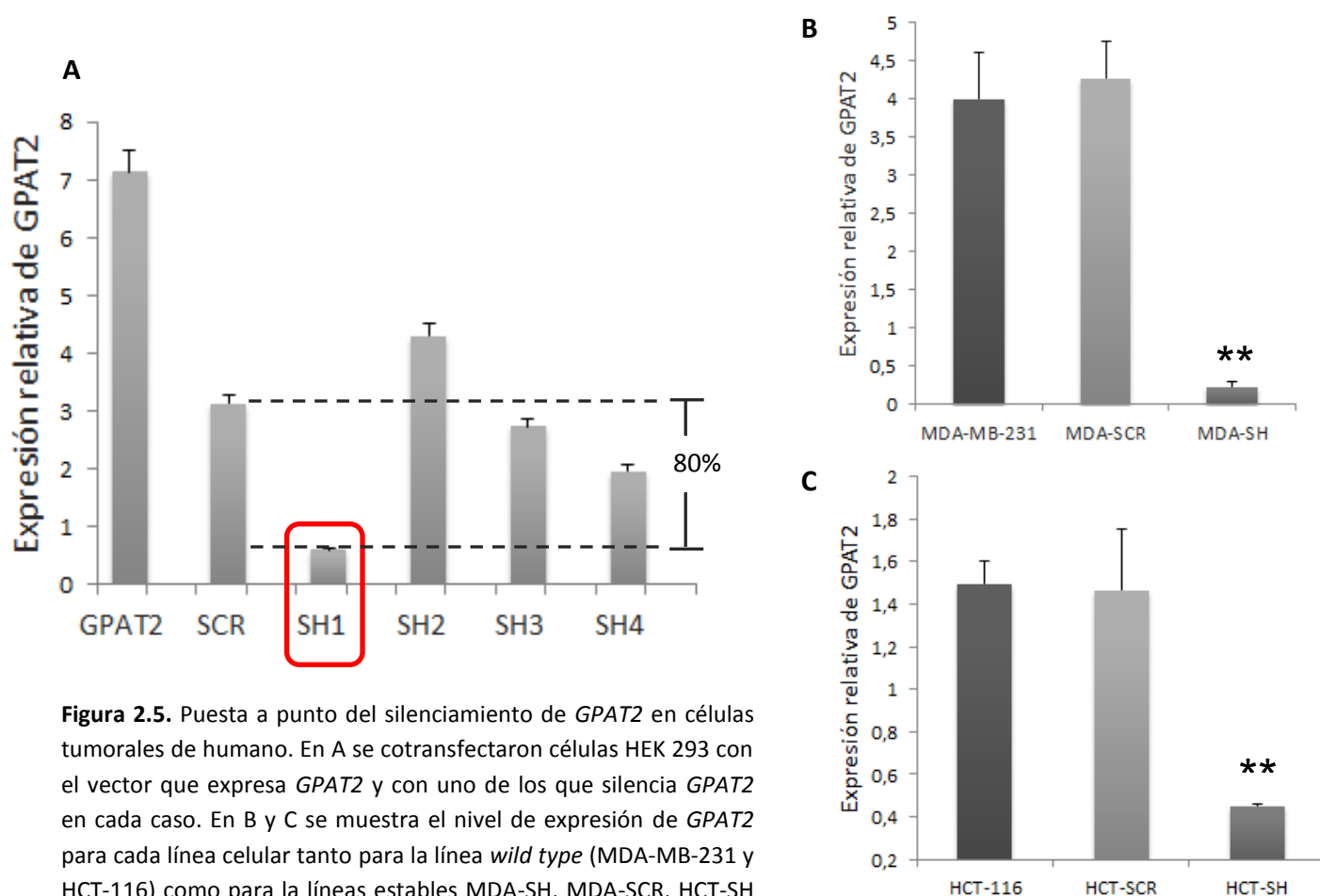


Figura 2.5. Puesta a punto del silenciamiento de *GPAT2* en células tumorales de humano. En A se cotransfectaron células HEK 293 con el vector que expresa *GPAT2* y con uno de los que silencia *GPAT2* en cada caso. En B y C se muestra el nivel de expresión de *GPAT2* para cada línea celular tanto para la línea *wild type* (MDA-MB-231 y HCT-116) como para la líneas estables MDA-SH, MDA-SCR, HCT-SH y HCT-SCR. (ANOVA y test de Tukey) ** $p < 0,01$. Estos experimentos se realizaron dos veces, por duplicado. Se usó a *βACTNA* como gen *housekeeping*. El nivel de silenciamiento se monitoreó mensualmente por qPCR.

2.2.3. Experimentos *in vitro*.

2.2.3.1. Efecto del silenciamiento de *GPAT2* en la supervivencia y proliferación celular.

Con el objetivo de determinar si la expresión de *GPAT2* aumenta la tasa de proliferación celular, una de las características de las células tumorales, se midió la viabilidad celular por medio del ensayo de MTT cada 24 horas por tres días, pudiendo así estimar la tasa de proliferación y/o de supervivencia de las cuatro líneas estables (MDA-SH, MDA-SCR, HCT-SH y HCT-SCR). Como se observa en la figura 2.6, en el caso de las células MDA-SH y HCT-SH la tasa de proliferación (y/o viabilidad) disminuye con respecto a los controles correspondientes (MDA-SCR y HCT-SCR). Al cabo de los tres días, tanto para MDA-SH como para HCT-SH se detectaron menos de la mitad de células viables con respecto a sus respectivos controles. Por lo tanto, como aquellas células con una expresión de *GPAT2* disminuida están proliferando más lentamente que los controles, se puede afirmar que una expresión elevada de *GPAT2* aumenta la tasa de proliferación celular.

Figura 2.6. El silenciamiento de *GPAT2* disminuye la tasa de proliferación celular en células tumorales.

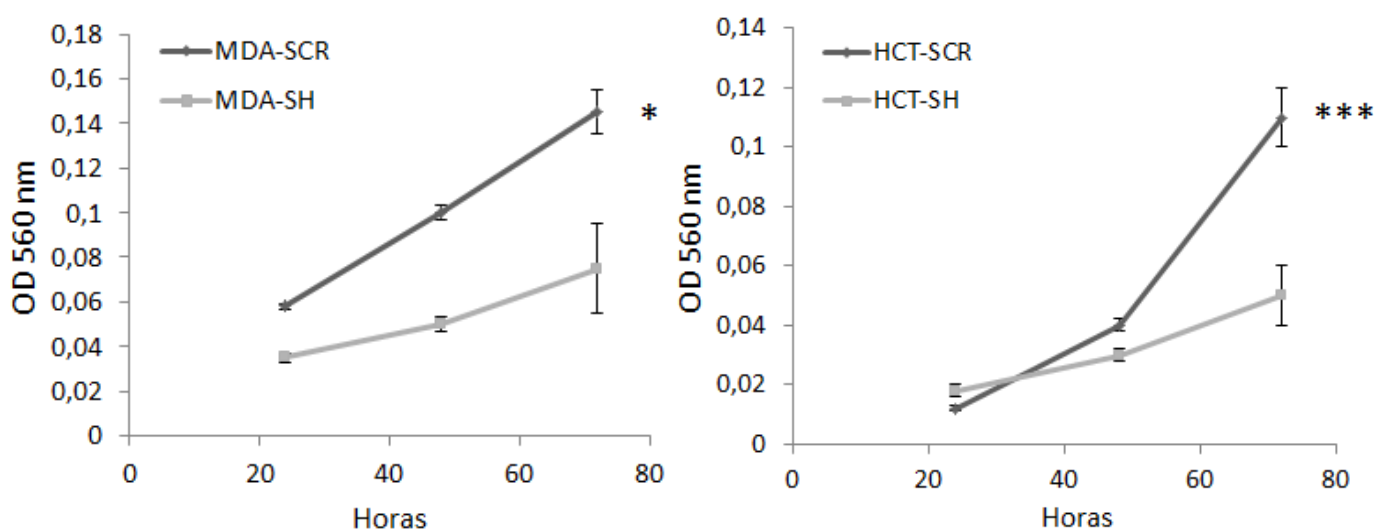


Figura 2.6. El silenciamiento de *GPAT2* disminuye la tasa de proliferación celular. Se midió la tasa de proliferación con el método de MTT en MDA-SH y HCT-SH y sus respectivos controles, MDA-SCR y HCT-SH. Cada medida se realizó por cuadruplicado. Los resultados representan la media \pm DE de las réplicas de tres experimentos independientes. * $p < 0,05$ y *** $p < 0,001$ (Prueba t de Student).

2.2.3.2. Efecto del silenciamiento de *GPAT2* sobre el crecimiento independiente de anclaje y cerrado de la herida.

Las células tumorales tienen la habilidad de crecer independientemente de una superficie sólida y el ensayo de formación de colonias en agar blando es un método bien estandarizado para la caracterización de esta capacidad *in vitro* y se considera que es una de las

pruebas más rigurosas para evaluar la transformación maligna de células. Este ensayo se llevó a cabo con las líneas celulares MDA-SH y MDA-SCR y al cabo de dos semanas se contaron el número de colonias en cada caso. Como se observa en la figura 2.7 A, el número de colonias formadas por MDA-SH fue un 10 % de las formadas en el caso de las MDA-SCR. Entonces, se puede concluir que el silenciamiento de *GPAT2* disminuye la tumorigenicidad *in vitro* ya que la línea estable MDA-SH posee una tasa de crecimiento independiente de anclaje significativamente más baja que el control MDA-SCR.

El ensayo del “cerrado de la herida” es otro experimento que permite analizar la capacidad tumorigénica de una línea celular o, más específicamente, su capacidad migratoria y de establecimiento de interacciones celulares. Estos experimentos se realizaron también en MDA-SH y MDA-SCR, midiendo el porcentaje de cerrado de la “herida” cada 2, 6 y 8 horas. Como se observa en la figura 2.7 B, el cerrado de la “herida” fue más rápido en MDA-SCR que en MDA-SH: a las 6 horas el cerrado de la herida en el caso de la línea celular MDA-SH fue del 43 %, mientras que en el caso de las MDA-SCR del 68 % y a las 8 horas del 52 % y 88 % respectivamente. Por lo tanto, el silenciamiento de *GPAT2* reduce la capacidad migratoria *in vitro*.

Figura 2.7. El silenciamiento de *GPAT2* disminuye la tumorigenicidad y la capacidad migratoria *in vitro*.

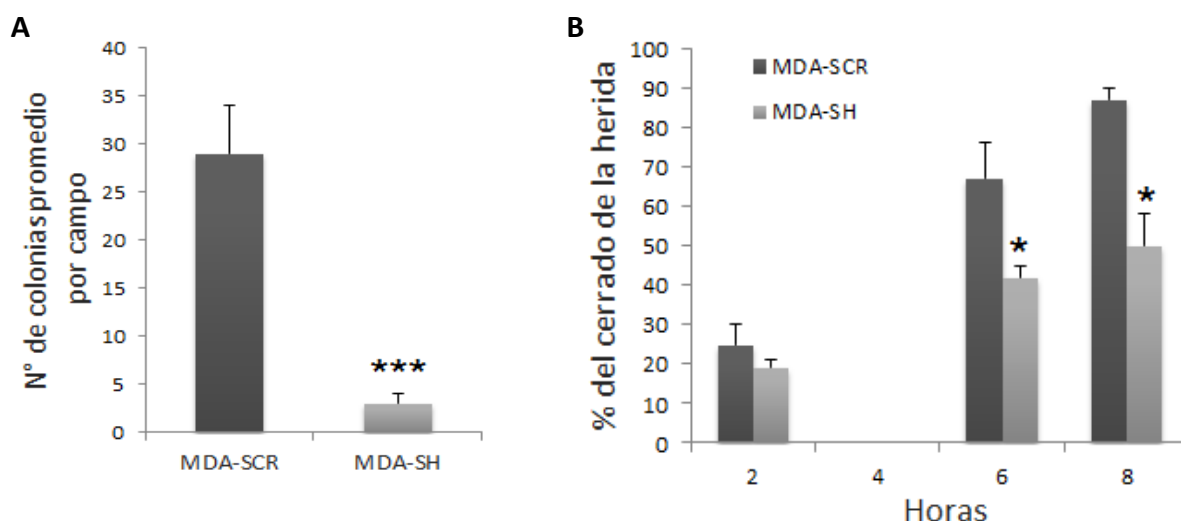


Figura 2.7. Efecto del silenciamiento de *GPAT2* en el crecimiento independiente de anclaje y en la capacidad migratoria de células en cultivo. En A se muestra el crecimiento de colonias en agar blando para MDA-SCR y para MDA-SH al cabo de 14 días (Prueba t de Student, *** $p < 0,001$). En B se muestra el cerrado de la “herida” para MDA-SH y MDA-SCR a las 2, 6 y 8 horas (Prueba t de Student, * $p < 0,05$). Cada medida se realizó por triplicado. En cada caso, se muestra el resultado de los promedios \pm DE de las réplicas de dos experimentos independientes.

2.2.4. Experimentos *in vivo*. Xenoinjertos en ratones *nude*.

Con el objetivo de estudiar el efecto del silenciamiento de *GPAT2* en la tumorigenicidad *in vivo*, se evaluó la capacidad de desarrollar tumor de las líneas celulares transformadas MDA-SCR y MDA-SH en ratones hembra *nude*. Para ello se separaron en grupos de 5 ratones cada uno y se inocularon con células MDA-SCR (grupo SCR), células MDA-SH (grupo SH) o con el medio de cultivo estéril sin células (grupo control). Al cabo de un mes posterior a la inoculación, comenzó el crecimiento tumoral en el 20% de los ratones del grupo SCR y al cabo de 2 meses el 100% (5/5) de los ratones de este grupo había desarrollado tumor. Durante los tres meses posteriores a la inoculación, no se registró crecimiento tumoral en el grupo SH (0/5). En consecuencia, se puede afirmar que el silenciamiento de *GPAT2* reduce drásticamente la capacidad tumorigénica *in vivo* de la línea celular MDA-MB-231. En la figura 2.8 se muestra una foto representativa de los tumores desarrollados en el grupo SCR y se grafica el crecimiento tumoral en los ratones de este grupo.

Figura 2.8. El silenciamiento de *GPAT2* disminuye en la tumorigenicidad *in vivo*.

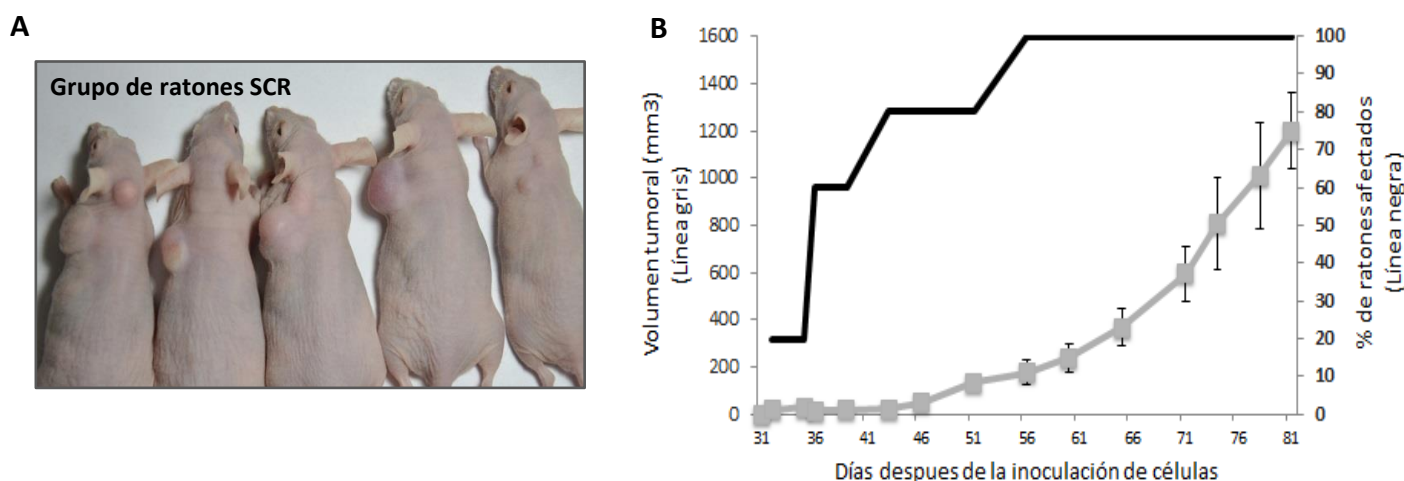


Figura 2.8. El silenciamiento de *GPAT2* disminuye la tumorigenicidad *in vivo*. En A se muestra una foto de los 5 ratones del grupo SCR al momento del sacrificio. En todos los ratones de este grupo hubo desarrollo de tumor. En B se muestra la curva de crecimiento tumoral promedio del grupo SCR y la ventana de tiempo desde que el primer ratón desarrolló tumor hasta el último. No se registró desarrollo de tumoral en el grupo SH.

El silenciamiento de *GPAT2* disminuyó la tasa de proliferación de las líneas celulares estables MDA-SH y HCT-SH en comparación con sus respectivos controles (MDA-SCR y HCT-SCR); redujo la capacidad migratoria y la tumorigénesis *in vitro* y disminuyó la tumorigenicidad *in vivo*. **Estos resultados demuestran que el silenciamiento de *GPAT2* atenúa las características fenotípicas tumorales típicas de las líneas celulares estudiadas. Entonces, se puede concluir que la presencia de *GPAT2* influye de manera determinante en la capacidad**

tumorigénica, contribuyendo en aspectos claves de las células tumorales, como lo son la proliferación, la migración y la invasión. Experimentos que permitan analizar el perfil de expresión génica de estas líneas estables con *GPAT2* silenciada son necesarios para proponer el mecanismo mediante el cual *GPAT2* influiría en estos procesos. Además, para terminar de confirmar la clasificación de *GPAT2* dentro del grupo de los CTA habría que confirmar su capacidad antigénica. Sin embargo, teniendo en cuenta los resultados presentados **se tiene suficiente evidencia como para que *GPAT2* pueda ser considerada un blanco muy interesante en la clínica para el tratamiento tumoral dirigido.**

2.3. REGULACIÓN DE LA TRANSCRIPCIÓN DE *GPAT2* DE HUMANO.

2.3.1. Regulación epigenética de *GPAT2* humana: resultados *in silico*.

Análogamente a lo estudiado para *Gpat2* de ratón y teniendo en cuenta su posible clasificación como CTA, se realizó una búsqueda bioinformática para determinar si la expresión de *GPAT2* humana también podría estar regulada epigenéticamente (principal mecanismo de regulación transcripcional de CTAs). Mediante el uso de la herramienta *Epigenomics*, de NCBI se buscó la presencia de Islas CpG en la región circundante al primer exón de este gen. En la figura 2.9 se muestra una captura de pantalla mostrando el resultado de dicha búsqueda: se encontraron dos Islas CpG en esta zona.

Figura 2.9. Presencia de Islas CpG circundando al primer exón de *GPAT2* de humano.

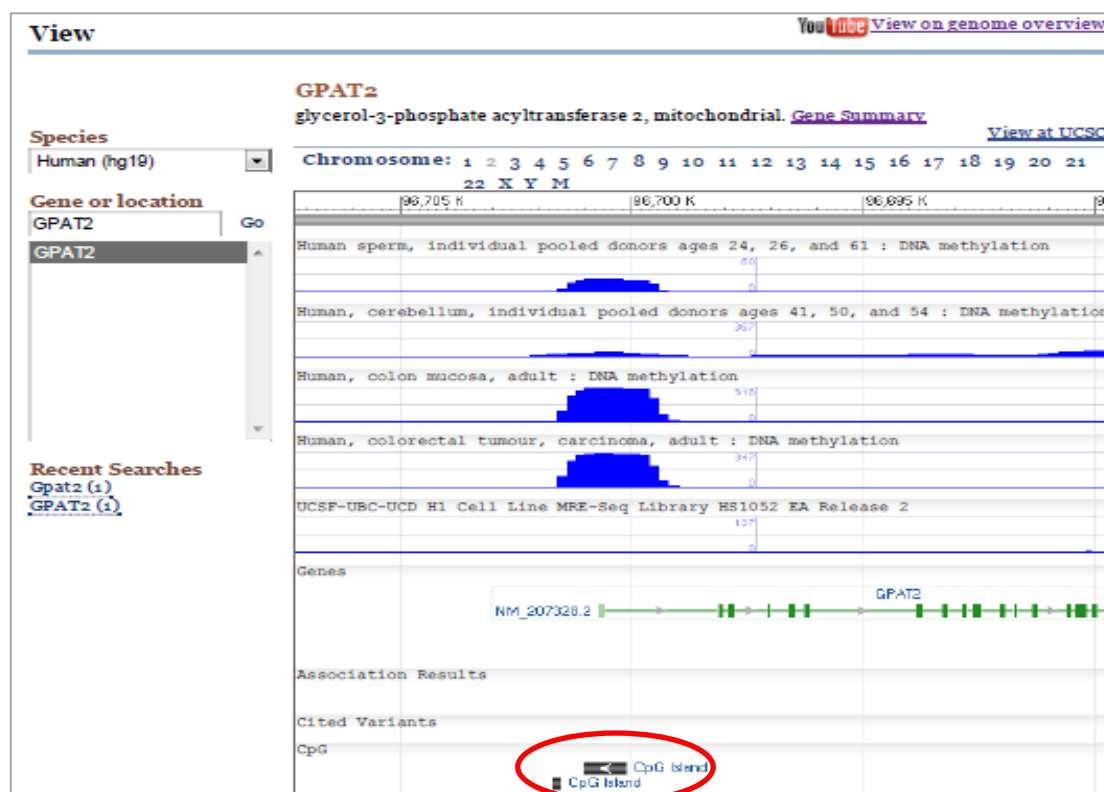


Figura 2.9. Análisis de la presencia de Islas CpG circundando el primer exón de *GPAT2* humana. Se realizó una búsqueda con la herramienta *Epigenomics* de NCBI. Se detectaron dos posibles Islas CpG (círculo rojo).

Por lo tanto, se diseñaron varios pares *primers* usando el sitio web *Methprimer* para analizar el estado de metilación de las Islas CpG de *GPAT2* en células derivadas de humano. En la figura 2.10 se muestra el resultado obtenido para el análisis de la región circundante al inicio de la transcripción de *GPAT2*. En este caso, el programa detecta una gran Isla CpG (de 860 pb, de -346 a +514), en lugar de dos como lo hace *Epigenomics*. Los pares de *primers* F1-R1 y F5-R5 (y algunas variantes, ver Figura 2.10) fueron adquiridos para analizar las dos regiones que éstos flanquean dentro de dicha gran Isla CpG para determinar el estado de metilación de las C de los pares CG, en líneas celulares humanas con una expresión basal elevada o baja *GPAT2* (ver sección 2.3.2). A partir de ahora, esas dos regiones que delimitan los pares de primers F1-R1 y F5-R5 se llamarán “Isla CpG 2” e “Isla CpG 1”, respectivamente, por su ubicación relativa con respecto al inicio de la transcripción (ver más adelante en figura 2.13).

Figura 2.10. Análisis de la Isla CpG De *GPAT2* por el sitio *MethPrimer*.

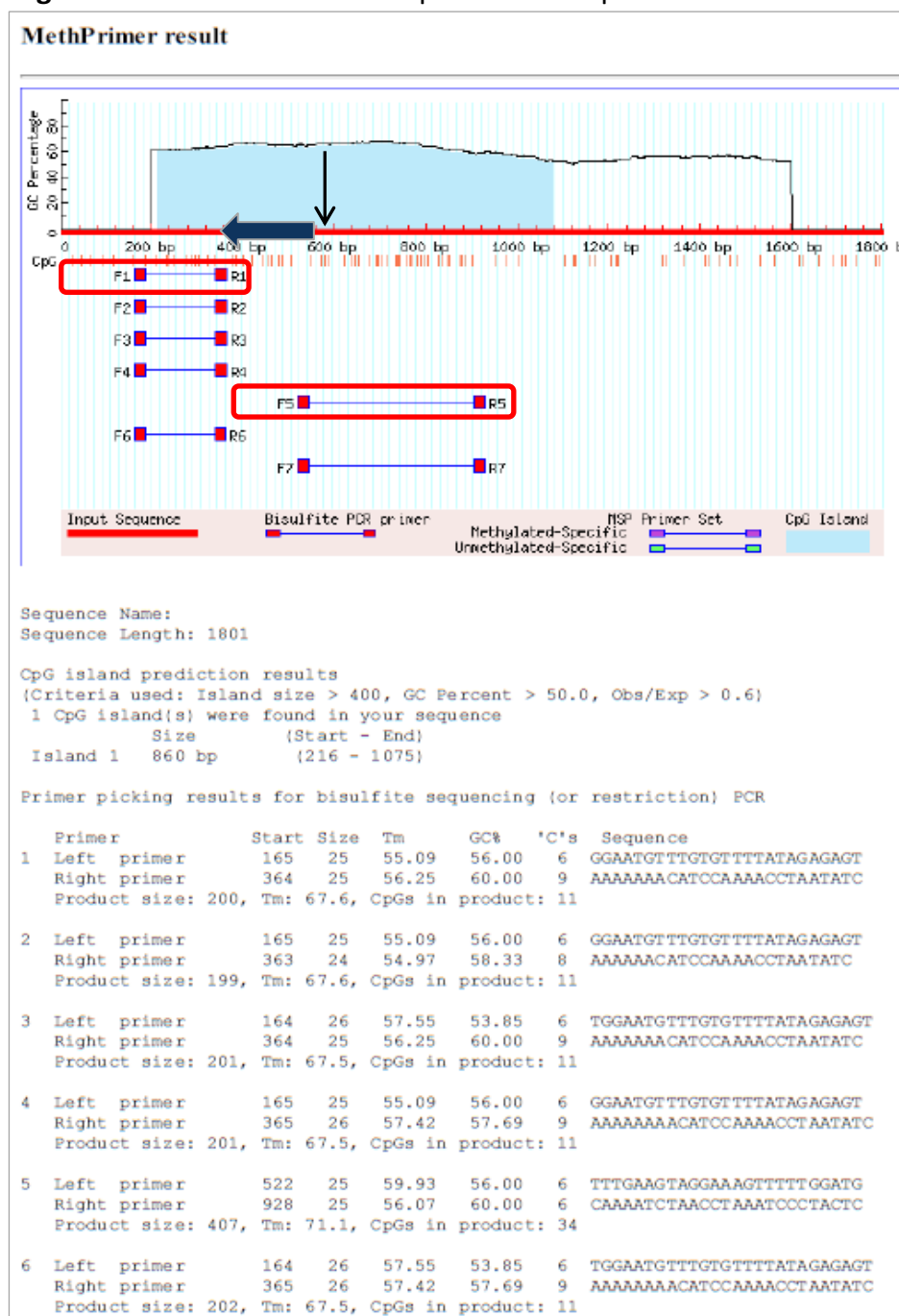
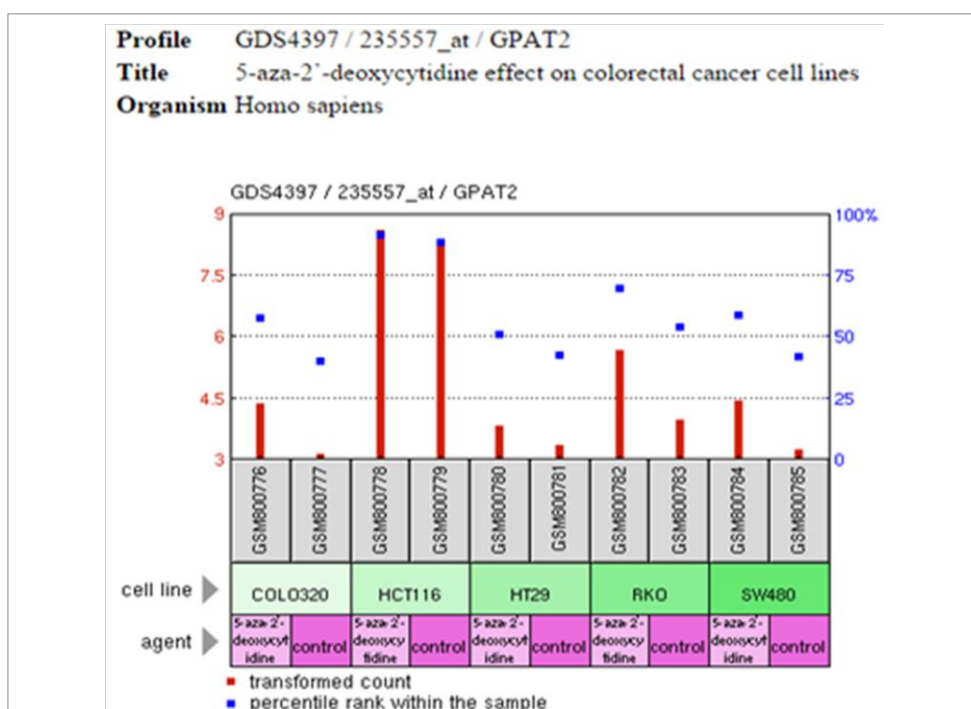


Figura 2.10. Análisis de la Isla CpG de *GPAT2* de humano por el programa *on line* *MethPrimer*. Se muestra la captura de pantalla resultante del análisis de la región circundante al inicio de la transcripción de *GPAT2*. Con una flecha se indica el inicio de la transcripción y con recuadros rojos la ubicación de los pares de primers utilizados. La flecha azul indica la dirección de síntesis del ARNm de *GPAT2*.

Además, haciendo uso de la aplicación *Geo Profiles* de NCBI e introduciendo las palabras clave “*GPAT2 Homo sapiens methylation*” se obtuvieron varios resultados que indican que la expresión de *GPAT2* estaría regulada por el estado de metilación de sus Islas CpG. Los resultados que se muestran en la figura 2.11 corresponden a tratamientos de células en cultivo con el inhibidor de la metilación DAC y con el inhibidor de la desacetilación TSA. Se observa que la administración de DAC aumenta la expresión de *GPAT2* en aquellas líneas celulares con bajos niveles basales de expresión de este gen.

Figura 2.11. Resultados *in silico* de experimentos que evidencian la influencia de la epigenética en la regulación de *GPAT2* de humano.

A



B

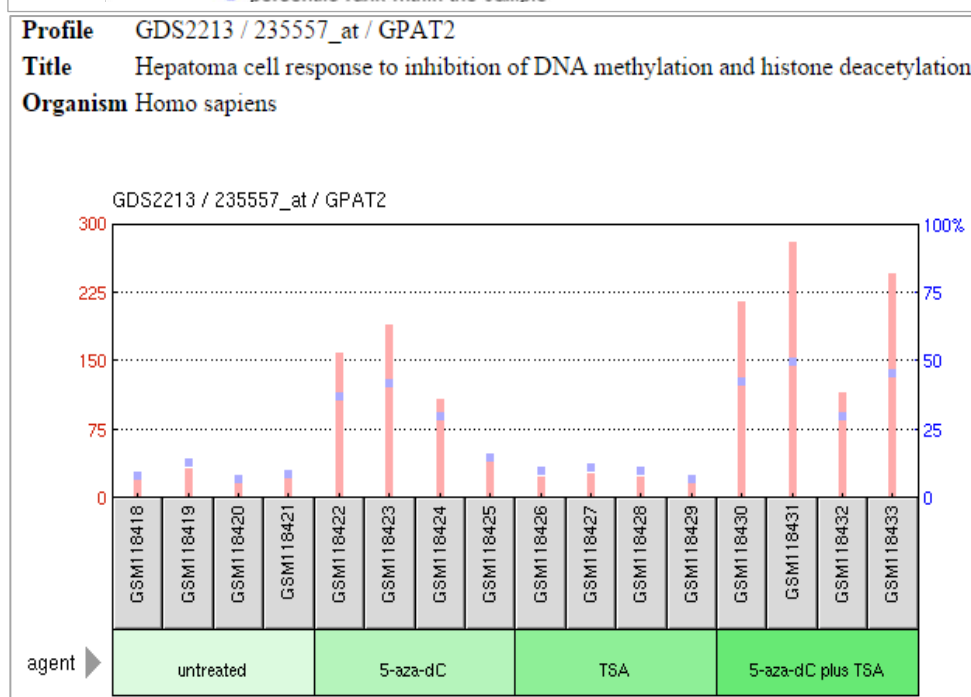
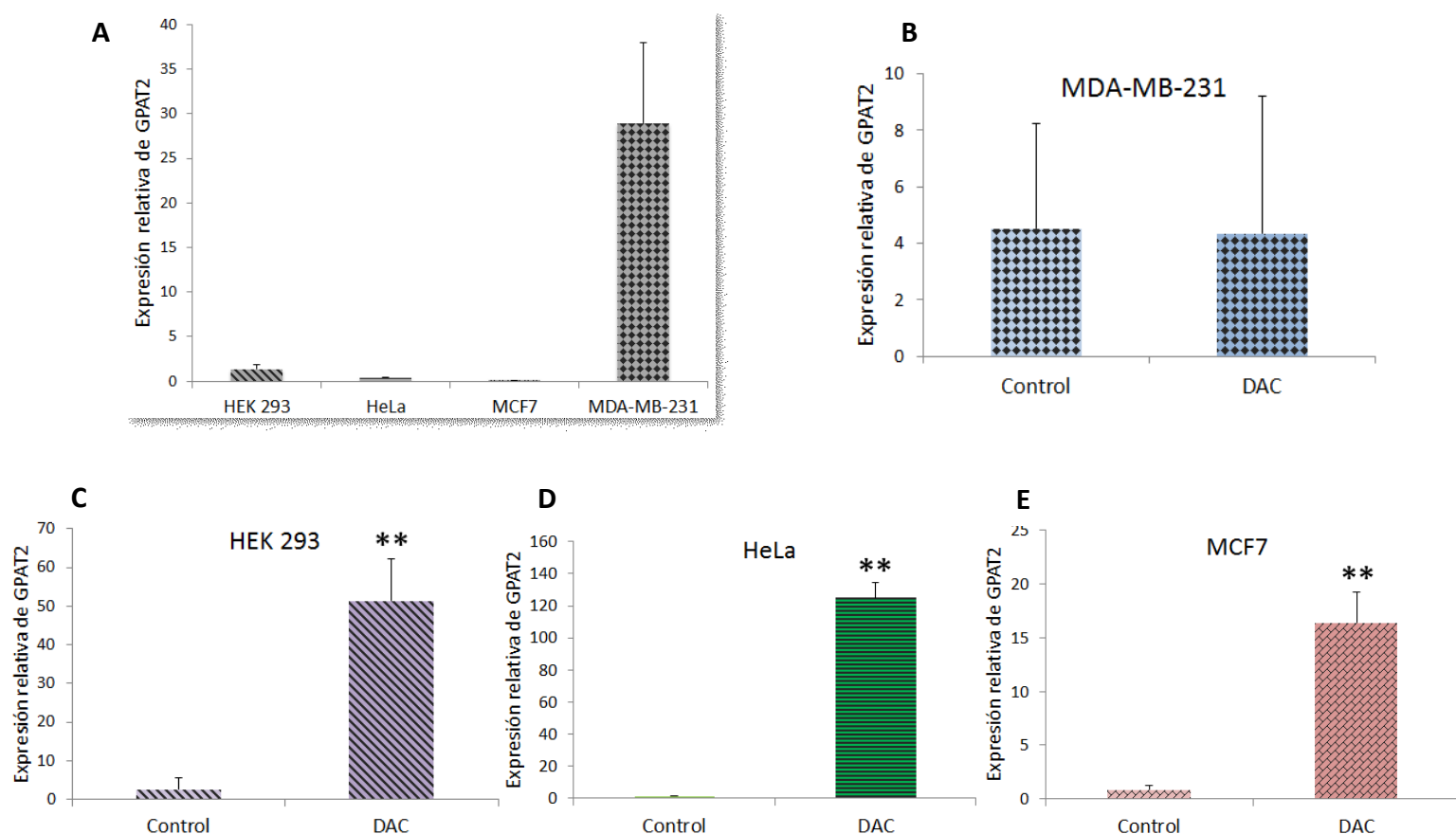


Figura 2.11. Resultados *in silico* que evidencian la influencia de la epigenética en la regulación de *GPAT2*. Captura de pantalla de los resultados encontrados en *Geo Profiles* de NCBI bajo las palabras clave “*GPAT2 homo sapiens methylation*”. En ambos experimentos se trató a una (B) o a varias líneas celulares (A) con DAC (A) o con DAC y TSA (B).

2.3.2. Regulación epigenética de *GPAT2* humana: resultados *in vitro*.

Para determinar experimentalmente el efecto de la metilación en la expresión de *GPAT2* humana, se incubaron 4 líneas celulares derivadas de humano con el inhibidor de la metilación DAC durante 4 días y luego se midió por qPCR el nivel de expresión de *GPAT2*. Se utilizaron 2 líneas tumorales con baja expresión basal de *GPAT2* (HeLa y MCF7), una línea embrionaria de baja expresión basal de *GPAT2* (HEK 293) y una línea tumoral con alta expresión basal de *GPAT2* (MDA-MB-231) (Figura 2.12 A). Como se observa en la figuras 2.12 B, C, D y E, la expresión de *GPAT2* aumentó abruptamente después del tratamiento con DAC en aquellas líneas que no expresaban este gen basalmente de manera significativa. En la línea celular MDA-MB-231 no hay diferencias significativas en el nivel de expresión de *GPAT2* antes y después del tratamiento. Además se probó si la presencia del inhibidor de la desacetilación TSA afectaba la expresión de *GPAT2* de manera aislada o en combinación con el DAC. A diferencia de lo observado *in silico* (Figura 2.11 B) y en la línea celular derivada de ratón RAW 264.7 (Figura 1.16), la expresión de *GPAT2* no se modificó por el agregado de TSA tanto en MDA-MB-231 como en el resto de las células en presencia o en ausencia de DAC. En la figuras 2.12 F y G se muestran los resultados obtenidos frente al agregado de TSA para las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF7.

Figura 2.12. La expresión de *GPAT2* está regulada por metilación. Experimentos *in vitro*.



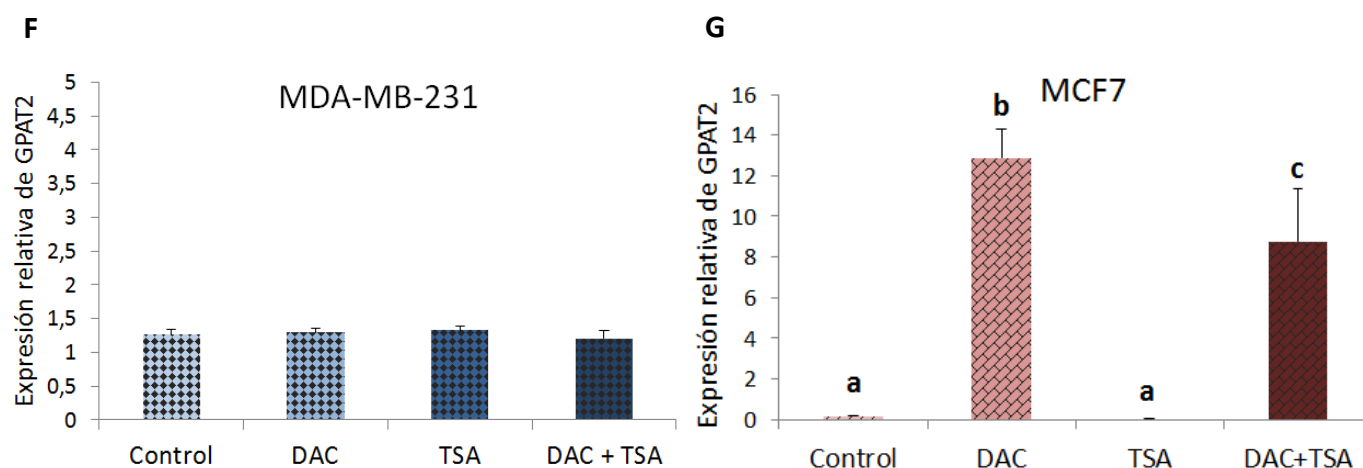


Figura 2.12. Experimentos *in vitro* que evidencian la regulación epigenética de *GPAT2* por metilación. En A se muestra la expresión relativa basal de *GPAT2* de las 4 líneas de humano utilizadas en los experimentos de incubación con DAC y TSA. En B, C, D y E se muestra la expresión de *GPAT2* de cada línea celular en presencia (DAC) o ausencia (Control, DMSO) de DAC. Cada experimento se realizó dos veces por triplicado, incubando a las células por 96 horas con DAC (2 μ M) o con volúmenes equivalentes de DMSO (Control). Se midió la expresión de *GPAT2* por qPCR, usando *BACTINA* como gen de referencia. ** $p < 0,01$ (Prueba t de Student). Además, se probó si el TSA actuaba sinérgicamente con DAC (F y G). Se muestran dos de los 4 resultados obtenidos (para MDA-MB-231 y MCF7) que evidencian la ausencia de sinergia entre DAC y TSA (500 nM) en líneas celulares de humano. Mismas letras indican igualdad estadística (ANOVA y test de Tukey).

Entonces, con la evidencia reunida a partir de los resultados *in silico* e *in vitro*, se decidió estudiar el estado de metilación de las Islas CpG de *GPAT2* de las líneas celulares antes mencionadas para confirmar si el grado de metilación de las mismas determina o no la expresión basal de *GPAT2*. Luego de tratar al ADN genómico de cada línea celular con bisulfito de sodio y haciendo uso de los pares de primers F1-R1 y F5-R5, se amplificaron por PCR las dos regiones de interés comprendidas en la gran Isla CpG detectada por el sitio *Methprimer*, llamadas “Isla CpG 2” e “Isla CpG 1”, respectivamente. En la figura 2.13 A se muestra un esquema de la región analizada circundante al inicio de la transcripción y la ubicación relativa de las dos Islas CpG. El estado de metilación para la línea celular MDA-MB-231 en la “Isla CpG 2” fue el más bajo de todos, en la cual el porcentaje de metilación total fue del 27 % (Figura 2.13 B). Esto correlaciona con el hecho de que sea la línea celular que más expresa *GPAT2*. Para la “Isla CpG 1” no se encontraron diferencias significativas entre las 4 líneas celulares.

Además, se clonó la región promotora y parte del primer intrón de *GPAT2* de humano que contiene a la gran Isla CpG detectada en el vector pGL3-BV que posee el gen de luciferasa como gen reportero y se metiló *in vitro*. Luego, éste y el control (mismo tratamiento pero sin la enzima Sss I) se co-transfectaron cada uno con el control interno pRL-TK en la línea celular HEK 293 y al cabo de 48 horas se midió la luminiscencia de luciferasa y se normalizó a la del control pRL-TK (Figura 2.14). **Se observa que la metilación afecta negativamente y de forma significativa la actividad del promotor de *GPAT2*.**

Figura 2.13. Análisis del estado de metilación de la región circundante al promotor de *GPAT2* *in vitro*.

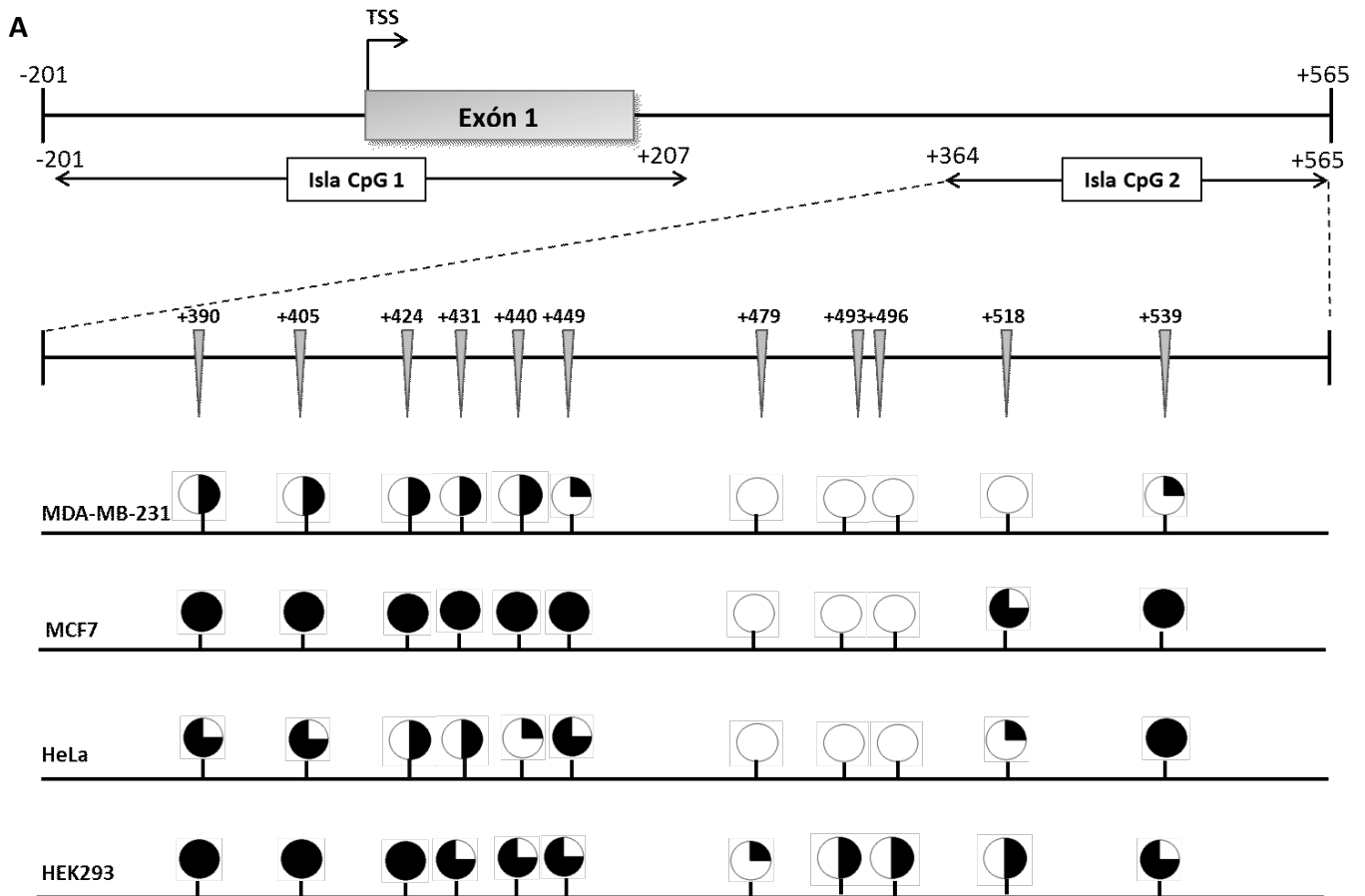


Figura 2.13. Análisis del estado de metilación de la región circundante al primer exón de *GPAT2*. Se extrajo ADN de las líneas celulares MDA-MB-231, MCF7, HeLa y HEK 293, se trató con bisulfito de sodio, por PCR se amplificaron las Islas CpG y se secuenciaron. En A se muestra para cada una la proporción promedio de metilación de esa posición entre todos los clones. Cada círculo representa un par CG, un círculo negro completo indica 100 % de metilación de esa posición, un círculo blanco indica 0 % de metilación y círculos parcialmente pintados indican proporciones intermedias de metilación. Por encima se muestra un esquema de la región promotora analizada y la ubicación de los pares CG. TSS: sitio de inicio de la transcripción. En B se muestra el porcentaje de metilación total para la Isla CpG 2 para cada línea celular. *** $p < 0,001$ (Test de Fisher)

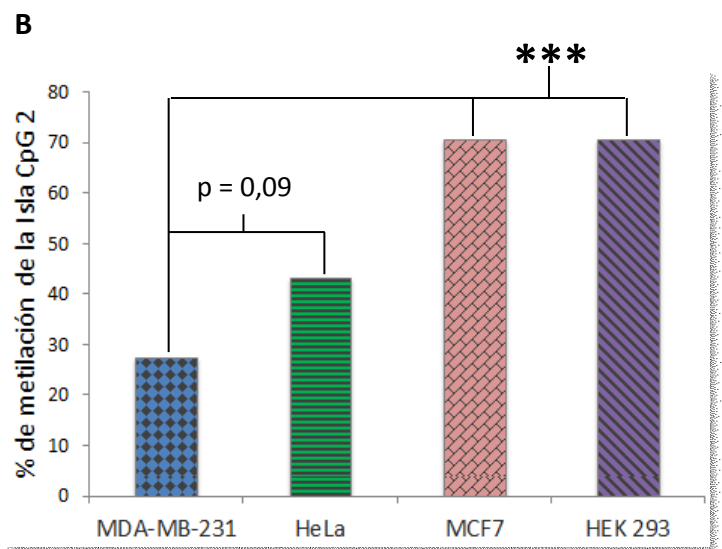


Figura 2.14. La metilación de la región circundante al sitio de inicio de la transcripción de *GPAT2* disminuye la actividad de su promotor.

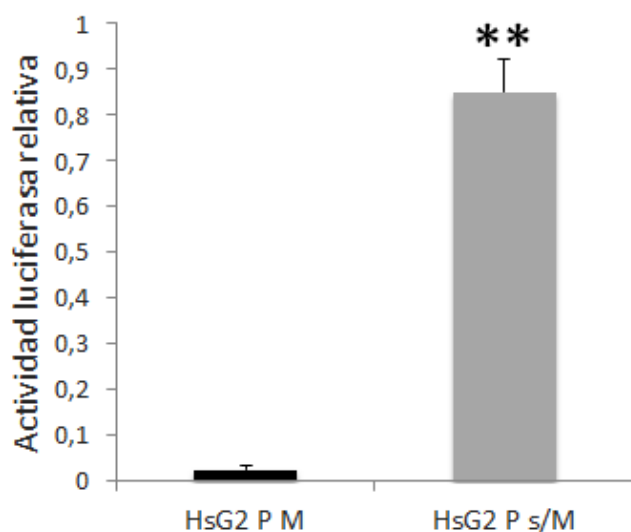


Figura 2.14. La metilación *in vitro* de la región circundante al primer exón de *GPAT2* afecta sensiblemente su actividad. Se clonó a la región que va de -2922 a +823 (abarca parte del promotor, el primer exón y parte del primer intrón del gen *GPAT2*) en pGL3-BV y se trató con S-adenosilmetionina en presencia de la enzima Sss I metiltransferasa (HsG2 P M) o en ausencia de la enzima (HsG2 P s/M). Se muestra el promedio ± DE de los duplicados de dos experimentos independientes. ** $p < 0,01$ (Prueba t de Student).

Varios trabajos de investigación han demostrado que **la expresión aberrante de CTAs en células tumorales está mediada en gran parte por alteraciones en la metilación del ADN** [125]. Esto nos motivó a buscar resultados *in silico* que demostraran que la expresión de *GPAT2* también podría estar regulada por estos mecanismos en humano y se encontró evidencia suficiente de una posible regulación de *GPAT2* por metilación de la región circundante al primer exón. Entonces, se procedió a estudiar el efecto de DAC (y TSA) en cuatro líneas celulares: una con alta expresión de *GPAT2* (MDA-MB-231) y otras tres con baja expresión basal de *GPAT2* (HEK293, MCF7 y HeLa). **La expresión de *GPAT2* aumentó significativamente luego del tratamiento con DAC en aquellas líneas celulares que presentaban una baja expresión basal de este gen**, aunque no se observaron diferencias en la expresión de *GPAT2* en las células tratadas con DAC y DAC+TSA o con TSA sólo y el Control, lo que indicaría que **para la isoforma humana la desacetilación de H es un mecanismo menos importante en la regulación de su transcripción**. Por el contrario, la expresión de *GPAT2* en MDA-MB-231 no se vio afectada por el tratamiento con estas drogas. Por lo tanto se podría plantear que la expresión de *GPAT2* no varía en MDA-MB-231 en presencia de DAC ya que su promotor se encuentra previamente hipometilado. Para corroborar esta hipótesis, se estudió el estado de metilación de las C en las dos Islas CpG encontradas en la región circundante al inicio de la transcripción de *GPAT2*. **La línea celular MDA-MB-231 presenta el mínimo grado de metilación en esta región, lo que explicaría en parte por qué no se observan cambios en la expresión de *GPAT2* cuando se usa DAC y la elevada tasa de expresión basal del gen**. Además observamos que la metilación del promotor *in vitro* disminuye significativamente su actividad. En conclusión, los resultados

expuestos, obtenidos *in silico* e *in vitro*, indican **una fuerte relación entre el estado de metilación de la región circundante al promotor de *GPAT2* y su nivel de expresión, siendo éste mayor cuando dicha región analizada se encuentra hipometilada.**

Por lo tanto, el hecho de que ***GPAT2* esté regulado epigenéticamente por metilación de sus Islas CpG es un indicio más que reforzaría la hipótesis de que se trata de un integrante de la familia de los CTA, ya que es un mecanismo regulatorio común para este grupo de genes.** Estudios en biopsias de tumores humanos que expresen o no *GPAT2* con el objetivo de determinar el estado de metilación de las Islas CpG encontradas serán de utilidad para poder establecer si éste es el mecanismo epigenético que está operando *in vivo*, regulando la expresión aberrante de *GPAT2* en los mismos.

CONCLUSIONES

1. ***Gpat2* se expresa en espermátocitos en paquíteno y su perfil de expresión pre y posnatal en ratón coincide con el de *Mili* (Piwil2), lo que correlaciona y fortalece el hallazgo de que sea una proteína de importancia en la biogénesis de piRNAs.** Este trabajo de tesis aportó información de importancia para validar la hipótesis de que GPAT2 cumple algún otro rol en el metabolismo celular que el de aciltransferasa, contribuyendo y enriqueciendo el descubrimiento de que esta isoforma sea importante en la biogénesis de los piRNAs.
2. **La expresión de *Gpat2* de ratón está regulada a nivel epigenético y por ácido retinoico.** Tanto la presencia de RA, como la desacetilación de H y la desmetilación de su Isla CpG, aumentaron la expresión de *Gpat2* *in vitro* e *in vivo* en el último caso. Varios trabajos han demostrado que estos mecanismos pueden actuar de forma coordinada para la regular la transcripción génica, por lo que se propone que *Gpat2* esté regulado *in vivo* por la acción conjunta de estos procesos.
3. **GPAT2 es una proteína de importancia en la espermatogénesis, ya que el silenciamiento de *Gpat2* *in vivo* afecta al proceso espermatogénico.** Una posible explicación para este hecho es que el silenciamiento de *Gpat2* afecte la actividad conjunta con MILI, lo que alteraría la biogénesis de los piRNA de paquíteno.
4. **La isoforma GPAT2 humana se expresa en altos niveles en líneas celulares humanas derivadas de tumor y en ciertos tipos de tumores humanos y su expresión influye en el desarrollo del fenotipo tumoral.** Esto refuerza aún más la hipótesis de que esta proteína deba estar incluida dentro de la familia de CTA, ya que en general estos genes cumplen alguna función de importancia en el proceso de transformación tumoral.
5. **Un mecanismo de importancia para explicar la expresión de GPAT2 en células tumorales es la hipometilación de la región circundante al primer exón.** La principal causa de expresión ectópica de CTA en tejidos diferentes al testículo es el cambio en la metilación de las Islas CpG que se encuentren regulando la transcripción del gen. Por lo tanto, este hallazgo refuerza aún más la incorporación de GPAT2 al grupo de los CTAs y la vuelve una proteína interesante en clínica para el tratamiento inmunodirigido contra el cáncer.

REFERENCIAS

- [1] Hermo L, Pelletier RM, Cyr DG, Smith CE. Surfing the wave, cycle, life history, and genes/proteins expressed by testicular germ cells. Part 1: Background to Spermatogenesis, Spermatogonia, and Spermatocytes. *Microscopy Research And Technique*, 2010; 73(4):241-78.
- [2] Cheng CY, Mruk DD. The blood-testis barrier and its implications for male contraception. *Pharmacological Reviews*, 2012; 64:16-64.
- [3] Cornwall G, von Horsten H. Sperm Maturation in the Epididymis. In: Carrell D, editor. *The Genetics of Male Infertility*: Humana Press, 2007. p. 211-31. ISBN 1-58829-863-9.
- [4] Yan Cheng C (Ed). *Molecular Mechanisms in Spermatogenesis*. *Advances In Experimental Medicine And Biology*, 2008. ISBN: 978-0-387-79990-2.
- [5] Amann RP. The cycle of the seminiferous epithelium in humans: a need to revisit? *Journal Of Andrology*, 2008; 29:469-87.
- [6] Heller CH, Clermont Y. Kinetics of the germinal epithelium in man. *Recent Progress In Hormone Research*, 1964; 20:545-75.
- [7] Clermont Y. The cycle of the seminiferous epithelium in man. *The American Journal Of Anatomy*, 1963; 112:35-51.
- [8] Oakberg EF. Duration of spermatogenesis in the mouse and timing of stages of the cycle of the seminiferous epithelium. *The American Journal Of Anatomy*, 1956; 99:507-16.
- [9] Clermont Y, Trott M. Duration of the cycle of the seminiferous epithelium in the mouse and hamster determined by means of 3H-thymidine and radioautography. *Fertility And Sterility*, 1969; 20:805-17.
- [10] Russell LD, Brinster RL. Ultrastructural observations of spermatogenesis following transplantation of rat testis cells into mouse seminiferous tubules. *Journal Of Andrology*, 1996; 17:615-27.
- [11] Franca LR, Parreira GG, Gates RJ, Russell LD. Hormonal regulation of spermatogenesis in the hypophysectomized rat: quantitation of germ-cell population and effect of elimination of residual testosterone after long-term hypophysectomy. *Journal Of Andrology*, 1998;19:335-40.
- [12] Hess RA, de Franca LR. Spermatogenesis and Cycle of the Seminiferous Epithelium; In: *Molecular Mechanisms in Spermatogenesis*. *Advances In Experimental Medicine And Biology*, 2008. p. 1-15. ISBN 978-0-387-09597-4.
- [13] Clermont Y, Leblond CP, Messier B. Duration of the cycle of the seminal epithelium of the rat. *Archives D'anatomie Microscopique Et De Morphologie Experimentale*, 1959; 48(Suppl):37-55.
- [14] Hilscher W. Contributions to the orthology and pathology of "spermatogoniogenesis" in rats. *Beitrage Zur Pathologischen Anatomie Und Zur Allgemeinen Pathologie*, 1964; 130:69-132.
- [15] Clermont Y, Harvey S. Duration of the cycle of the seminiferous epithelium of normal, hypophysectomized and hypophysectomized-hormone treated albino rats. *Endocrinology*, 1965; 76:80-9.
- [16] Aslam H, Rosiepen G, Krishnamurthy H, Arslan M, Clemen G, Nieschlag E, *et al.* The cycle duration of the seminiferous epithelium remains unaltered during GnRH antagonist-induced testicular involution in rats and monkeys. *The Journal Of Endocrinology*, 1999;161:281-8.
- [17] Leblond C, Clermont Y. Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. *Annals Of The New York Academy Of Sciences*, 1952; 55:548-73.
- [18] Hess RA. Quantitative and qualitative characteristics of the stages and transitions in the cycle of the rat seminiferous epithelium: light microscopic observations of perfusion-fixed and plastic-embedded testes. *Biology Of Reproduction*, 1990;43:525-42.

- [19] Marty MS, Chapin RE, Parks LG, Thorsrud BA. Development and maturation of the male reproductive system. Birth defects research, Part B. Developmental And Reproductive Toxicology, 2003; 68:125-36.
- [20] O'Flynn O'Brien KL, Varghese AC, Agarwal A. The genetic causes of male factor infertility: a review. Fertility And Sterility, 2010; 93:1-12.
- [21] Jamsai D, O'Bryan MK. Mouse models in male fertility research. Asian Journal Of Andrology, 2011;13:139-51.
- [22] Laiho A, Kotaja N, Gyenesei A, Sironen A. Transcriptome profiling of the murine testis during the first wave of spermatogenesis. PloS One, 2013; 8:e61558.
- [23] Print CG, Loveland KL. Germ cell suicide: new insights into apoptosis during spermatogenesis. BioEssays, 2000; 22(5):423-30.
- [24] Kotaja N. MicroRNAs and spermatogenesis. Fertility And Sterility, 2014;101:1552-62.
- [25] Sinha Hikim AP, Swerdloff RS. Hormonal and genetic control of germ cell apoptosis in the testis. Reviews Of Reproduction, 1999; 4(1):38-47.
- [26] Zheng K, Wang PJ. Blockade of pachytene piRNA biogenesis reveals a novel requirement for maintaining post-meiotic germline genome integrity. PLoS Genetics, 2012; 8:e1003038.
- [27] Ruwanpura SM, McLachlan RI, Meachem SJ. Hormonal regulation of male germ cell development. The Journal Of Endocrinology, 2010; 205:117-31.
- [28] Holdcraft RW, Braun RE. Hormonal regulation of spermatogenesis. International Journal of Andrology, 2004; 27(6):335-42.
- [29] Carreau S, Bouraima-Lelong H, Delalande C. Estrogen, a female hormone involved in spermatogenesis. Advances In Medical Sciences, 2012; 57:31-6.
- [30] Meroni SB, Cigorraga SB. Fisiología de la célula de Sertoli y su relación con la espermatogénesis. En: Fisiopatología Endócrina, Fascículo 11. Separata Motpellier, 2007; Vol. 15 (6).
- [31] Verhoeven G, Willems A, Denolet E, Swinnen JV, De Gendt K. Androgens and spermatogenesis: lessons from transgenic mouse models. Philosophical Transactions Of The Royal Society Of London Series B, Biological Sciences, 2010; 365:1537-56.
- [32] Vera Y, Erkkila K, Wang C, Nunez C, Kytanen S, Lue Y, *et al.* Involvement of p38 mitogen-activated protein kinase and inducible nitric oxide synthase in apoptotic signaling of murine and human male germ cells after hormone deprivation. Molecular Endocrinology, 2006; 20:1597-609.
- [33] Rodríguez Vela L, Rioja Sanz LA. Principales causas de infertilidad masculina. Actualización En Andrología, 1999. ISBN 978-84-86671-55-6.
- [34] Hogarth CA, Griswold MD. The key role of vitamin A in spermatogenesis. The Journal Of Clinical Investigation, 2010; 120:956-62.
- [35] Raverdeau M, Gely-Pernot A, Féret B, *et al.* Retinoic acid induces Sertoli cell paracrine signals for spermatogonia differentiation but cell autonomously drives spermatocyte meiosis. PNAS, 2012; 109.
- [36] Samarut E, Rochette-Egly C. Nuclear retinoic acid receptors: conductors of the retinoic acid symphony during development. Molecular And Cellular Endocrinology, 2012;348:348-60.
- [37] Livera G, Rouiller-Fabre V, Pairault C, Levacher C, Habert R. Regulation and perturbation of testicular functions by vitamin A. Reproduction, 2002; 124(2):173-80.
- [38] Rossi P, Dolci S. Paracrine mechanisms involved in the control of early stages of mammalian spermatogenesis. Frontiers In Endocrinology, 2013; 4:181.
- [39] Schenk T, Stengel S, Zelent A. Unlocking the potential of retinoic acid in anticancer therapy. British Journal Of Cancer, 2014; 111:2039-45.

- [40] Urvalek A, Laursen KB, Gudas LJ. The roles of retinoic acid and retinoic acid receptors in inducing epigenetic changes. *Sub-Cellular Biochemistry*, 2014; 70:129-49.
- [41] Wolffe AP. Epigenetics: Regulation Through Repression. *Science*, 1999; 286:481-6.
- [42] Rajender S, Avery K, Agarwal A. Epigenetics, spermatogenesis and male infertility. *Mutation Research*, 2011; 727:62-71.
- [43] Schaefer CB, Ooi SK, Bestor TH, Bourc'his D. Epigenetic decisions in mammalian germ cells. *Science*, 2007; 316:398-9.
- [44] Houshdaran S, Cortessis VK, Siegmund K, Yang A, Laird PW, Sokol RZ. Widespread epigenetic abnormalities suggest a broad DNA methylation erasure defect in abnormal human sperm. *PloS One*, 2007; 2:e1289.
- [45] Kobayashi H, Sato A, Otsu E, Hiura H, Tomatsu C, Utsunomiya T, *et al.* Aberrant DNA methylation of imprinted loci in sperm from oligospermic patients. *Human Molecular Genetics* 2007; 16:2542-51.
- [46] Sonnack KF, Bergmann M, Steger K. Expression of hyperacetylated histone H4 during normal and impaired human spermatogenesis. *Andrologia* 2002; 34(6):384-90.
- [47] Meikar O, Da Ros M, Kotaja N. Epigenetic regulation of male germ cell differentiation. *Sub-cellular Biochemistry*, 2013;61:119-38.
- [48] Papaioannou MD, Lagarrigue M, Vejnar CE, Rolland AD, Kuhne F, Aubry F, *et al.* Loss of Dicer in Sertoli cells has a major impact on the testicular proteome of mice. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2011; 10(4):M900587MCP200.
- [49] Korhonen HM, Meikar O, Yadav RP, Papaioannou MD, Romero Y, Da Ros M, *et al.* Dicer is required for haploid male germ cell differentiation in mice. *PloS One*, 2011; 6:e24821.
- [50] Carmell MA, Girard A, van de Kant HJ, Bourc'his D, Bestor TH, de Rooij DG, *et al.* MIWI2 is essential for spermatogenesis and repression of transposons in the mouse male germline. *Developmental Cell*, 2007; 12:503-14.
- [51] Kuramochi-Miyagawa S, Kimura T, Ijiri TW, Isobe T, Asada N, Fujita Y, *et al.* Mili, a mammalian member of piwi family gene, is essential for spermatogenesis. *Development*, 2004; 131:839-49.
- [52] Yadav RP, Kotaja N. Small RNAs in spermatogenesis. *Molecular And Cellular Endocrinology*, 2014; 382:498-508.
- [53] Wendel AA, Lewin TM, Coleman RA. Glycerol-3-phosphate acyltransferases: rate limiting enzymes of triacylglycerol biosynthesis. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 2009; 1791:501-6.
- [54] Lewin TM, Schwerbrock NM, Lee DP, Coleman RA. Identification of a new glycerol-3-phosphate acyltransferase isoenzyme, mtGPAT2, in mitochondria. *The Journal Of Biological Chemistry*, 2004; 279:13488-95.
- [55] Wang S, Lee DP, Gong N, Schwerbrock NMJ, Mashek DG, Gonzalez-Baró 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). *Archives Of Biochemistry And Biophysics*, 2007; 465(2):347-58.
- [56] Garcia-Fabiani MB, Montanaro MA, Lacunza E, Cattaneo ER, Coleman RA, Pellon-Maison M, *et al.* Methylation of the Gpat2 promoter regulates transient expression during mouse spermatogenesis. *The Biochemical Journal*, 2015; 471(2):211-20.
- [57] Cattaneo E, Pellon-Maison M, Rabassa M, Lacunza E, Coleman RA, Gonzalez-Baro MR. Glycerol-3-phosphate acyltransferase-2 is expressed in spermatogenic germ cells and incorporates arachidonic acid into triacylglycerols. *PloS One*, 2012; 7:e42986.
- [58] Shiromoto Y, Kuramochi-Miyagawa S, Daiba A, Chuma S, Katanaya A, Katsumata A, *et al.* GPAT2, a mitochondrial outer membrane protein, in piRNA biogenesis in germline stem cells. *RNA*, 2013; 19:803-10.

- [59] Cheng YH, Wong EW, Cheng CY. Cancer/testis (CT) antigens, carcinogenesis and spermatogenesis. *Spermatogenesis*, 2011; 1:209-20.
- [60] Chen YT, Ross DS, Chiu R, Zhou XK, Chen YY, Lee P, *et al.* Multiple cancer/testis antigens are preferentially expressed in hormone-receptor negative and high-grade breast cancers. *PloS One*, 2011; 6:e17876.
- [61] Satie AP, Rajpert-De Meyts E, Spagnoli GC, Henno S, Olivo L, Jacobsen GK, *et al.* The cancer-testis gene, NY-ESO-1, is expressed in normal fetal and adult testes and in spermatocytic seminomas and testicular carcinoma in situ. *Laboratory Investigation; A Journal Of Technical Methods And Pathology*, 2002; 82:775-80.
- [62] Silina K, Zayakin P, Kalnina Z, Ivanova L, Meistere I, Endzelins E, *et al.* Sperm-associated antigens as targets for cancer immunotherapy: expression pattern and humoral immune response in cancer patients. *Journal Of Immunotherapy*, 2011; 34:28-44.
- [63] Ghafouri-Fard S, Modarressi MH. Cancer-Testis Antigens: Potential Targets for Cancer Immunotherapy. *Archives Of Iranian Medicine*, 2009; 12(4):395-404.
- [64] Condomines M, Hose D, Reme T, Requirand G, Hundemer M, Schoenhals M, *et al.* Gene expression profiling and real-time PCR analyses identify novel potential cancer-testis antigens in multiple myeloma. *Journal Of Immunology*, 2009; 183:832-40.
- [65] Inoue H, Nojima H, Okayama H. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*, 1990; 96:23-8.
- [66] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold spring harbor laboratory press; 1989. ISBN-10: 1936113422.
- [67] Boucheron C, Baxendale V. Isolation and purification of murine male germ cells. *Methods In Molecular Biology*, 2012; 825:59-66.
- [68] Frommer M, McDonald LE, Millar DS, Collis CM, Watt F, Grigg GW, *et al.* A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1992; 89:1827-31.
- [69] Darst RP, Pardo CE, Ai L, Brown KD, Kladde MP. Bisulfite sequencing of DNA. *Current Protocols In Molecular Biology*. Edited by Ausubel FM *et al.*, 2010; Chapter 7:Unit 7 9 1-17. ISBN: 9780471142720.
- [70] Paterson JM, Holmes MC, Kenyon CJ, Carter R, Mullins JJ, Seckl JR. Liver-selective transgene rescue of hypothalamic-pituitary-adrenal axis dysfunction in 11-beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1-deficient mice. *Endocrinology*, 2007; 148:961-6.
- [71] Barakat B, O'Connor AE, Gold E, de Kretser DM, Loveland KL. Inhibin, activin, follistatin and FSH serum levels and testicular production are highly modulated during the first spermatogenic wave in mice. *Reproduction*, 2008; 136:345-59.
- [72] Hilakivi-Clarke L, Raygada M, Cho E. Serum estradiol levels and ethanol-induced aggression. *Pharmacology, Biochemistry, And Behavior*, 1997; 58:785-91.
- [73] Obrochta KM, Kane MA, Napoli JL. Effects of diet and strain on mouse serum and tissue retinoid concentrations. *PloS One*, 2014; 9:e99435.
- [74] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal Of Immunological Methods*, 1983; 65(1-2):55-63
- [75] Price JE, Polyzos A, Zhang RD, Daniels LM. Tumorigenicity and metastasis of human breast carcinoma cell lines in nude mice. *Cancer Research*, 1990; 50:717-21.
- [76] Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, 1987; 1(2):581-5.
- [77] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 1976; 72:248-54.

- [78] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970; 227:680-5.
- [79] Green MR, Sambrook J. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012. ISBN 978-1-936113-42-2.
- [80] Gong ZK, Wang SJ, Huang YQ, Zhao RQ, Zhu QF, Lin WZ. Identification and validation of suitable reference genes for RT-qPCR analysis in mouse testis development. *Molecular Genetics And Genomics*, 2014; 289:1157-69.
- [81] Chen C, Ouyang W, Grigura V, Zhou Q, Carnes K, Lim H, *et al.* ERM is required for transcriptional control of the spermatogonial stem cell niche. *Nature*, 2005; 436:1030-4.
- [82] Girard A, Sachidanandam R, Hannon GJ, Carmell MA. A germline-specific class of small RNAs binds mammalian Piwi proteins. *Nature*, 2006; 442:199-202.
- [83] Ross RJ, Weiner MM, Lin H. PIWI proteins and PIWI-interacting RNAs in the soma. *Nature*, 2014; 505:353-9.
- [84] Chuma S, Nakano T. piRNA and spermatogenesis in mice. *Philosophical Transactions Of The Royal Society Of London Series B, Biological Sciences*, 2013; 368(1609):20110338.
- [85] Kuramochi-Miyagawa S, Watanabe T, Gotoh K, Totoki Y, Toyoda A, Ikawa M, *et al.* DNA methylation of retrotransposon genes is regulated by Piwi family members MILI and MIWI2 in murine fetal testes. *Genes & Development*, 2008; 22:908-17.
- [86] Di Giacomo M, Comazzetto S, Saini H, De Fazio S, Carrieri C, Morgan M, *et al.* Multiple epigenetic mechanisms and the piRNA pathway enforce LINE1 silencing during adult spermatogenesis. *Molecular Cell*, 2013; 50:601-8.
- [87] De Fazio S, Bartonicek N, Di Giacomo M, Abreu-Goodger C, Sankar A, Funaya C, *et al.* The endonuclease activity of Mili fuels piRNA amplification that silences LINE1 elements. *Nature*, 2011; 480:259-63.
- [88] Sato K, Siomi MC. Piwi-interacting RNAs: biological functions and biogenesis. *Essays In Biochemistry*, 2013; 54:39-52.
- [89] Kota SK, Feil R. Epigenetic transitions in germ cell development and meiosis. *Developmental Cell*, 2010; 19:675-86.
- [90] Sasaki H, Matsui Y. Epigenetic events in mammalian germ-cell development: reprogramming and beyond. *Nature Reviews Genetics*, 2008; 9:129-40.
- [91] Peng JC, Lin H. Beyond transposons: the epigenetic and somatic functions of the Piwi-piRNA mechanism. *Current Opinion In Cell Biology*, 2013; 25:190-4.
- [92] Holloch D, Moazed D. RNA-mediated epigenetic regulation of gene expression. *Nature Reviews Genetics*, 2015; 16:71-84.
- [93] Nishimasu H, Ishizu H, Saito K, Fukuhara S, Kamatani MK, Bonnefond L, *et al.* Structure and function of Zucchini endoribonuclease in piRNA biogenesis. *Nature*, 2012; 491:284-7.
- [94] Ipsaro JJ, Haase AD, Knott SR, Joshua-Tor L, Hannon GJ. The structural biochemistry of Zucchini implicates it as a nuclease in piRNA biogenesis. *Nature*, 2012; 491:279-83.
- [95] Watanabe T, Chuma S, Yamamoto Y, Kuramochi-Miyagawa S, Totoki Y, Toyoda A, *et al.* MITOPLD is a mitochondrial protein essential for nuage formation and piRNA biogenesis in the mouse germline. *Developmental Cell*, 2011; 20:364-75.
- [96] Vernet N, Dennefeld C, Rochette-Egly C, Oulad-Abdelghani M, Chambon P, Ghyselinck NB, *et al.* Retinoic acid metabolism and signaling pathways in the adult and developing mouse testis. *Endocrinology*, 2006; 147:96-110.
- [97] Hamilton KJ, Arao Y, Korach KS. Estrogen hormone physiology: reproductive findings from estrogen receptor mutant mice. *Reproductive Biology*, 2014; 14:3-8.

- [98] O'donnell L, Robertson KM, Jones ME, Simpson ER. Estrogen and Spermatogenesis. *Endocrine Reviews*, 2001; 22(3):289-318.
- [99] Gaunt SJ, Paul YL. Synergistic action in P19 pluripotent cells of retinoic acid and Wnt3a on Cdx1 enhancer elements. *The International Journal Of Developmental Biology*, 2014; 58:307-14.
- [100] Kobayashi T, Suzuki M, Morikawa M, Kino K, Tanuma S, Miyazawa H. Transcriptional regulation of Tal2 gene by all-trans retinoic acid (atRA) in P19 cells. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 2015; 38:248-56.
- [101] Marcucci H, Paoletti L, Jackowski S, Banchio C. Phosphatidylcholine biosynthesis during neuronal differentiation and its role in cell fate determination. *The Journal Of Biological Chemistry*, 2010; 285:25382-93.
- [102] Al Tanoury Z, Piskunov A, Rochette-Egly C. Vitamin A and retinoid signaling: genomic and nongenomic effects. *Journal Of Lipid Research*, 2013; 54:1761-75.
- [103] McGrane MM. Vitamin A regulation of gene expression: molecular mechanism of a prototype gene. *The Journal Of Nutritional Biochemistry*, 2007; 18:497-508.
- [104] Takai D, Jones PA. Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22. *PNAS*, 2002; 99:3740-5.
- [105] Rhee JK, Kim K, Chae H, Evans J, Yan P, Zhang BT, *et al.* Integrated analysis of genome-wide DNA methylation and gene expression profiles in molecular subtypes of breast cancer. *Nucleic Acids Research*, 2013; 41(18):8464-74
- [106] Chuang TJ, Chen FC, Chen YZ. Position-dependent correlations between DNA methylation and the evolutionary rates of mammalian coding exons. *PNAS*, 2012; 109:15841-6.
- [107] Dada R, Kumar M, Jesudasan R, Fernandez JL, Gosalvez J, Agarwal A. Epigenetics and its role in male infertility. *Journal Of Assisted Reproduction And Genetics*, 2012; 29:213-23.
- [108] Christman JK. 5-Azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: mechanistic studies and their implications for cancer therapy. *Oncogene*, 2002; 21:5483-95.
- [109] Vigushin DM, Ali S, Pace PE, Mirsaidi N, Ito K, Adcock I, Coombes RC. Trichostatin A is a histone deacetylase inhibitor with potent antitumor activity against breast cancer *in vivo*. *Clinical Cancer Research*, 2001; 7(4):971-6.
- [110] Cameron EE, Bachman KE, Myöhänen S, Herman JG, Baylin SB. Synergy of demethylation and histone deacetylase inhibition in the re-expression of genes silenced in cancer. *Nature*, 1999; 21(1):103-7.
- [111] Fazi F, Travaglini L, Carotti D, Palitti F, Diverio D, Alcalay M, *et al.* Retinoic acid targets DNA-methyltransferases and histone deacetylases during APL blast differentiation *in vitro* and *in vivo*. *Oncogene*, 2005; 24:1820-30.
- [112] Gudas LJ. Retinoids induce stem cell differentiation via epigenetic changes. *Seminars In Cell & Developmental Biology*, 2013; 24:701-5.
- [113] Bastien J, Rochette-Egly C. Nuclear retinoid receptors and the transcription of retinoid-target genes. *Gene*, 2004; 328:1-16.
- [114] Sims RJ (3rd), Reinberg D. Is there a code embedded in proteins that is based on post-translational modifications? *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 2008; 9:815-20.
- [115] Heo SH, Kwak J, Jang KL. All-trans retinoic acid induces p53-dependent apoptosis in human hepatocytes by activating p14 expression via promoter hypomethylation. *Cancer Letters*, 2015; 362:139-48.
- [116] Lim JS, Park SH, Jang KL. All-trans retinoic acid induces cellular senescence by up-regulating levels of p16 and p21 via promoter hypomethylation. *Biochemical And Biophysical Research Communications*, 2011; 412:500-5.

- [117] Rowling MJ, McMullen MH, Schalinske KL. Vitamin A and its derivatives induce hepatic glycine n-methyltransferase and hypomethylation of DNA in rats. *The Journal Of Nutrition*, 2001; 132(3):365-9.
- [118] Chi YH, Cheng LI, Myers T, Ward JM, Williams E, Su Q, *et al.* Requirement for Sun1 in the expression of meiotic reproductive genes and piRNA. *Development*, 2009; 136:965-73.
- [119] Gou LT, Dai P, Yang JH, Xue Y, Hu YP, Zhou Y, *et al.* Pachytene piRNAs instruct massive mRNA elimination during late spermiogenesis. *Cell Research*, 2014; 24:680-700.
- [120] McCall MN, Bolstad BM, Irizarry RA. Frozen robust multiarray analysis (fRMA). *Biostatistics*, 2010; 11:242-53.
- [121] Condomines M, Hose D, Raynaud P, Hundemer M, De Vos J, Baudard M, *et al.* Cancer/testis genes in multiple myeloma: expression patterns and prognosis value determined by microarray analysis. *The Journal of Immunology*, 2007; 178:3307-15.
- [122] Gjerstorff MF, Andersen MH, Ditzel HJ. Oncogenic cancer/testis antigens: prime candidates for immunotherapy. *Oncotarget*, 2015; 6:15772-87.
- [123] Simpson AJ, Caballero OL, Jungbluth A, Chen YT, Old LJ. Cancer/testis antigens, gametogenesis and cancer. *Nature Reviews. Cancer*, 2005; 5:615-25.
- [124] Janitz M, Fiszer D, Michalczak-Janitz K, Lukaszyk A, Fernandez N, Skorupski W, *et al.* Analysis of mRNA for class I HLA on human gametogenic cells. *Molecular Reproduction And Development*, 1994; 38:231-7.
- [125] Whitehurst AW. Cause and consequence of cancer/testis antigen activation in cancer. *Annual Review Of Pharmacology And Toxicology*, 2014; 54:251-72.
- [126] Tan Y, Liu L, Liao M, Zhang C, Hu S, Zou M, *et al.* Emerging roles for PIWI proteins in cancer. *Acta Biochimica Et Biophysica Sinica*, 2015; 47:315-24.

ANEXO 1

COMPOSICION DE BUFFERS Y SOLUCIONES

Buffer de corrida (WB): 0,025 M Tris; 0,192 M Glicina; 0,1 % SDS; pH 8.3.

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 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 transferencia (WB): Tris-HCl 125 mM; glicina 0,1 M; metanol 20%.

Buffer de transformación (BT): $MnCl_2$ 55 mM; $CaCl_2$ 15 mM; KCl 250 mM; HEPES 0,01 M; pH 6,7.

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; sacarosa 0,25 M; EDTA 1 mM; DTT 1 mM; pH 7,4.

Buffer muestra 4X (WB): 1 ml Tris-HCl pH 6,8 0,5 M; 0,8 ml glicerol; 1,6 ml SDS 10 %; 0,4 ml β -mercaptoetanol; 0,2 ml azul de Bromofenol 0,002 %.

Buffer TAE 1 X: Tris 0,04 M; Na.Acetato. $3H_2O$ 0,02 M; EDTA- $Na_2 \cdot 2H_2O$ 1 mM; pH: 7,2.

Buffer TBE: Tris 0,05 M; Ácido Bórico 0,05 M; EDTA- $Na_2 \cdot 2H_2O$ 1 mM.

Lisozima (10 mg/ml): 100 mg Lisozima; 10 ml de glicerol al 10 % en agua MiliQ.

Medio Luria Bertani (LB): triptona (Britania) 10 gr/L; extracto de levadura (Britania) 5 gr/L; NaCl 10 gr/L.

Medio SOB: triptona (Britania) 2% p/v; extracto de levadura 0,5% (Britania); NaCl 10 mM; KCl 2,5 mM; $MgCl_2$ 10 mM; $MgSO_4$ 10 mM.

Medio SOC: peptona 20 gr/L; extracto de levadura 5 gr/L; NaCl 0,584 gr/L; KCl 0,186 gr/L; glucosa 20 mM; pH 7,0.

Solución de $CaCl_2$ (2 M): 87,6 grs $CaCl_2 \cdot 6H_2O$; 200 ml de agua destilada. Esterilizar por filtración y conservar a 4 °C.

Solución de HEPES 2X: 8 grs NaCl; 0,2 grs $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$; 6,5 g HEPES. Llevar a pH 7,0 y agregar agua destilada hasta 500 ml. Alicuotar y conservar a -20 °C.

Solución I (maxiprep): glucosa 50 mM; Tris 25 mM pH 8,0; EDTA 10 mM; pH 8.0.

Solución II (maxiprep): NaOH 0.2 M; SDS 1%.

Solución III (maxiprep): acetato de potasio 3M; ácido acético glacial 11,5 ml; agua 28,5 ml; pH 5,5.