



**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR**

**TESIS  
DOCTOR EN BIOQUIMICA**

**Lípidos neutros y polares con ácidos grasos poliinsaturados  
de las series n-6 y n-9 en el tracto reproductor  
masculino de rata**

**JESSICA MARIELA LUQUEZ**

**BAHIA BLANCA**

**ARGENTINA**

**2016**





**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR**

**TESIS  
DOCTOR EN BIOQUIMICA**

**Lípidos neutros y polares con ácidos grasos poliinsaturados  
de las series n-6 y n-9 en el tracto reproductor  
masculino de rata**

**JESSICA MARIELA LUQUEZ**

**BAHIA BLANCA**

**ARGENTINA**

**2016**

## PREFACIO

"Esta tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado de Doctor en Bioquímica de la Universidad del Sur y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad o en otras. El trabajo contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el Instituto de Investigaciones Bioquímicas Bahía Blanca (INIBIBB) dependiente del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y de la Universidad Nacional del Sur (UNS), durante el período comprendido entre 19 de Diciembre del 2008 y el 19 de Febrero de 2016, bajo la dirección de la Dra. Marta Isabel Aveldaño, Profesor Titular de la Universidad del Sur e Investigadora Superior del CONICET y codirección de la Dra. Natalia Edith Furland, Asistente de docencia de la Universidad del Sur e Investigadora Adjunta de CONICET .

A estas instituciones les agradezco haberme brindado los recursos materiales y humanos para completar mis estudios de postgrado y realizar esta tesis doctoral, sin los cuales no hubiera sido posible la concreción de este trabajo.



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR  
Secretaría General de Posgrado y Educación Continua

La presente tesis ha sido aprobada el ..../..../..... , mereciendo  
la calificación de .....(.....)

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar, a mi directora de tesis, la Dra. Marta Aveldaño, por darme la oportunidad de crecer profesionalmente, por enseñarme y guiarme en el campo académico y científico, por su paciencia, por su firme compromiso e infinita dedicación para la culminación de este trabajo.

A mi codirectora, la Dra. Natalia Furland, por enseñarme, aconsejarme, por su compañía en las largas horas de experimentos, por brindarme su cariño y por su valiosa amistad.

Al CONICET, CIC y UNS por brindarme a través de Becas y de la Docencia la oportunidad de realizar esta tesis.

A Martín Oresti, por ser mi compañero de vida y de trabajo, por darme las fuerzas para culminar esta tesis, por sus palabras de aliento por guiarme siempre en el campo académico.

A la Dra. Sofía Vallés, por su buena predisposición para ayudarme en esta tarea y por su amistad.

Al Dr. Alejandro Peñalva, por estar siempre, por su amistad y por sus buenos consejos.

A la Lic. Florencia Santiago Valtierra por hacer más ameno el trabajo diario.

A todos ellos les agradezco por hacer del laboratorio mi segunda casa.

A todos mis compañeros del INIBIBB.

A todos los que a lo largo de estos años han colaborado conmigo de uno u otro modo en la realización de este trabajo.

*A mi esposo Martín, por su amor y apoyo incondicional  
y a la razón de mi vida, mis hijos, Martina y Benicio.*

*A la memoria de mi querida madre, Marta*

## ***ÍNDICE GENERAL***



	Página
Abreviaturas.....	1
Índice temático.....	5
Resumen.....	9
Summary.....	13
Introducción.....	17
Objetivos generales.....	39
Materiales y Métodos.....	41
Resultados I.....	58
Resultados II.....	102
Resultados III.....	161
Discusión.....	175
Referencias.....	193
Publicaciones y presentaciones a congresos que surgieron como parte de esta tesis	203

## ***ABREVIATURAS***

**ACIL-GP:** acil glicerona fosfato  
**AG:** ácido graso  
**AGPR:** alquil-glicerona fosfato reductasa  
**AGPS:** alquil-glicerona fosfato sintasa  
**ALQUENIL-DAG:** 1-0-alc-1' enil, 2,3 diacil-*sn*-glicerol  
**ALQUIL-DAG:** 1-0-alquil, 2,3-diacil-*sn*-glicerol  
**ALQUIL-GP:** alquil glicerona fosfato  
**a-PC:** plasmanilcolina  
**a-PE:** plasmaniletanolmina  
**AR:** reacción acrosomal  
**BWW:** medio Biggers-Whitten-Whittingham  
**C1:** control 1  
**C2:** control 2  
**C3:** control 3  
**CAP:** capacitación  
**Caput:** cabeza  
**Cauda:** cola  
**Cer:** ceramida  
**CGP:** glicerofosfolípidos de colina  
**Chol:** colesterol  
**CL:** cardiolipina  
**Corpus:** cuerpo  
**CR:** cuerpo residual  
**DAG:** diacilglicerol  
**DFA / D:** ácidos grasos dienoicos  
**DGAT:** diglicérido acil transferasa  
**DHAP:** dihidroxiacetona fosfato  
**DHAPAT:** dihidroxiacetona fosfato acil transferasa  
**EC:** ésteres de colesterol

**EGP:** glicerofosfolípidos de etanolamina

**EP:** espermátocitos e paquiteno

**ER:** espermátida redonda

**FFA:** ácido graso libre

**GC:** cromatografía gaseosa

**GP:** glicerona fosfato

**GPA:** 1-alkil-glicerol-fosfato

**GPAT:** glicerona fosfato acil transferasa

**GPI:** glicosil-fosfatidilinositol

**GPL:** glicerofosfolípidos

**LPC/ L-PC:** lisofosfatidilcolina

**L-PE:** lisofosfatidiletanolamina

**MFA / M:** ácidos grasos monoinsaturados

**ME:** metil éster (es) de ácidos grasos

**MT:** N-metil transferasa

**PUFA / P:** ácidos grasos poliinsaturados de larga cadena de 18 a 22 átomos de carbono

**PA:** ácido fosfático

**PAF:** factor activador plaquetario

**PC:** fosfatidilcolina

**PE:** fosfatidiletanolamina

**PI:** fosfatidilinositol

**PL:** fosfolípidos

**Pls-PC:** plasmencilcolina

**Pls-PE:** plasmeniletanolamina

**PS:** fosfatidilserina

**SFA / S:** ácidos grasos saturados

**SM:** esfingomielina

**TAG:** triacilgliceroles

**TG:** triglicéridos

**TLC:** cromatografía en capa fina

**TS:** túbulos seminíferos

**TUE:** triglicéridos con una unión éter

**VLCFA-CoA:** acil -CoA de muy larga cadena

**VLCPUFA:** ácido(s) graso(s) poliinsaturado(s) (tetra-, penta-, hexa-) de largo de cadena de 24 a 34 átomos de carbono

Los ácidos grasos se abrevian por la convención: número de átomos de carbono: número de dobles enlaces: n-3, n-6, n-9 denotan la posición de la primera doble ligadura contando a partir del metilo terminal de un ácido graso.

## ***ÍNDICE TEMÁTICO***

<b>RESUMEN</b>	9
<b>SUMMARY</b>	13
<b>INTRODUCCIÓN</b>	17
<b>OBJETIVOS GENERALES</b>	39
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	41
1- PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES	42
• Obtención de tejido testicular y epididimal	42
• Estudios en testículo y epidídimo enteros	43
- Desarrollo postnatal	43
- Hipertermia moderada intermitente	43
• Histología y microscopía	43
• Expresión (ARNm) de alquil -glicerona fosfato sintasa(AGPS)	44
• Estudios en células y gametas	45
- Células espermatogénicas	45
- Aislamiento de espermatozoides	46
- Separación de cabezas y colas espermáticas	47
- Efectos del aislamiento y de las incubaciones sobre los lípidos espermáticos	49
2- SEPARACIÓN Y ANÁLISIS DE LOS LÍPIDOS	50
• Extracción de lípidos	50
• Procedimientos preparativos y analíticos	50
• Separación de clases de fosfolípidos	52
• Separación de subclases de glicerofosfolípidos de colina y etanolamina	52
• Separación de lípidos neutros	54
• Subclases de triglicéridos	54
3- ANÁLISIS DE LOS ÁCIDOS GRASOS	56
• Preparación de metil-ésteres de ácidos grasos	56
• Cromatografía en fase gaseosa	56
4- ANÁLISIS ESTADÍSTICO	57
<b>RESULTADOS I</b>	58
<b>1. CAMBIOS DURANTE EL DESARROLLO</b>	59
1.1. Aspectos micro y macroscópicos	59
1.2. Fosfolípidos	60
1.3. Lípidos neutros	62
1.4. Ácidos grasos de GPL	63
1.5. Ácidos grasos de los lípidos neutros	64
<b>2. CAMBIOS CON LA DIFERENCIACIÓN CELULAR</b>	65
2.1. Fosfolípidos y sus ácidos grasos	65
2.2. Lípidos neutros y sus ácidos grasos	67

<b>3. EFECTOS DE LA EXPOSICIÓN A EPISODIOS INTERMITENTES DE HIPERTERMIA SOBRE LOS LÍPIDOS DEL TESTÍCULO</b>	68
3.1. Cambios micro y macroscópicos	68
3.2. Efecto sobre los fosfolípidos y sobre las subclases de CGP y EGP	70
3.3. Efectos sobre los ácidos grasos de fosfolípidos y subclases	71
3.4. Efectos sobre los lípidos neutros y sus ácidos grasos	72
3.5. Gotas lipídicas	73
<b>Figuras y tablas I</b>	75
<b>RESULTADOS II</b>	102
<b>1. DESARROLLO POSTNATAL Y LÍPIDOS CON UNIONES ÉTERES DEL EPIDÍDIMO</b>	103
1.1. Cambios micro y macroscópicos	103
1.2. Clases y subclases de fosfolípidos	105
1.3. Ácidos grasos de subclases de glicerofosfolípidos	106
1.4. Triglicéridos con una unión éter y sus subclases	107
1.5. Ácidos grasos de subclases de TUE	108
<b>2. LÍPIDOS CON UNIONES ÉTERES EN REGIONES DEL EPIDÍDIMO</b>	109
2.1. Clases y subclases de fosfolípidos	110
2.2. Ácidos grasos de glicerofosfolípidos y sus subclases	111
2.3. Lípidos neutros de las tres regiones	112
2.4. Subclases de triglicéridos con una unión éter	114
<b>3. EFECTOS DE LA EXPOSICIÓN A LA HIPERTERMIA SOBRE LOS LÍPIDOS DEL EPIDÍDIMO</b>	115
3.1. Histología	115
3.2. Peso, proteínas y fósforo lipídico	117
3.3. Composición en fosfolípidos y subclases de CGP y EGP	117
3.4. Ácidos grasos de GPL y sus subclases en regiones epididimales	118
3.4.1. Glicerofosfolípidos totales	118
3.4.2. Subclases de CGP	119
3.4.3. Subclases de EGP	119
3.5. Triglicéridos con uniones éteres en regiones epididimales	119
3.5.1. Ácidos grasos de TUE	120
3.6. Comparación entre cantidades de GPL con uniones éteres y TUE	121
3.7. Comparación entre cantidades de ácidos grasos de GPL con uniones éteres y TUE	121
<b>4. EFECTOS DE LA HIPERTERMIA TESTICULAR Y EPIDIDIMAL SOBRE LA EXPRESIÓN DE ALQUIL-GLICERONA FOSFATO SINTASA (AGPS)</b>	122



---

<b>Figuras y tablas II</b>	124
<b>RESULTADOS III</b>	161
<b>1. GLICEROFOSFOLÍPIDOS DEL ESPERMATOZOIDE Y SUS ÁCIDOS GRASOS</b>	162
1.1. Distribución de subclases de GPL de colina y de etanolamina entre la cabeza y la cola espermática	162
1.2. Ácidos grasos de diacil y plasménil de glicerofosfolípidos	163
<b>2. EFECTOS DEL AISLAMIENTO Y LA ACTIVACIÓN IN VITRO SOBRE LOS LÍPIDOS DEL ESPERMATOZOIDE DE RATA Y SUS ÁCIDOS GRASOS</b>	164
2.1. Cambios en fosfolípidos y subclases de CGP Y EGP	165
2.2. Cambios en ácidos grasos de CGP y EGP	166
<b>Figuras III</b>	167
<b>DISCUSIÓN</b>	175
<b>REFERENCIAS</b>	193
Publicaciones y presentaciones a Congresos que surgieron como parte de esta tesis	203

***RESUMEN***

En los tejidos de mamífero los glicerofosfolípidos (GPL) se presentan en tres subclases dependiendo de si la cadena hidrofóbica que se une a la posición *sn-1* del esqueleto de glicerol es un ácido graso, un alcohol graso, o un aldehído graso unidos a través de una unión éster, 1-O-alkil-éter, o 1-alc-1'-enil-éter, respectivamente, estando la posición *sn-2* ocupada por un ácido graso (las subclases fosfatidil-, plasmanil- o plasmenil- de GPL respectivamente). En la clase triglicéridos (TG) es posible encontrar subclases similares: los bien conocidos triacilgliceroles (TAG), con tres ácidos grasos esterificados al glicerol, y los TG con una unión éter (TUE), esto es, un alcohol graso o un aldehído graso en la posición *sn-1* del glicerol y ácidos grasos en las posiciones *sn-2* y *sn-3* del glicerol (1-O-alkil- y 1-O-alc-1'-enil-, 2,3-diacil-*sn*-gliceroles, aquí abreviados como alkil-DAG y alquenil-DAG, respectivamente).

En general es escaso y fragmentario el conocimiento actual sobre las características de las subclases individuales de GPL y de TG, y cómo se relacionan entre sí en células y tejidos animales, especialmente en lo que concierne a los TUE. El objetivo de este trabajo de tesis fue el de reunir información sobre la bioquímica de estas subclases, abarcando aspectos de su contenido y composición en distintas áreas del sistema reproductor masculino. Tomando a la rata como modelo, en el testículo y en el epidídimo se estudiaron los cambios de estas subclases durante el desarrollo postnatal y, en el adulto, los efectos que sobre ellas produce el estrés térmico. En espermatozoides se determinó la distribución entre la cabeza y la cola de las subclases de GPL, y los efectos que sobre estas últimas ejercen la capacitación y la reacción acrosomal inducidas *in vitro*.

Durante el desarrollo postnatal, en el testículo aumentaron los contenidos de todas las subclases de GPL de colina y de etanolamina (CGP y EGP, respectivamente), que se enriquecieron en ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) de 20 y 24 carbonos. En función de la edad postnatal, en ellas disminuyó la proporción de ácido araquidónico (20:4n-6) y aumentó notoriamente la de ácido docosapentaenoico (22:5n-6). En el adulto los dos plasmalógenos, en especial la plasmeniletanolamina, fueron muy ricos en 22:5n-6. Un cambio en el mismo sentido se produjo durante la diferenciación celular desde espermatozoides en paquiteno a espermátidas redondas, con una relación entre 22:5n-6 y 20:4n-6 cercana a 1 en fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina, y muy superior a 1 en los correspondientes plasmalógenos, en especial plasmeniletanolamina. Ambas células espermátogénicas contuvieron los 1-O-alkil GPL plasmanilcolina y plasmaniletanolamina, la primera potencial precursora del lípido bioactivo PAF y la segunda precursora de la abundante plasmeniletanolamina. Los TUE sufrieron incrementos en su concentración por gramo de tejido en dos etapas clave de la primera onda de espermátogénesis: los días postnatales 21 y 45 (PN 21 y PN45), en los que se sabe que un número importante de los primeros espermatozoides primarios y de las primeras espermátidas, respectivamente, mueren por apoptosis.

La exposición transitoria e intermitente de los testículos a la hipertermia (15 min a 43 °C, una vez por día durante 5 días consecutivos) llevó a la pérdida selectiva de espermatozoides primarios y espermátidas jóvenes durante las primeras 1-2 semanas después del tratamiento, recomenzando luego la espermátogénesis a partir de las espermátogonias supervivientes. En este lapso, disminuyeron tanto las células como sus subclases lipídicas características, recuperándose ambas luego con la recuperación de la espermátogénesis. Las especies de los GPL de colina y de etanolamina ricas en 20:4n-6 reaparecieron antes que las ricas en 22:5n-6, a semejanza de lo que ocurrió en el desarrollo normal, pues primero reaparecieron los espermatozoides y luego las espermátidas. Durante las primeras semanas post-tratamiento, cuando los túbulos seminíferos exhibieron una gran pérdida de células germinales con supervivencia de las células de Sertoli, sobre todo en la primera y segunda semanas, los niveles de TAG y de TUE, así como de ésteres de colesterol,

aumentaron varias veces, para volver a disminuir luego. Atribuimos este aumento transitorio a la actividad fagocítica de las células de Sertoli.

En el tejido epididimal normal del animal adulto estuvieron presentes las tres subclases de GPL. Con respecto a los lípidos neutros, además de grandes cantidades de TAG, se hallaron las dos subclases de TUE, alquil-DAG y alquenil-DAG, en cantidades mayores que el tejido testicular. En ambos tejidos los primeros predominaron sobre los segundos. Otra diferencia notable fue que en los lípidos del tejido epididimal coexistieron PUFA de 20 y 22 carbonos de las series n-6 (20:4n-6, 22:5n-6) y n-9 (22:3n-9, 22:4n-9).

Al día postnatal 30, aún con escasa diferenciación y sin espermatozoides en sus conductos, el epidídimo contenía niveles de plasmeniletanolamina con niveles de PUFA n-9 más altos que las demás subclases. Con el avance del desarrollo, estos PUFA se incrementaron en las demás subclases, primero en la fosfatidilcolina (P49-P55) y luego en la plasmanil y en la plasmenicolina (P55-adulthood). Por su parte los TUE epididimales se incrementaron notablemente el día posnatal 49, en coincidencia con el hecho de que poco antes (P45) había llegado a su lumen una oleada transitoria de células germinales desde el testículo, que en pocos días fueron reemplazadas por los primeros espermatozoides.

Dado que los espermatozoides de rata se enriquecen progresivamente en plasmenicolina con 22:4n-9 a medida que maduran en el epidídimo, esperábamos encontrarla en mayor concentración en alguno de los segmentos epididimales. Sin embargo, en las tres regiones epididimales el porcentaje de plasmeniletanolamina fue mayor que el de plasmenicolina. La pequeña región del *corpus* fue la que exhibió la más alta concentración ( $\mu\text{g}$  por gramo de tejido) de plasmeniletanolamina y de su precursora la plasmaniletanolamina, además de alquil-DAG y alquenil-DAG, todos ellos ricos en PUFA n-9. La plasmeniletanolamina del *corpus* podría ser la precursora de la plasmenicolina y ésta ser transferida a los espermatozoides en tránsito. Los mecanismos involucrados deben aún establecerse.

Los efectos de la hipertermia sobre el epidídimo fueron muy distintos de los descritos en el testículo. Los conductos epididimales se vaciaron progresivamente de los espermatozoides que contenían inicialmente en el lapso de unas seis semanas post-tratamiento, lo que concordó con el hecho de que los lípidos epididimales se empobrecieron en 22:5n-6 y que la plasmenicolina con 22:4n-9 de la cauda disminuyó. Sin embargo, los niveles de fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina, y los correspondientes plasmalógenos, sobre todo en el *caput* se incrementaron sobre los niveles de los controles no tratados durante el mismo período.

Llamativamente, los contenidos por gramo de tejido, tanto alquenil-DAG como alquil-DAG, se incrementaron agudamente en las tres regiones del epidídimo (*caput*, *corpus*, *cauda*) durante la primera semana post-hipertermia, y habían bajado nuevamente a la semana 2, con una divergencia interesante: en el caso de las especies con PUFA n-6, continuaron bajando, pero en el caso de las especies con 18:1n-9 y PUFA n-9 del *caput*, volvieron a incrementarse hacia la semana 6. Dado que el tejido testicular en este momento (día 42 post-hipertermia) estaba en vías de recuperación, este incremento podría reflejar una reacción celular específica de las células epididimales. Entre estas, merecen investigarse algunas células del sistema mononuclear fagocítico (células dendríticas, macrófagos), que están normalmente presentes en el compartimiento basal del epitelio epididimal, especialmente en el segmento inicial del *caput*.

En el animal adulto en condiciones fisiológicas, la expresión (mRNA) de la alquil-gliceronafofato sintasa (AGPS), una enzima peroxisomal clave involucrada en la

síntesis de lípidos con uniones éteres, fue significativamente menor en el testículo que en el epidídimo. En este último, la AGPS se expresó más activamente en el *corpus* que en *caput* y en éste más que en la *cauda*. Esto demostró la importancia de los dos primeros segmentos del epidídimo en la biosíntesis de lípidos con uniones éteres. Inmediatamente después del último de los 5 episodios de hipertermia aplicados, en el testículo se detuvo temporariamente la expresión de AGPS, mientras que en el epidídimo no. En contraste, a la semana 2 post-hipertermia el nivel de mRNA de la enzima en el testículo se había recuperado, mientras en el epidídimo se había reducido, tanto en el *caput* como en el *corpus*. Estos resultados sugieren que en el epidídimo la presencia de espermatozoides en el lumen es importante para que las enzimas involucradas en la biosíntesis de lípidos con una unión éter se expresen en las células del epitelio.

En la primera parte del tercer capítulo se determinó la distribución entre la cabeza y la cola espermáticas de las subclases de los GPL de colina y de etanolamina. Un hallazgo original fue que la cabeza espermática, pese a su pequeño tamaño, concentró una proporción mayor de la plasmenilcolina total rica en 22:4n-9 que la cola. La cola a su vez contuvo más fosfatidiletanolamina rica en 20:4n-6 y 22:5n-6 y fosfatidilcolina rica en 22:5n-6, que la cabeza. Llamó la atención además que la cola contuviera plasmanilcolina y plasmaniletanolamina muy ricas en PUFA n-6.

En la segunda parte de este capítulo se investigó la participación de las cuatro subclases principales de GPL del espermatozoide en la capacitación y la reacción acrosomal. Con respecto a controles no incubados, se produjeron hidrólisis de GPL de intensidad creciente en el siguiente orden: controles incubados sin agregados, gametas capacitadas, y gametas capacitadas que sufrieron la reacción acrosomal. Tal hidrólisis fue selectiva, pues afectó con intensidad creciente, en ese mismo orden, a las subclases fosfatidilcolina y fosfatidietanolamina. Por lo tanto estos eventos, importantes para la función de los espermatozoides, resultaron en un enriquecimiento relativo de las gametas en plasmalógenos.

Los resultados de esta tesis abrieron nuevos interrogantes que serán objeto de futuros estudios sobre el rol biológico, propiedades, biosíntesis y catabolismo de los GPL y TG con una unión éter en células del tracto reproductor.

***SUMMARY***

In mammalian tissues, glycerophospholipids (GPL) occur in three subclasses, depending on whether the hydrophobic chain that is linked to the *sn*-1 position of the glycerol backbone is an ester-bound fatty acid, an ether-bound fatty alcohol, or an alkenyl-ether-bound fatty aldehyde, the *sn*-2 position being occupied by a fatty acid (the phosphatidyl-, plasmanyl- or plasmenyl- GPL subclasses, respectively). In the class of triglycerides (TG), it is possible to find similar subclasses: the well-known triacylglycerols (TAG), with three fatty acids ester-bound to glycerol, and the ether-linked triglycerides (EL-TG), namely TG with a fatty alcohol or a fatty aldehyde at the *sn*-1 position of glycerol, and fatty acids at the *sn*-2 and *sn*-3 positions (1-O-alkyl- or 1-O-alk-1'-enyl-, 2,3-diacyl-*sn*-glycerols, here abbreviated as alkyl-DAG and alkenyl-DAG, respectively).

The knowledge about the characteristics of GPL and TG subclasses and their possible metabolic relationships in animal tissues and cells is at present scarce and fragmentary, especially regarding the EL-TG. The aim of this work was to gather information about the biochemistry of these subclasses, covering aspects of their levels and composition in different areas of the male reproductive system. Taking the rat as a model, in the testis and the epididymis the changes in these subclasses were studied during the postnatal development and, in the adult, the effects induced by heat stress. In spermatozoa, the distribution between head and tail of GPL subclasses, and the effects on the latter of the *in vitro*-induced capacitation and acrosome reaction were investigated.

During postnatal development, the testicular content of all subclasses of choline and ethanolamine glycerophospholipids (CGP and EGP, respectively) increased, with a concomitant enrichment in 20 to 24 carbon atom polyunsaturated fatty acids (PUFA). As the postnatal age increased, in all of them the proportion of arachidonic acid (20:4n-6) was reduced while that of docosapentaenoic acid (22:5n-6) increased. In adulthood the two plasmalogens, especially plasmenylethanolamine, were very rich in 22:5n-6. Similar increases in the percentage of 22:5n-6 was observed during pachytene spermatocytes differentiation into round spermatids, the 22:5n-6/20:4n-6 ratio being nearly 1:1 in phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine and a significantly higher ratio in the corresponding plasmalogens, especially plasmenylethanolamine. Both spermatogenic cells contained the 1-O-alkyl-GPL, plasmanylcholine and plasmanylethanolamine, the former being the potential precursor of the bioactive lipid PAF and the latter the metabolic precursor of plasmenylethanolamine. The EL-TG showed increases in their concentration per gram of tissue in two key stages of the first wave of spermatogenesis, postnatal days 21 and 45 (PN21 and PN45), when a considerable number of the first pachytene spermatocytes and the first round spermatids, respectively, are known to die by apoptosis.

Transient and intermittent exposures of testicular tissue to hyperthermia (15 minutes to 43°C, once a day during five consequent days) resulted in the selective loss of pachytene spermatocytes and early spermatids during the first 1-2 weeks after treatment, spermatogenesis restarting from the surviving spermatogonia afterwards. During this period, the numbers of germ cells and their characteristic lipids decreased, both increasing again with the recovery of spermatogenesis. The 20:4n-6-rich species of choline and ethanolamine GPL reappeared before those rich in 22:5n-6, just as it occurred during normal development, as spermatocytes reappeared before spermatids. During the first weeks post-treatment, when seminiferous tubules exhibited a profound loss of virtually all germ cell types with survival of Sertoli cells, the levels of TAG and TUE, and also of cholesterol esters, increased several fold, to decrease again afterwards. This transient accumulation was attributed to the phagocytic activity of Sertoli cells.

In the epididymal tissue of adult rats, the three GPL subclasses were present. Regarding neutral lipids, in addition to large amounts of TAG, alkyl-DAG and alkenyl-DAG were found in significantly larger amounts than in testes. In both tissues, alkyl-DAG predominated over alkenyl DAG. Another notable difference with testes was that in epididymal lipids PUFA with 20 and 22 carbons of the n-6 series (20:4n-6, 22:5n-6) coexisted with PUFA of the n-9 series (22:3n-9, 22:4n-9).

At postnatal day 30, in a scarcely differentiated epithelium and with no spermatozoa in its ducts, the epididymis contained higher levels of n-9 PUFA in plasmenylethanolamine than other subclasses. With the progress of development, these PUFA were increased in other subclasses, first in phosphatidylcholine (PN49 to 55) and then in plasmanyl- and plasmenylcholine (PN55 to adulthood). Regarding epididymal EL-TG, their levels increased significantly at PN49, coinciding with the fact that shortly before (PN45) a transient wave of germ cells from the testes had reached the epididymal tubules, being then replaced by the first spermatozoa.

Because rat spermatozoa become progressively rich in plasmenylcholine with 22:4n-9 as they mature during their epididymal transit, we expected to find a greater concentration of this lipid in one of the epididymal segments, *caput*, *corpus* or *cauda*. However, in all the three regions the percentage of plasmenylethanolamine was higher than that of plasmenylcholine. The small *corpus* region was the one to exhibit the highest concentration ( $\mu\text{g}$  per gram of tissue) of plasmenylethanolamine and of its precursor, plasmanylethanolamine, in addition to alkyl-DAG and alkenyl-DAG, all of them rich in PUFA n-9. This suggested that the *corpus* plasmenylethanolamine could play a role as a precursor of the plasmenylcholine to be transferred to spermatozoa in transit. The possible mechanisms involved in these events are yet to be established.

The effects of hyperthermia on the epididymis were very different from those described in the testis. The epididymal ducts progressively lost most of the spermatozoa that were originally present in their lumina in six weeks post-treatment, which agreed with the fact that epididymal lipids were depleted of 22:5n-6 and that 22:4n-6-rich plasmenylcholine from *cauda* also decreased. However, the levels of phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine, and the corresponding plasmalogens of the *caput* region showed a significant buildup during the same period.

Interestingly, the content per gram of tissue of alkyl-DAG and alkenyl-DAG increased sharply in the three epididymal regions (*caput*, *corpus*, *cauda*) during the first week post-hyperthermia and had decreased again at week 2, with an interesting divergence: in the case of species with n-6 PUFA, they continued to decline, but in the case of species with 18:1n-9 and n-9 PUFA from the *caput* region, they increased again by week six post treatment. Since the testicular tissue at this time (day 42 post-hyperthermia) was still recovering, this increase could reflect a specific cellular response of the epididymal cells. Among these, the role of some cells of the mononuclear phagocytic system (dendritic cells, macrophages), which are normally present in the basal compartment of the epididymal epithelium, is worth investigating.

In the adult animal in physiological conditions, the expression (mRNA) of alkylglycerone phosphate synthase (AGPS), a key peroxisomal enzyme involved in the synthesis of ether-linked lipids, was significantly lower in the testis than the epididymis. In the latter, AGPS was more actively expressed in the *corpus* than the *caput*, and in the latter the expression was greater than in the *cauda*. These findings demonstrated the importance of the first two epididymal segments in the biosynthesis of lipids with an ether linkage.

Immediately after the last of the 5 episodes of hyperthermia, the mRNA expression significantly decreased in the testis, whereas in the epididymis remained unchanged.



By contrast, at week 2 post-hyperthermia the level of mRNA of the enzyme in the testes had recovered, while in the *caput* and *corpus* epididymal segments was reduced. These results suggest that in the epididymis the presence of spermatozoa in the lumen is important for the enzymes involved in ether lipid biosynthesis to be expressed in the epithelial cells.

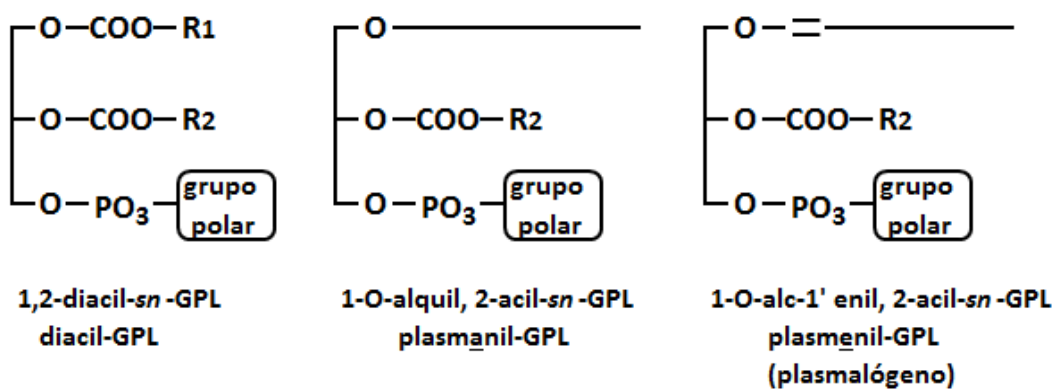
In the first part of the third chapter, distribution between the sperm head and the sperm tail of CGP and EGP was determined. A novel finding was that, despite its small size, the head concentrated more of the total 22:4n-9-rich plasmenylcholine than the tail. The tail, in turn, contained more n-6 PUFA-rich phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine than the head. Remarkably, the sperm tail also contained n-6-PUFA-rich plasmanylncholine and plasmany lethanolamine.

In the second part of this chapter, the involvement of the four major subclasses of sperm GPL in sperm capacitation and the acrosomal reaction was investigated. Compared to non-incubated controls, GPL hydrolysis of increasing intensity occurred in the following order: controls incubated with no additions, capacitated sperm, and capacitated sperm that had undergone the acrosomal reaction. Such hydrolysis was selective, as it increasingly affected, in that same order, the phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine subclasses. Thus these events, important for the function of spermatozoa, resulted in a relative enrichment in plasmalogens of the gametes.

The results in this thesis opened new questions that will be the subject of future research on the biological role, properties, biosynthesis and catabolism of the GPL and TG with an ether bound in the reproductive tract cells.

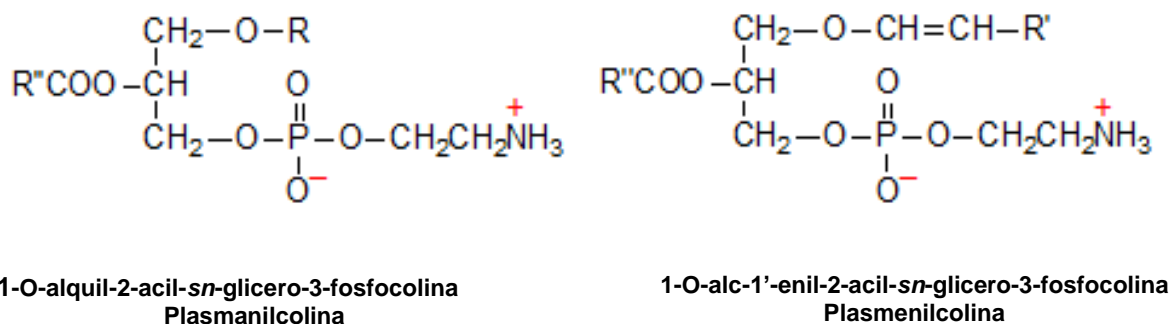
# ***INTRODUCCIÓN***

En las membranas celulares de los tejidos de mamífero hay una gran variedad de *clases* de glicerofosfolípidos (GPL), cada una de las cuales contiene una determinada molécula polar (por ejemplo colina, etanolamina, serina, inositol o glicerol) unida al grupo fosfato esterificado al hidroxilo presente en la posición *sn-3* del glicerol. Dentro de cada clase de GPL pueden encontrarse tres *subclases*, dependiendo de las cadenas hidrofóbicas que ocupan las posiciones *sn-1* y *sn-2* de la molécula. En la mayor parte de los GPL naturales presentes en los tejidos animales se presentan en diversas proporciones tres subclases, que se distinguen entre sí por poseer, en la posición *sn-1*, un ácido graso ligado a través de una unión éster, un alcohol graso a través de una unión éter, o un aldehído graso a través de una unión vinil-éter (**Fig. 1**). A estos dos últimos se los suele denominar en conjunto “GPL con una unión éter”, y se encuentran en muy distintas proporciones, tanto entre sí, como con respecto a los GPL con dos uniones éster, en una amplia variedad de células y tejidos.



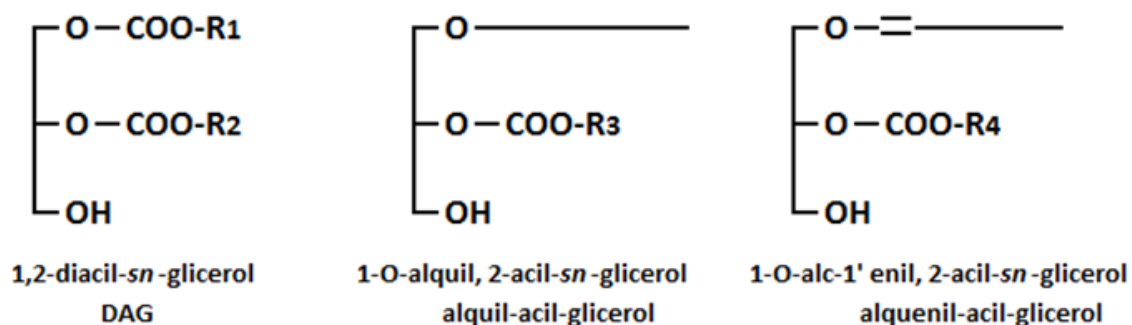
**Fig. 1.** Representación general de las tres subclases de glicerofosfolípidos (GPL). Los grupos  $R_1$  y  $R_2$  representan ácidos grasos. Lo que diferencia a cada subclase es el grupo hidrofóbico unido a la posición *sn-1* del glicerol (un ácido graso, un alcohol graso, o un aldehído graso, dando lugar a un diacil-, un plasmánil-, o un plasménil- GPL, respectivamente). Dentro de *cada* subclase hay una gran variedad de especies moleculares, que se diferencian entre sí por la longitud y la insaturación de sus ácidos grasos.

La forma de denominar a estas tres subclases es utilizar el nombre de la *base* presente en la cabeza polar precedida del término “fosfatidil”, cuando el GPL contiene dos ácidos grasos, como es el caso de las conocidas fosfatidilcolina (PC) o fosfatidiletanolamina (PE), mientras que a las subclases que contienen un alcohol graso o un aldehído graso en *sn-1* se las denomina en forma similar pero precedidas del término “plasmánil” o “plasménil”, respectivamente (**Fig. 2**).



**Fig. 2.** Esquema y nombres de las dos subclases que contienen una unión éter en el caso de los GPL de colina. En esta tesis emplearemos para designarlas los términos indicados más abajo, esto es, plasmanilcolina y plasmenilcolina.

Al nombrar a los GPL de colina (GPC) por lo tanto nos referimos a la *clase*, en la cual están contenidas las tres *subclases*, fosfatidilcolina, plasmanilcolina y plasmenilcolina, y lo mismo se aplica a cualquier otra clase de GPL. Si una clase como CGP es hidrolizada por una fosfolipasa de tipo C, o una fosfolipasa D seguida de una fosfohidrolasa, quedará libre el hidroxilo de la posición *sn*-3, dando como resultado tres subclases de diglicéridos (**Fig. 3**), cada una correspondiente a cada subclase de GPC: esto es, 1,2-diacil-*sn*-glicerol, 1-O-alkuil, 2-acil-*sn*-glicerol, y 1-O-alc-1'enil, 2-acil-*sn*-glicerol.

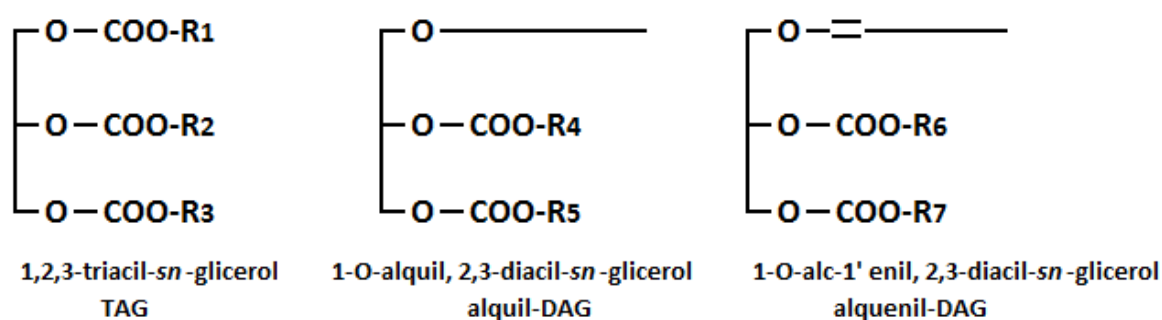


**Fig. 3.** Esquema de las tres subclases de diglicéridos que pueden originarse de la hidrólisis de un GPL al perder el grupo polar. Debajo de los nombres formales, está la forma en que, para abreviar, los denominaremos en esta tesis. Los grupos R se ilustraron con distintos subíndices para destacar el hecho de que en esas posiciones puede haber distintos ácidos grasos.

Para reconocer el hecho de que una clase de GPL o de diglicérido es heterogénea en cuanto a estas tres subclases, se utiliza el prefijo “dirradil” para designarla, esto es, dirradil-GPL y dirradil-glicerol. Sin embargo, sigue siendo frecuente en la literatura encontrar que a los GPL de fuentes animales se los continúe

denominando como “fosfatidil”, como por ejemplo “PC” o “PE”, y a los dirradildiglicéridos como “diacilgliceroles” (DAG). Este uso se justifica principalmente en razones históricas, y en que la subclase diacil de ambos lípidos suele ser la mayoritaria en la mayor parte de los tejidos.

Como los GPL y los diglicéridos, la clase triglicéridos está formada por las mismas tres subclases: 1,2,3-triacil-, 1-alcil-2,3-diacil-, y 1-O-alcenil- *sn*-gliceroles (**Fig. 4**). También en este caso la mayoría de los estudios que existen en la literatura se refieren a ellos como triacilgliceroles (TAG), los cuales, de las tres subclases, en la mayor parte de los tejidos animales son los triglicéridos más abundantes.



**Fig. 4.** Representación esquemática de las tres subclases de triglicéridos a las que nos referimos en el texto. Debajo de los nombres, está la forma en que, para abreviar, los denominamos en esta tesis. A los grupos R se les asignaron distintos subíndices para destacar el hecho de que en esas posiciones existe una gran variedad de especies de ácidos grasos. Utilizamos la abreviatura TUE para referirnos a los dos triglicéridos con una unión éter, en conjunto, y así distinguirlos de los TAG.

#### -Fosfolípidos con uniones éteres

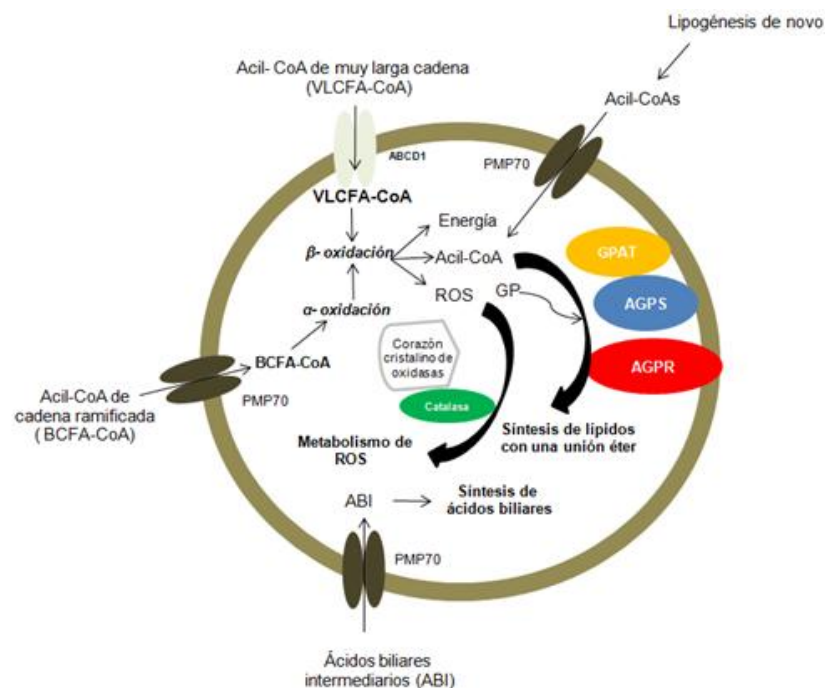
Niveles relativamente altos de fosfolípidos con uniones éteres en mamíferos ocurren en tejido nervioso, músculo cardíaco, testículo, riñón, eritrocitos, médula ósea, bazo, músculo esquelético, neutrófilos, macrófagos, y plaquetas (Snyder 1991). Algunas membranas, entre ellas las de la mielina, son extremadamente ricas en plasmeniletanolamina (Horrocks 1968). En general, estos plasmalógenos son más abundantes que los de colina en la mayoría de los tejidos de mamífero, a excepción del tejido cardíaco, en el que abundan tanto la plasmenilcolina como la plasmeniletanolamina, como es el caso en el canino (Gross 1984, Gross 1985), y en el bovino, humano, conejo y conejillo de indias (Diagne *et al.* 1984). Otra excepción son los espermatozoides de muchas especies de mamífero, en los cuales los plasmalógenos de colina predominan sobre los de etanolamina, y en algunos casos hasta llegan a ser los GPL mayoritarios. Así, sumando fosfatidil- colina y etanolamina

con plasménilcolina y etanolamina para comparar datos de la literatura sobre una misma base, la plasménilcolina representa el 57% entre los cuatro lípidos en los espermatozoides de carnero (Hartree & Mann 1959), el 53% en los del toro (Poulos *et al.* 1973), el 47% en los del chivo (Jain & Anand 1975), el 33% en los de rata (Aveldaño *et al.* 1992b) y el 30% en los de búfalo (Jain & Anand 1976). Por su parte, la proporción de plasménilcolina no es tan alta en espermatozoides de cerdo, 12.5% (Grogan *et al.* 1966), pollo, 12.8%, perro 5.4% (Darin-Bennett *et al.* 1974), y hombre 4% (Poulos & White 1973). Los plasmalógenos del espermatozoide maduro son, en general, ricos en ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) de 22 carbonos. Así, en los trabajos recién descritos en los que se analizan los ácidos grasos, figura como PUFA mayoritario el docosahexaenoico (22:6n-3) en el caso del carnero, toro y hombre, el docosapentaenoico (22:5n-6) en la plasménilcolina del espermatozoide de cerdo, perro y rata, y el docosatetraenoico (22:4n-6) en el caso de las aves. Es interesante destacar que la plasménilcolina del espermatozoide de rata además de 22:5n-6 contiene abundantes porcentajes de un ácido graso inusual: el 22:4n-9 (Aveldaño *et al.* 1992).

Existe un considerable número de revisiones que cubren las funciones atribuidas a los plasmalógenos, su posible rol en las membranas, sus propiedades biofísicas, su metabolismo, y los trastornos causados por la deficiencia de alguna enzima necesaria para su biosíntesis (por ejemplo, van den Bosch *et al.* (1993), Lee (1998), Brites *et al.* (2004), Wallner & Schmitz (2011), Braverman & Moser (2012), Watschinger & Werner (2013), Lodhi & Semenkovich (2014)). En cuanto a las funciones, muchas se han adjudicado a la unión vinil-éter presente en *sn-1*. Así, funciones que se describen repetidamente en las revisiones citadas son que los plasmalógenos pueden servir: a) como antioxidantes naturales, dado que la unión vinil-éter es altamente susceptible a ser atacada por los oxidantes; b) como moduladores de la estructura y dinámica de las membranas, dado que por tener ese grupo en lugar de un grupo carboxilo en *sn-1* exhiben la tendencia a formar fases lipídicas distintas de la clásica bicapa que forman los diacil-GPL con igual largo e insaturación en sus cadenas hidrofóbicas; c) como reductores de la tensión superficial y de la viscosidad de los fluidos en el surfactante pulmonar, donde son lípidos abundantes; d) como reserva de PUFA, dado que en la mayor parte de los tejidos los plasmalógenos en su posición *sn-2* contienen un PUFA de 20 o 22 carbonos, entre ellos araquidónico (20:4n-6), eicosapentaenoico (20:5n-3), 22:5n-6 o 22:6n-3, y d) como precursores de mediadores lipídicos de la inflamación y su resolución, si se tiene en cuenta que el 20:4n-6 es un conocido precursor de prostaglandinas y leucotrienos, y el 20:5n-3 y 22:6n-3 son precursores de reguladores

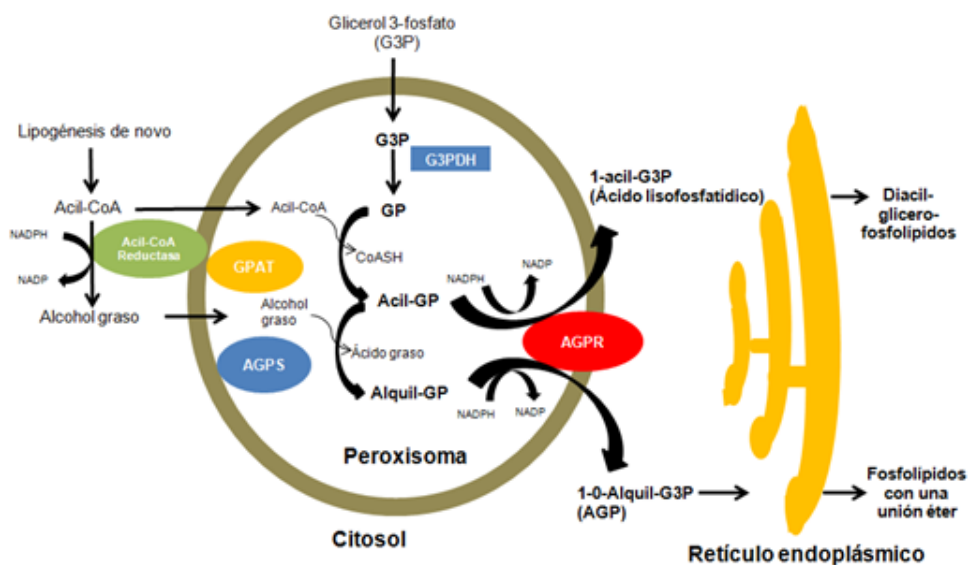
de la respuesta inflamatoria, entre ellos resolvinas, docosatrienos y neuroprotectinas (Stables & Gilroy 2011).

Con relación a la biosíntesis de los lípidos con una unión éter, muchas de las enzimas involucradas en ella fueron originalmente purificadas a partir del hígado (Snyder 1972). El hecho de que el hígado tuviera estas enzimas pero fuera uno de los tejidos de mamífero con menor contenido de estos lípidos sugirió que tal vez fueran sintetizados en el hígado para ser secretados. Esto encontró apoyo en el hecho de que parte de los GPL de las lipoproteínas plasmáticas se encuentran en forma de plasmalógenos (Vance 1990).



**Fig.5.** Rol de los peroxisomas en relación al metabolismo de algunos lípidos en células de mamífero. El peroxisoma es una organela celular rodeada por una única membrana que juega un rol en el metabolismo. Entre sus funciones catabólicas relacionadas con los lípidos están la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos de muy larga cadena, la  $\alpha$ -oxidación de ácidos grasos de cadena ramificada, y la eliminación de especies reactivas de oxígeno (ROS). Entre sus funciones biosintéticas, los peroxisomas colaboran en la biosíntesis de los ácidos biliares, en la formación de los ácidos grasos  $\alpha$ -hidroxilados, y en los primeros pasos de la biosíntesis de los GPL con uniones éteres. Los peroxisomas en muchos, pero no en todos los tipos celulares, contienen un núcleo denso cristalino conteniendo enzimas oxidativas. GP, glicerona fosfato, GPAT, glicerona fosfato acil transferasa, AGPS, alquil-glicerona fosfato sintasa, AGPR, alquil-glicerona fosfato reductasa, PMP70 y ABCD1, transportadores hacia el interior del peroxisoma. (Adaptado de Lodhi & Semenkovich 2014).

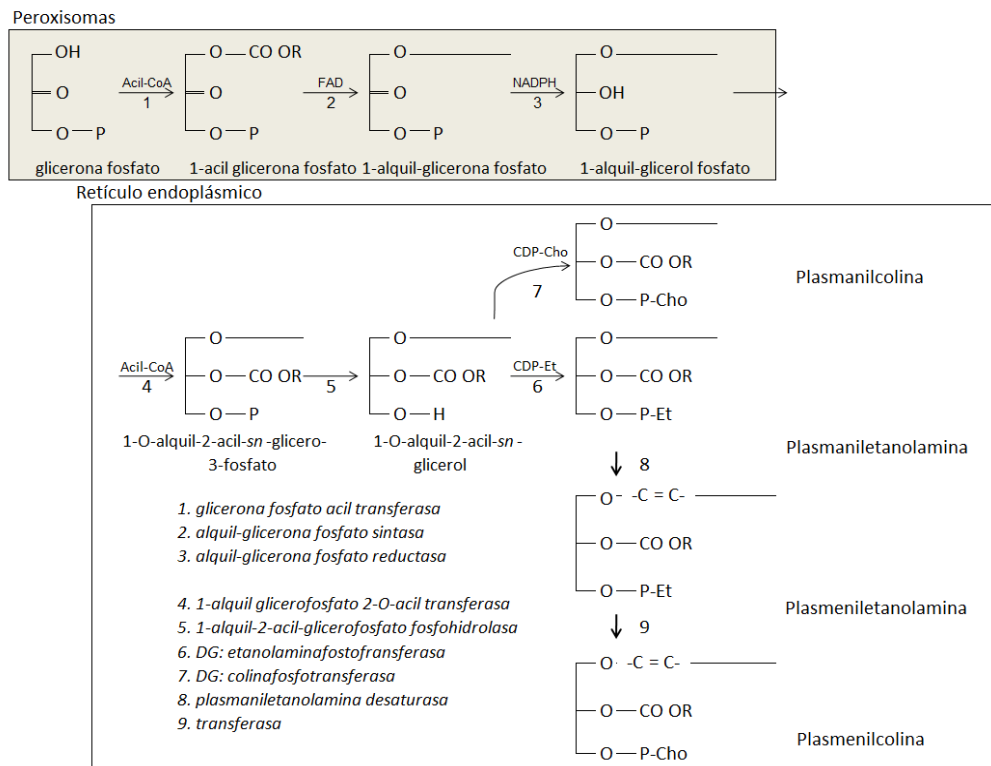
Se sabe desde hace unos 20 años que una parte de las enzimas responsables de la síntesis de los lípidos con una unión éter se localiza en los peroxisomas, y que el resto se localiza en el retículo endoplásmico (Hajra & Das 1996). Para la biosíntesis de estos fosfolípidos, se requiere inicialmente de la glicerona fosfato, tradicionalmente conocida como dihidroxiacetona fosfato (DHAP). Ésta es sintetizada en el peroxisoma a partir de la deshidrogenación del glicerol-3-fosfato, y de acil-CoAs de cadena larga peroxisomales (**Fig. 5**). Estos últimos pueden 1) ingresar al peroxisoma a través del transportador PMP70 luego de su síntesis en el retículo endoplásmico, o 2) producirse en el peroxisoma mismo por  $\beta$ -oxidación de AcilCoA de cadena *muy* larga (VLCFA-CoA), luego de haber ingresado al peroxisoma desde el citosol a través del transportador ABCD1 (Fig. 5). A esto siguen tres pasos intra-peroxisomales importantes: 1) Una acil-transferasa (la glicerona fosfato O-acil transferasa, GPAT), que transfiere un ácido graso desde la Acil-CoA a la glicerona-fosfato, con lo que se forma la 1-acil-glicerona fosfato. 2) Ésta es convertida en alquil-glicerona fosfato por la alquil-glicerona-fosfato sintasa (AGPS) a través del intercambio del *ácido* graso que estaba en la posición *sn-1* de la molécula por un *alcohol* graso. 3) Como tercera etapa, se produce la reducción del grupo ceto de la 1-alquil-glicerona fosfato a grupo hidroxilo, a través de una reductasa que requiere NADPH. El producto resultante, 1-alquil-2-hidroxi-*sn*-glicero-3-fosfato (GPA), fuera del peroxisoma, es canalizado hacia la formación de GPL con uniones éteres, a través de pasos adicionales que ocurren en el retículo endoplásmico. Es interesante destacar que el alcohol graso que se introduce en lugar del ácido graso en el paso 2 también se sintetiza en la membrana peroxisomal, sólo que en su lado externo, a partir de otro acil-CoA, paso catalizado por una acil-CoA reductasa que requiere NADPH (**Fig. 6**)





**Fig. 6.** Resumen de la interacción y localización celular de las enzimas peroxisomales y del retículo endoplásmico que intervienen en la biosíntesis de lípidos con una unión éter (Adaptado de (Lodhi & Semenkovich 2014)). La vía de la glicerona fosfato (GP) es obligatoria para la síntesis de estos lípidos, pero además puede servir como una vía alternativa para formar diacil-GPL. Para ello la 1-acil glicerona fosfato (Acil- GP), en vez de proseguir hasta 1-Alquil glicerona fosfato (Alquil-GP), puede ser reducida en su grupo ceto para dar 1-acil-glicerol-3-fosfato (ácido lisofosfatídico), el cual puede ser acilado en sn-2 para dar ácido fosfatídico y este ser utilizado como precursor de diacil-GPL.

Una vez en el retículo endoplásmico, el 1-alquil-glicerol-fosfato (GPA) puede adquirir un ácido graso en su hidroxilo libre en la posición *sn*-2 por acción de una acilCoA: GPA acil transferasa. La molécula lipídica formada, como se puede notar, se asemeja al ácido fosfatídico, con la única diferencia de que tiene un grupo alquilo en lugar de un grupo acilo en *sn*-1. Al perder su fosfato por acción de una fosfohidrolasa, se convierte en un diglicérido con un grupo alquilo en *sn*-1 (1-O-alquil, 2-acil-*sn*-glicerol). Luego, éste es tratado tal como lo son los 1,2-diacil-*sn*-gliceroles, es decir que puede dar lugar a los fosfolípidos plasmánil-colina y plasmánil-etanolamina por la vía de Kennedy (esto es, utilizando CDP-colina o CDP-etanolamina como dadores de fosfocolina o fosfoetanolamina, respectivamente). Alternativamente, este 1-O-alquil-2-acil-*sn*-glicerol es un diglicérido que puede ser convertido a un triglicérido con un grupo alquilo en *sn*-1, esto es un TUE, si su hidroxilo en *sn*-3 es objeto de la actividad de una diglicérido acil transferasa (DGAT).



**Fig. 7.** Esquema de la ruta biosintética de los GPL de colina (Cho) y de etanolamina (Et) con uniones éteres a partir del alquil-glicerol-fosfato.

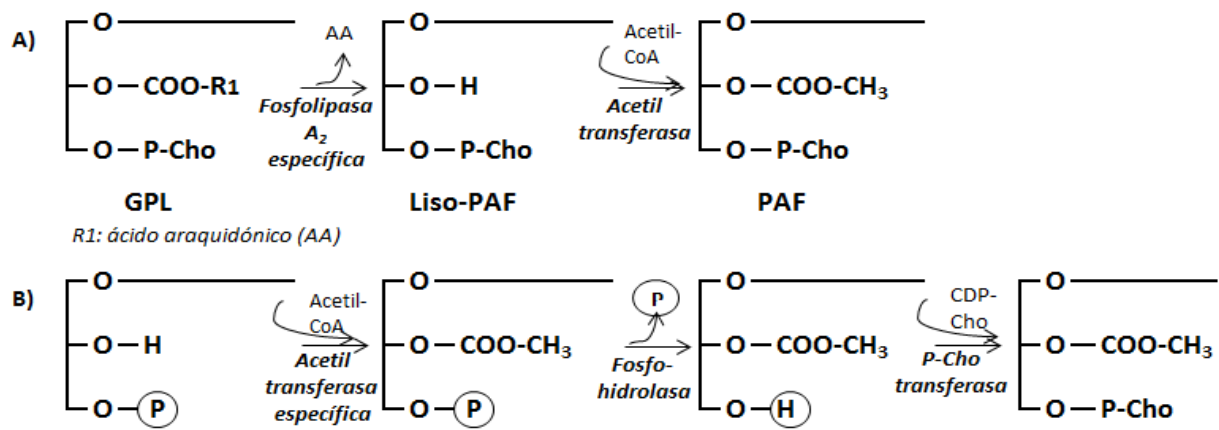
La plasmaniletanolamina da lugar a la plasmeniletanolamina por acción de una desaturasa (la enzima 8 en el esquema de la Fig. 7, que requiere citocromo b5, O<sub>2</sub> y equivalentes reductores), y ésta puede dar lugar a la plasmencilolina, por acción de la enzima 9, una transferasa que está entre las aún no completamente caracterizadas (Watschinger & Werner 2013). Una de ellas podría ser la CDP-colina: diglicérido colina fosfotransferasa, ya que la plasmeniletanolamina puede hidrolizarse perdiendo el grupo polar para dar el diglicérido 1-alquenil-2-acil-*sn*-glicerol, el cual puede ser modificado por esta enzima uniéndole la fosfocolina. Otra podría ser una N-metil transferasa (MT) similar a la descrita en el hígado para sintetizar PC a partir de PE luego de tres metilaciones sucesivas en el grupo amino de ésta (Vance 2014).

### **-1-O-alkuil-2-acil-*sn*-glicero-3-fosfolípidos**

En el esquema de la Fig. 7 se advierte claramente que la 1-O-alkuil-2-acil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina (plasmaniletanolamina) cumple un rol esencial como *precursora* de los *plasmalógenos* de etanolamina y eventualmente también de los de colina. Otros lípidos de membrana funcionalmente importantes que presentan una unión 1-O-alkilo son: 1) El fosfoinosítido que forma parte de las uniones glicosil-fosfatidilinositol (GPI) que permiten el anclaje a la membrana plasmática celular de proteínas funcionalmente muy diversas (Fujihara & Ikawa 2015); estas estructuras de anclaje contienen manosa, glucosamina, etanolamina, y 1-O-alkuil-2-acil-3-glicero-3-fosfoinositol (Luhrs & Slomiany 1989), 2) El lípido conocido como “seminolípido”, esto es, el 1-O-alkuil-2-acil-*sn*-glicero-3-galactosa-3-sulfato, que es específico de los espermatozoides (Ishizuka *et al.* 1973, Tadano-Aritomi *et al.* 2003).

La 1-O-alkuil-2-acil-*sn*-glicero-3-fosfocolina es un producto final, con bajas proporciones en algunas células y tejidos pero llamativamente muy abundante en los leucocitos. Así, esta subclase alcanza un 46% del total de los CGP en los polimorfonucleares sanguíneos de conejo (Mueller *et al.* 1982), el 50% en el caso de los humanos (Tence *et al.* 1985), y tanto como el 75.5% de los CGP de los eosinófilos sanguíneos en el hombre (Ojima-Uchiyama *et al.* 1988). También abunda en los macrófagos alveolares de conejo (Sugiura *et al.* 1982) y de rata (Albert & Snyder 1983), en los que alcanza el 33% y el 35% de los CGP, respectivamente. Es interesante notar que todas estas células tienen en común que son fagocitos y que participan en respuestas inflamatorias. Llamativamente, en espermatozoides de cerdo la plasmanilcolina representa tanto como el 55% de los CGP y la plasmaniletanolamina el 50% de los EGP (Evans *et al.* 1980). Si bien las células mencionadas y los espermatozoides tienen funciones muy distintas, un punto en

común es que ambas tienen la posibilidad de sintetizar el fosfolípido 1-O-alkil-2-acetil-sn-glicero-3-fosfocolina, conocido tradicionalmente como factor activador de plaquetas (PAF) o Paf-acether. Los neutrófilos polimorfonucleares, los monocitos y los linfocitos humanos (Jouvin-Marche *et al.* 1984), al igual que los espermatozoides de rata (Muguruma & Johnston 1997) pueden sintetizar este potente mediador lipídico a partir de la deacilación de la 1-O-alkil-2-acil-sn-glicero-3-fosfocolina (plasmencilcolina) por el camino conocido como “vía de la remodelación”, o por el camino que implica síntesis *de novo* del PAF, esquematizados en el siguiente esquema:



**Fig. 8.** Vías para la síntesis del PAF-acether. A) Camino de la remodelación, que comienza con la hidrólisis de un ácido graso de una plasmencilcolina. B) Camino de la síntesis *de novo*. Esquema adaptado de (Prescott *et al.* 1990). Es interesante notar que a través de la vía A) se generan potentes metabolitos bioactivos, no sólo el PAF sino AA, que puede ser precursor de prostaglandinas y leucotrienos.

### -Triglicéridos con una unión éter

Cuando se someten los triglicéridos totales a cromatografía en capa fina con solventes no polares, como p. ej., benceno, o mezclas de hexano y éter, debido a la menor polaridad de la unión éter que de la unión éster en *sn-1*, los triglicéridos con una unión éter (TUE) tienden a migrar siempre un poco más adelante que los TAG. Esta propiedad permitió identificar a las dos clases de TUE que se muestran en la **Fig. 4** en estudios de alrededor de la década del 70, en su mayor parte liderados por el grupo de Fred Snyder (Wood & Snyder 1968, Snyder & Blank 1969). El interés por estos lípidos neutros se estimuló mucho en esa época debido a que se hallaron TUE en distintos tumores de origen humano (Wood & Snyder 1967) así como en líneas celulares tumorales (Cheng *et al.* 1967). En muchos tumores trasplantables a animales, los niveles de TUE eran mucho más altos que los presentes en áreas no tumorales de los

mismos tejidos (Snyder & Wood 1968), (Snyder & Wood 1969). Más adelante se establecieron aspectos específicos de su composición en cadenas alquílicas (Lin *et al.* 1978) y su metabolismo (Scott *et al.* 1979) en células tumorales específicas.

Glicéridos neutros con una unión éter, tanto 1-alkil-DAG como 1-alkenil-DAG fueron descritos hace algunas décadas como componentes importantes de la secreción sebácea de la glándulas prepucales de ratón (Sansone & Hamilton 1969) y rata (Mukherjea 1977) sexualmente maduros, cuya biosíntesis, como la secreción de las glándulas, es estimulada por andrógenos. Por su parte, los 1-alkil-DAG se hallaron como componentes naturales importantes del lípido secretado por la glándula harderiana del ojo (Blank *et al.* 1972, Jost 1974). Sobre este lípido en particular se han realizado numerosos estudios ulteriores en diversos mamíferos y en células en cultivo, incluyendo investigaciones sobre su composición de ácidos grasos, (Yamazaki *et al.* 1981) dimorfismo sexual, (Seyama *et al.* 1995) biosíntesis (Park *et al.* 1993, Miyazaki *et al.* 2001) y modificaciones en tumores propios de la glándula harderiana (Kasama *et al.* 1989).

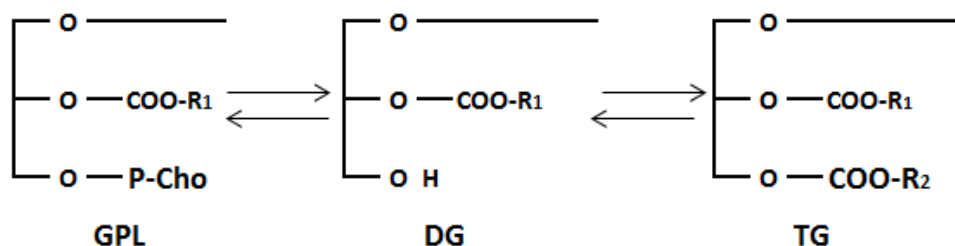
Las referencias en la literatura sobre estos triglicéridos con uniones éteres son en general escasas o fragmentarias. Un único estudio sobre la capacidad del tejido nervioso para producir este tipo de triglicéridos fue llevado a cabo en la retina por la Dra. Giusto en el INIBIBB (Giusto & Bazan 1973), en los que estableció que su nivel se incrementaba significativamente en la retina bovina incubada en condiciones de anoxia. Con el relativamente reciente auge de la metabolómica y el uso de células aisladas, mediante una combinación de espectrometría de masa y NMR, se demostró que entre un 10 y un 20% de los lípidos neutros que se acumulan en las gotas lipídicas celulares están presentes en forma de triglicéridos con una unión éter, en particular el alkil-DAG (Bartz *et al.* 2007). Este hallazgo sorprendió mucho a sus autores, quienes concluyeron que las gotas lipídicas posiblemente jueguen un rol importante en el metabolismo intermedio de los lípidos con una unión éter.

En trabajos previos de nuestro laboratorio, la relativa facilidad de separación de los TUE por cromatografía permitió estudiarlos en los túbulos seminíferos del testículo de rata adulta (Furland *et al.* 2003). Estos túbulos contienen la mayor parte de las células del testículo, ya que en su interior proliferan y maduran las células de la línea germinal o espermatogénicas y las células somáticas de sostén conocidas como células de Sertoli. En ellos se reportó que además de abundantes TAG, una pequeña pero significativa proporción de los triglicéridos totales eran TUE, siendo mayoritarios los que contenían una unión *alkilo*, esto es, 1-O-alkil-DAG (Furland *et al.* 2003).

Estudios más recientes confirmaron esta observación, y mostraron que una fracción aún más pequeña de los triglicéridos testiculares de rata estaba formada por triglicéridos con una unión *alquenilo* (Zanetti & Aveldaño 2014).

Luego de inducir experimentalmente *in vivo* la lesión y muerte selectiva de las células germinales con supervivencia de las células de Sertoli, como fue el caso del criptorquidismo (Furland *et al.* 2007a), la irradiación con una única dosis de rayos X (Oresti *et al.* 2010a) o la administración de dosis repetidas del antineoplásico doxorubicina (Zanetti *et al.* 2007), se hicieron observaciones muy interesantes sobre los TUE. Si bien estos estudios tenían como foco principal la pérdida selectiva por parte del testículo *in vivo* de las ceramidas y esfingomielinas con ácidos grasos poliinsaturados de muy larga cadena (VLCPUFA) cuando morían las células espermatogénicas, se observó que en los períodos críticos en que se estaban perdiendo dichas células se incrementaba la producción de TAG y de TUE. Los autores interpretaron que estos incrementos no ocurrían en las células germinales que morían sino en alguno de los tipos celulares que sobrevivían, en especial en las células de Sertoli. Se propuso como posibilidad que al llevar a cabo éstas la fagocitosis seguida del catabolismo de los dirradil-GPL que hasta el momento de la lesión celular habían formado parte de las membranas de las células germinales, dichos GPL se hidrolizarían hasta los correspondientes dirradil-diglicéridos, y que la actividad de una diglicérido-acil-transferasa (DGAT) podría esterificar un ácido graso en la posición *sn-3* de los mismos para dar los correspondientes TAG y TUE, como se esquematiza para un TUE genérico en la **Fig. 9**.

Es sabido que cualquier exceso de triglicéridos en una célula se almacena temporariamente en la forma de gotas lipídicas. Recordemos que éstas contienen una amplia variedad de lípidos neutros, incluyendo, además de los mayoritarios TAG, alquil-DAG, ésteres de colesterol, y varios otros (Bartz *et al.* 2007). La importancia de los triglicéridos como clase lipídica almacenada en gotas lipídicas es que pueden tener dos destinos posibles: o bien ser utilizados como fuente de energía luego de ser hidrolizados a ácidos grasos y glicerol, o bien sus distintas partes (ácidos grasos, diglicérido, monoglicérido, glicerol) ser empleados con ventaja con fines biosintéticos. Por ejemplo, removiendo el ácido graso de la posición *sn-3* de un TAG, un alquil-DAG o un alquenil-DAG por una TG lipasa, podrían formarse los correspondientes diglicéridos, y éstos podrían servir de sustratos para biosintetizar las tres subclases de GPL.



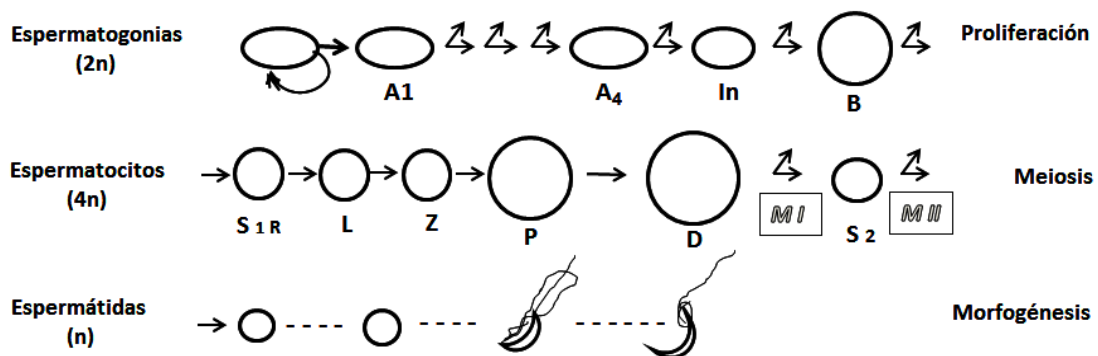
**Fig. 9.** Posibles relaciones metabólicas entre un glicerofosfolípido y un triglicérido a través de un diglicérido. Se ilustra en este caso lípidos de la subclase que contiene una unión alquil-éter. Tanto el GPL como el TG podrían convertirse en DG durante su *catabolismo*, quedando libre el hidroxilo en *sn-3* (al perder el primero la cabeza polar por una fosfolipasa y el segundo el ácido graso de la posición *sn-3* por una TG lipasa). EL DG resultante a su vez podría continuar su catabolismo, o bien ser utilizado como sustrato para biosintetizar a) un GPL de colina o de etanolamina con una unión éter través de la vía de Kennedy, o bien b) un TG por la actividad de una DGAT.

La relación entre los dirradil-GPL y los dirradil-TG podría ser por lo tanto, potencialmente, un camino de ida y vuelta, cada uno catalizado por enzimas distintas. Esta posibilidad encuentra apoyo en estudios del grupo de Vance (van der Veen *et al.* 2012), en los que se demuestra que la fosfatidilcolina (PC) puede ser una fuente de TG en determinadas condiciones fisiopatológicas, como es el caso de la esteatosis hepática.

#### -Lípidos con uniones ésteres y éteres en el testículo de rata

La espermatogénesis en mamíferos es un extraordinario proceso de transformación celular. Bajo el sostén metabólico y estructural provisto por las células de Sertoli, comienza con la división asimétrica de las espermatogonias más primitivas, a las que se les asigna el rol de células madre (**Fig. 10**), seguida de una sucesión de espermatidas con una alta capacidad de diferenciación y alta tasa de proliferación, siendo la más diferenciada la tipo B. Ésta al dividirse genera espermatocitos primarios que entran en un complejo proceso denominado profase de la meiosis I, en la que los cromosomas homólogos (paterno y materno) de una célula diploide (2n) se alargan, se separa entre sí, y luego se duplican (4n). Las cromátidas homólogas no hermanas se ponen a la par e intercambian material genético (recombinación genética o *crossing over*), paso responsable de las variaciones genéticas entre padres e hijos, ya que ahora las cromátidas tienen una combinación de material genético distinto del de las células somáticas de ese mismo animal. En el estado de *paquiteno* los cromosomas se han apareado completamente y permanecen así durante un tiempo relativamente largo (unas 2 semanas en la rata (Russell *et al.* 1990). Hacia la mitad de este período las células se vuelven muy activas en sus procesos de síntesis (RNA, proteínas) y crecen rápidamente de tamaño. En la fase *diploteno* de la meiosis los pares de

cromosomas apareados se separan, excepto en los puntos de contacto denominados quiasmas, y en contraste con los períodos previos, los procesos de división celular que siguen (metafase, anafase y telofase de la primera división meiótica, o **meiosis I** (MI en la Fig. 10), se completan rápidamente. Se forman los espermatocitos secundarios (S 2), células de vida media muy corta en las cuales se produce la segunda división meiótica o **meiosis II** (MII) cuyas fases (profase, anafase, etc) son breves, por lo que rápidamente se generan a partir de ellos células haploides (n) más pequeñas, las espermátidas, cada una de ellas con material genético no idéntico entre sí.



**Fig. 10.** Esquema de la diferenciación celular durante la espermatogénesis (adaptado de Nishimune & Okabe 1993). Ésta se divide en tres fases: 1) proliferación de espermatogonias a partir de células madre capaces de autoperpetuarse y diferenciarse a sucesivos tipos de espermatogonias (varias A, Intermedias (In) y B), todas con un alto índice de mitosis (células diploides, 2n); al dividirse, las B dan lugar a 2) los espermatocitos primarios, que entran a la profase de la meiosis I (MI), un largo proceso de diferenciación (S 1R, espermatocitos primarios en reposo o en preleptoteno; L, leptoteno; Z, cigoteno; P, paquiteno; D, diploteno) al finalizar la cual se han duplicado los cromosomas homólogos (4n) y se han intercambiado parte de su material genético, seguida de dos sucesivas divisiones (M I y M II) que culminan en los espermatocitos secundarios (S 2). Éstos al dividirse se convierten en espermátidas (haploides, n). 3) Desde espermátidas redondas tempranas hasta que se liberan los espermatozoides tiene lugar una serie de procesos morfogénicos, conocidos como espermiogénesis.

A esta fase le sigue otra en la cual las jóvenes espermátidas que se han producido en el estadio anterior ya no se dividen, sino que sufren una serie de transformaciones morfogénicas asombrosas, la espermiogénesis, que en la rata dura unas 3 semanas (Russell *et al.* 1990). Se desarrollan el flagelo y el acrosoma, el núcleo se desplaza, cambia de forma y se condensa; la espermátida se elonga y sus componentes también se compactan, al mismo tiempo que su volumen se reduce a un cuarto de su tamaño original. En esta reducción de tamaño participan la eliminación de agua y la pérdida de parte del citoplasma, al deshacerse las espermátidas 1) de los complejos tubulobulbares que las mantenían unidas por su cabeza a las célula de

Sertoli y 2) de una buena porción de citoplasma, organelas, restos de citoplasma y otros materiales (por ejemplo RNA, proteínas, lípidos) que el espermatozoide ya no necesitará. Esos residuos de la diferenciación, que antes formaron parte de las espermatidas más diferenciadas, (las elongadas y condensadas) son densamente empaquetados en pequeñas partículas rodeadas de membrana conocidas como **cuerpos residuales**, los cuales se desprenden para ser fagocitados por las células de Sertoli, a medida que éstas se convierten en espermatozoides y se liberan hacia el lumen de los túbulos seminíferos.

En la rata, la primera ronda de espermatogénesis en la vida postnatal ocupa desde la primera a la sexta semana de la vida, y las características morfológicas y estructurales de las células que aparecen en cada etapa están definidas desde hace décadas (Clermont & Perey 1957). En ratas de 6 días proliferan las espermatogonias tipo A generando espermatogonias tipo B, comprometidas para continuar la diferenciación. Antes del día 15 postnatal, la multiplicación de estas células ha cesado y en algunos túbulos se encuentran algunos espermatoцитos en cigoteno. A medida que los espermatoцитos alcanzan estadios más avanzados de la espermatogénesis, y migran en dirección a la luz tubular, una nueva generación de espermatogonias tipo B y espermatoцитos en reposo aparece, con lo cual, en ratas de 18 días, la mayoría de los túbulos contiene 2 generaciones de células germinales. En animales de 20 días (Russell *et al.* 1990) o 23 días (Clermont & Perey 1957) los túbulos contienen **espermatoцитos** en todas las fases de la larga profase meiótica.

A los 26 días, todas las secciones tubulares contienen un alto número de espermatoцитos en paquiteno y unos pocos túbulos contienen espermatidas tempranas, y después del día 26, se ven espermatidas en cada vez más túbulos. Al día 32, el elemento germinal más avanzado son espermatidas en los primeros pasos de elongación (Russell *et al.* 1990). Los días 33, 38, 41 y 45 las espermatidas alcanzan los pasos 7, 9, 14 y 19 de la espermiogénesis (Clermont & Perey 1957, Russell *et al.* 1990). Es interesante destacar que muchas de las primeras células en ser producidas, incluidas las primeras espermatidas, degeneran.

Un estudio realizado por citometría de flujo muchos años más tarde permitió a sus autores medir la cantidad de células diploides (2n), tetraploides (4n) y haploides (n) a medida que aparecen durante el desarrollo (Malkov *et al.* 1998) con resultados comparables a los recién descritos. Muestran que a los días postnatales 6-7 el testículo contiene sólo células somáticas y espermatogonias (2n). Los espermatoцитos en leptoteno y en zigoteno están presentes los días 13-14 y 17-18, respectivamente.



Entre los días 19-20 y 22-23 aparecen espermatoцитos en paquiteno tempranos y tardíos, respectivamente, con lo que al día 20-21 hay partes aproximadamente iguales de células 2n y 4n. Las espermátidas (n) aparecen por primera vez los días 24-25, y las espermátidas en elongación los días 30-31. El día 30 resulta haber proporciones similares de células 2n, 4n y al día 36 ya empiezan a predominar las células n sobre las otras dos. Un estudio ulterior, comenzando el día 30 y abarcando períodos más largos (Yoon *et al.* 2001) permitió observar cambios en el mismo sentido.

### **-Cambios en los lípidos testiculares con el desarrollo postnatal y la diferenciación celular**

En roedores, estudios clásicos sobre sus lípidos testiculares habían mostrado que el testículo de rata incrementa su contenido en GPL de colina y de etanolamina, así como de triglicéridos entre la semana 4 de vida postnatal y los 6 meses de edad (Davis *et al.* 1966). Estos lípidos se enriquecen en un ácido graso por entonces tentativamente identificado como docosapentaenoico (22:5n-6), por lo que los autores interpretaron que este cambio ocurría en coincidencia con la aparición de las espermátidas. Un estudio ulterior del mismo grupo (Beckman & Coniglio 1979) comparó la composición de ácidos grasos, en células de Sertoli y germinales (espermatoцитos y espermátidas) aisladas del testículo de rata encontrando 1) que los espermatoцитos tenían una composición similar aunque proviniesen de ratas inmaduras o adultas, a diferencia de las espermátidas tempranas y adultas, y 2) que las principales clases de fosfolípidos y de triglicéridos de las espermátidas eran más ricas en 22:5n-6 que los espermatoцитos. Otro estudio en que se aislaron espermatoцитos tempranos y tardíos, así como espermátidas redondas y elongadas, (Grogan *et al.* 1981) observaron que el contenido de 22:5n-6 se incrementaba progresivamente desde un 2 a un 20% en esa dirección, aunque disminuía nuevamente en los espermatozoides maduros. Otro PUFA presente en el ratón fue el 22:6n-3, pero éste no mostró correlación con el tipo celular. Desde entonces, han sido escasos los estudios disponibles sobre los cambios que ocurren en la composición de lípidos testiculares específicos y sus ácidos grasos en la rata o el ratón con el desarrollo postnatal y su correlación con lo que ocurre en células en estadios específicos del ciclo espermatoгéxico. Esto es particularmente cierto para el caso de los lípidos con una unión éter, tanto polares como neutros.

Este fue el objetivo de los estudios cuyos resultados se presentan en las primeras secciones del primer capítulo de esta tesis. En animales de distintas edades postnatales, que se eligieron teniendo en cuenta la abundancia relativa en el testículo

de rata en desarrollo de células en determinados estadios de diferenciación (día 14, virtualmente sólo células  $2n$ ; día 21, células  $2n$  en igual número que  $4n$ ; día 30, células  $2n + 4n + n$  en igual proporción (Malkov *et al.* 1998), y días 45 y 120 (adulto), predominio (42-45%) de células  $n$ ) (Yoon *et al.* 2001) estudiamos las dos subclases principales de los GPL de colina y de etanolamina, así como los TAG y TUE. Los mismos lípidos se estudiaron luego en el animal adulto, en túbulos seminíferos y en células espermatozógenas aisladas a partir de ellos. Se preparó para ello una fracción enriquecida en espermatozoides en paquiteno y otra conteniendo espermátidas redondas. Dada la relativa facilidad de su aislamiento como productos secundarios relativamente puros de estas preparaciones, y la total falta de información sobre ellos, se incluyeron en este estudio con fines comparativos también a los lípidos de los cuerpos residuales.

### **Cambios en los lípidos testiculares del animal adulto con el estrés térmico**

El proceso de la espermatogénesis es dependiente de la temperatura. Normalmente en los mamíferos ocurre en forma óptima a la temperatura escrotal, que es unos grados inferior a la temperatura corporal de  $37^{\circ}\text{C}$  (Banks *et al.* 2005). Tanto las células germinales testiculares como los espermatozoides que se encuentran en el epidídimo son sensibles a la lesión por el estrés térmico (Zhu *et al.* 2004). Los espermatozoides que resultan de células germinales expuestas a la hipertermia sufren apoptosis (Yin *et al.* 1997) contienen DNA dañado (Perez-Crespo *et al.* 2008) y muestran disminución o pérdida de su capacidad fertilizante. La apoptosis de células germinales que sigue al estrés térmico afecta a las células germinales en una forma dependiente del estadio del ciclo espermatogénico en que se encuentran, principalmente a los espermatozoides en paquiteno y diploteno y a las espermátidas tempranas (Setchell 1998, Lue *et al.* 1999). Los eventos moleculares responsables de la apoptosis inducida por el estrés térmico se han estudiado en gran detalle, e incluyen tanto la activación de la vía intrínseca como la extrínseca de la apoptosis (Kim *et al.* 2013). Un extensivo review sobre las causas, efectos, y respuestas moleculares de las células germinales masculinas al estrés térmico, incluyendo apoptosis, lesión al ADN y autofagia ha aparecido en una reciente revisión (Durairajanayagam *et al.* 2015)

La severidad de la lesión a las células germinales cuando son sometidas al estrés térmico depende de la intensidad, duración, y frecuencia de las exposiciones. La importancia clínica de este problema se refleja en el criptorquidismo, un problema del desarrollo en el que los testículos postnatales permanecen alojados en la cavidad

abdominal a una temperatura constante de 37°C. Las lesiones asociadas al criptorquidismo pueden ser irreversibles si no se corrige la situación, porque si bien en el órgano sobreviven las espermatogonias de tipo A, capaces de proceder a través del ciclo, no pueden producir células diferenciadas (Nishimune & Okabe 1993), y referencias allí citadas). Sin embargo, el defecto es potencialmente reversible al transferir el testículo al escroto quirúrgicamente. Manipulando el criptorquidismo experimental y su reversión quirúrgica en la rata, estos autores observaron que la cinética de la diferenciación de las células germinales a partir de las espermatogonias sobrevivientes era muy similar a la de la espermatogénesis normal.

Existen muchos modelos de hipertermia moderada para investigar sus efectos sobre el epitelio germinal y sus componentes, entre ellos el del criptorquidismo experimental, el del aislamiento térmico local del testículo, y el de la hipertermia transitoria, que consiste en sumergir sólo la parte en que se encuentra dicho órgano en un baño termostático a la temperatura en estudio durante un tiempo acotado (Setchell 1998)

Frente a la extensa literatura que existía en este campo, la información disponible al comenzar esta tesis relativa a los efectos de la hipertermia sobre los lípidos testiculares era muy escasa. Con respecto a los lípidos y ácidos grasos de nuestro interés, contábamos con un trabajo previo del grupo (Furland *et al.* 2007a) en el que se había observado que el criptorquidismo experimental en la rata adulta resultaba, a los días 5 y 10 post-cirugía, en una disminución de los GPL de colina y de etanolamina ricos en 22:5n-6 y de la esfingomielina con PUFA de muy larga cadena (VLCPUFA). Entre los primeros, disminuían tanto la PC y la PE como los correspondientes plasmalógenos. Por el contrario, a medida que transcurría el tiempo de criptorquidismo aumentaban varias veces para luego disminuir, los niveles de triglicéridos (TAG y TUE), así como de ésteres de colesterol (EC), todos ellos ricos en 22:5n-6 entre otros PUFA. Dado que entre las células intra-tubulares el criptorquidismo no afectaba a las de Sertoli, se propuso que estos incrementos transitorios se asociaban a actividades propias de éstas. Asimismo, considerando que tanto estas células como las espermatogonias tipo A permanecían viables, se propuso que estos cambios en lípidos serían reversibles si el testículo se podía volver a su posición original fuera del abdomen (Furland *et al.* 2007a). Para demostrar la pérdida, seguida de la posible reversibilidad de los efectos de la hipertermia in vivo sobre los lípidos de las células germinales al recuperarse éstas, evitando las dobles cirugías que implicaba el modelo del criptorquidismo, la Dra. Furland puso a punto un modelo de hipertermia moderada experimental que consistió en exposiciones cortas (15 minutos) y

espaciadas (una por día) pero repetidas (durante 5 días consecutivos) a una temperatura de 43°C. Los resultados de la tercera sección del primer capítulo de esta tesis tuvieron por objetivo despoblar al testículo de rata adulta *in vivo* de sus células germinales empleando este protocolo, para estudiar los cambios en los lípidos testiculares, con un foco en los lípidos con uniones éteres y sus ácidos grasos, así como determinar su reversibilidad.

### **Lípidos con uniones éteres y éteres en el epidídimo de rata**

El epidídimo es una de las estructuras más asombrosas del tracto reproductor masculino. Consiste en un largo y contorneado túbulo que conecta la *rete testis*, sitio por el cual los espermatozoides diferenciados dejan el testículo, con el *vas deferens*, punto de partida de los espermatozoides al momento de la eyaculación. Es la estructura cuyo epitelio juega un rol fundamental en el transporte, la maduración, y el almacenamiento de espermatozoides. El espermatozoide que entra al epidídimo carece de motilidad y es incapaz de fertilizar por sí sólo un ovocito. Bajo la acción de andrógenos y otros factores aún no totalmente identificados, en el epidídimo se orquestan cambios morfológicos y bioquímicos de las gametas masculinas, que en conjunto se conocen como maduración espermática (Knobil & Neill's 2006). Clásicamente el epidídimo es dividido en tres segmentos: el *caput* proximal, el *corpus* su parte intermedia, y la *cauda* distal. El túbulo epididimal está tapizado por dentro por un epitelio secretorio pseudoestratificado, con uniones estrechas entre sus células que logran que el medio intraluminal tenga una composición de electrolitos y macromoléculas distinta de los fluidos circulantes y distinta entre las tres regiones. Sus células biosintetizan y secretan muy activamente proteínas que son adquiridas por los espermatozoides durante su maduración (Robaire & Viger 1995). Muchas de estas proteínas han sido clonadas (Kirchhoff 1999), y algunas tienen características inusuales. Llamativamente para nosotros, algunas de estas proteínas secretadas tienen un ancla de glicosilfosfatidilinositol (GPI), y son adquiridas por la membrana plasmática de los espermatozoides en el interior de vesículas secretorias. Las funciones del epitelio epididimal son absorber, sintetizar y secretar distintas moléculas, incluyendo una variedad de iones inorgánicos y orgánicos, con lo cual logra crear un microambiente altamente especializado para que el espermatozoide adquiera gradualmente su movilidad progresiva y otras propiedades cuyo objetivo final promover las capacidades del espermatozoide para fertilizar.

Al comenzar esta tesis sabíamos que al madurar en su tránsito entre el *caput* y la *cauda* epididimal, el espermatozoide de rata (Scott & Dawson 1963) como el de

otras especies pierde parte de sus lípidos originales y se enriquece proporcionalmente en plasmalógenos de colina y de etanolamina. Estudios posteriores habían mostrado que esos plasmalógenos, en especial la plasmenilcolina, se enriquece en 22:4n-9 (Aveldaño *et al.* 1992), un ácido graso que está ausente de los plasmalógenos testiculares en la rata (Oresti *et al.* 2010b). No hallamos datos en la literatura que nos permitieran acercarnos a contestar la pregunta de cómo ese lípido tan distintivo es adquirido por la gameta. Entre las evidencias (indirectas) de que células del epidídimo deben ser capaces de sintetizar plasmalógenos, se había reportado que su epitelio es muy rico en peroxisomas, y que dos de las enzimas peroxisomales involucradas en los primeros pasos de la síntesis de plasmalógenos se expresan activamente en él, tanto a nivel mRNA como proteína (Reisse *et al.* 2001). En el segundo capítulo de esta tesis profundizamos en el estudio de los lípidos epididimales, focalizándonos en los lípidos con una unión éteres, tanto polares como neutros. Primeramente lo hicimos en el epidídimo de rata durante distintas etapas del desarrollo postnatal hasta llegar a su madurez sexual. Luego nos abocamos a estudiar las diferencias naturalmente existentes entre las tres regiones (*caput, corpus y cauda*) en el animal adulto, tanto en contenido como en composición de ácidos grasos de GPL y sus subclases. El hecho de que existan TUE en los túbulos seminíferos del testículo nos llevó a cuestionarnos si los habría también en el epidídimo, y cuáles serían sus características, por lo que profundizamos el estudio de estas subclases de triglicéridos en las tres regiones epididimales.

Por último, teniendo en cuenta la estrecha relación de continuidad funcional y de cercanía anatómica que existe entre el testículo y el epidídimo, al someter el escroto a las exposiciones repetidas a la hipertermia moderada descritas unos párrafos más arriba para el testículo, el epidídimo también queda expuesto. Si bien se dispone de datos sobre los efectos de la hipertermia escrotal sobre parámetros espermáticos en el perro (Henning *et al.* 2014) sobre los niveles de AMP cíclico en la rata (Kampa & Frascella 1977), y sobre la integridad de la cromatina espermática en el hombre (Ahmad *et al.* 2012), no se encontraron estudios previos referentes a los *lípidos* epididimales como consecuencia de haber aplicado ninguna condición de hipertermia. Es por ello que en la tercera parte del segundo capítulo nuestro objetivo fue investigar qué efecto podrían tener las exposiciones repetidas y espaciadas del testículo y epidídimo a episodios breves de hipertermia sobre los lípidos de cada una de las regiones epididimales. Los resultados obtenidos nos llevaron a tratar de correlacionar los efectos que observábamos en los lípidos con uniones éteres con la expresión

(mRNA) de una enzima peroxisomal clave requerida para su síntesis (**Fig. 6**): la alquilglicerona-fosfato sintasa (AGPS).

### **Lípidos con uniones ésteres y éteres en espermatozoides de rata**

En general, la gameta masculina madura de los mamíferos está formada por tres zonas altamente especializadas: la cabeza, involucrada en la interacción con el ovocito, que contiene el núcleo con su material genético y el acrosoma que lo cubre; la pieza media, cuyo rol es la producción de energía, ya que en ella se localizan las mitocondrias de la gameta, y el flagelo, que es el responsable de su motilidad, ya que en él se genera la fuerza motriz necesaria para llegar hasta un ovocito. El espermatozoide presenta una gran variabilidad entre especies en cuanto a su forma, tamaño, e importancia relativa de sus principales regiones (Gomendio & Roldan 2008). Mientras los espermatozoides de la mayoría de los mamíferos tienen una cabeza grande espatulada, el espermatozoide de rata tiene una muy pequeña cabeza, con una acusada forma de gancho, y por el contrario una voluminosa y larga cola.

Una pregunta sobre la cual no hallamos datos en la literatura, fue cómo se distribuirían los lípidos con uniones ésteres y éteres, en este caso los CGP y EGP, entre la pequeña cabeza y la importante cola en el caso del espermatozoide de rata. Sólo contábamos con el antecedente de un trabajo en el que se habían estudiado los lípidos de cabeza y de la cola de espermatozoides de mono, en el que se describía que el ácido graso poliinsaturado 22:6n-3 está altamente concentrado en los lípidos de la cola (Connor *et al.* 1998). También existía el antecedente de las esfingomielininas con ácidos grasos poliinsaturados de muy larga cadena en espermatozoides de toro, que se hallaron altamente concentradas en la cabeza (Furland *et al.* 2007b). En el tercer capítulo de esta tesis nos abocamos, en la primera sección, a responder el interrogante de cómo se distribuyen los lípidos entre cabeza y cola en el espermatozoide de rata, con un foco en los abundantes lípidos con una unión éter ricos en 22:5n-6 y en 22:4n-9 que poseen.

Cuando un espermatozoide sale del epidídimo, si bien tiene movilidad progresiva, no está aun totalmente capacitado para fertilizar un ovocito por sí solo. Uno de los procesos que debe sufrir para lograrlo es la así denominada “capacitación”, luego de la cual se hace apto para llegar en tiempo y forma a las inmediaciones de un ovocito. Una vez en ese sitio, el espermatozoide capacitado está en condiciones de experimentar la denominada “exocitosis acrosomal” que le permite liberar un conjunto de enzimas hidrolíticas que lleva en su acrosoma, y le permiten atravesar las capas de células y tejidos que rodean al ovocito. Tanto la capacitación como la reacción

acrosomal son procesos ampliamente estudiados en espermatozoides de diferentes mamíferos en distintas condiciones (Flesch & Gadella 2000, Brewis *et al.* 2005, Gadella *et al.* 2008) La capacitación espermática puede inducirse *in vitro* en espermatozoides aislados de la región caudal del epidídimo mediante su incubación en medios adecuados a los que se agregan diversos elementos, entre los que se incluyen sales de calcio, bicarbonato, y albúmina, u otro agente capaz de remover colesterol (Visconti *et al.* 2002) además de una fuente de energía apropiada (Travis *et al.* 2004). Dado que es una reacción dependiente de calcio, la reacción acrosomal se suele provocar mediante la adición de un ionóforo de calcio como el A23187 (p. ej., Murase *et al.* 2004).

Pese a tratarse de fenómenos que involucran a las membranas, la información disponible de cómo se afectan los lípidos espermáticos endógenos durante la capacitación y la reacción acrosomal, tanto desde el punto de vista bioquímico como biofísico, es incompleta al presente en la mayoría de las especies de mamífero, en particular en la rata. En estudios previos del laboratorio utilizando espermatozoides aislados de la *cauda* epididimal se pudo ver que durante la capacitación se produce una disminución importante en la cantidad de GPL, que afecta principalmente a los GPC (Zanetti *et al.* 2010). En la segunda parte del tercer capítulo de esta tesis nuestro objetivo fue investigar si durante incubaciones conducentes a la capacitación y la reacción acrosomal del espermatozoide de rata esta disminución de GPL podía atribuirse a los diacil-GPL o a los abundantes plasmalógenos de colina o de etanolamina que posee esta gameta.

## Objetivos generales

El objetivo principal de esta Tesis Doctoral fue lograr la caracterización de los lípidos con una unión éter en el tracto reproductor masculino de la rata en condiciones fisiológicas, como es el desarrollo postnatal y en el animal adulto, y en condiciones fisiopatológicas como la hipertermia testicular. Los objetivos particulares fueron:

### Capítulo I

- ✓ Estudiar los cambios que ocurren en el contenido y composición de lípidos específicos, en el testículo de la rata con el desarrollo postnatal, en el animal adulto y su relación con las células en estadios específicos del ciclo espermatogénico.
- ✓ Estudiar las dos subclases principales de los GPL de colina y de etanolamina, los lípidos neutros y sus ácidos grasos de las células espermatogénicas aisladas a partir de los túbulos seminíferos.
- ✓ Lograr desdoblamiento al testículo de sus células germinales como consecuencia de la hipertermia testicular, para estudiar los cambios producidos en los lípidos con uniones éteres principalmente y su composición de ácidos grasos y lograr determinar su reversibilidad.

### Capítulo II

- ✓ Caracterizar los lípidos con uniones éteres, tanto polares como neutros, en epidídimo de rata durante el desarrollo postnatal hasta llegar a la adultez.
- ✓ Estudiar las diferencias en composición de los GPL, sus subclases y sus ácidos grasos entre las tres regiones epididimales (*caput*, *corpus* y *cauda*) en el animal adulto.
- ✓ Indagar sobre los cambios causados por la hipertermia a las tres regiones del epidídimo de animal adulto y sus consecuencias sobre los lípidos.



- ✓ Determinar si la hipertermia afecta la expresión (mRNA) de una enzima peroxisomal, alquilglicerona fosfato sintasa, *AGPS*, involucrada en la biosíntesis de los lípidos con una unión éter en las regiones del epidídimo.

### Capítulo III

- ✓ Estudiar la distribución de los lípidos ricos en 22:5n-6 y en 22:4n-9 entre la cabeza y cola del espermatozoide de rata, con especial énfasis en los lípidos con unión éter.
- ✓ Indagar como los abundantes plasmalógenos de colina presentes en el espermatozoide se afectan por las reacciones asociadas a la capacitación y a la exocitosis acrosomal.

## ***MATERIALES Y MÉTODOS***

Los reactivos químicos utilizados durante los presentes estudios, así como sales, proteínas, enzimas y medios de incubación y de cultivo celular, se adquirieron en su mayor parte a Sigma Aldrich Co. Los solventes empleados para cromatografía (cloroformo, metanol, hexano, ácido acético glacial, acetonitrilo) fueron en general de grado HPLC, marca UVE, de la firma Dorwill, S. A. Argentina. La sílica gel (G y H) y las placas finas de alta performance para cromatografía en capa fina fueron adquiridas a representantes de la firma Merck, Alemania. El nitrógeno fue provisto por las firmas locales Air Liquid y BB-Industrias. Las columnas de cromatografía en fase gaseosa se obtuvieron de Supelco, Inc. a través de la firma Varian Inc. de Argentina. El equipamiento utilizado consistió en microscopios de fluorescencia, ultracentrífugas, homogenizadores, centrífugas de mesa, baños de incubación termostatzados, dispositivo para la evaporación de solventes, lámpara UV, secadores, estufas, y agitadores. El instrumental utilizado para el estudio de los ácidos grasos consistió en un cromatógrafo Varian 3700 conectado a un sistema Varian Workstation de colección y análisis de los datos. Otros materiales y sus proveedores, así como las piezas de equipamiento utilizadas, aparecen en mayor detalle en las secciones de este capítulo en que se describen procedimientos específicos.

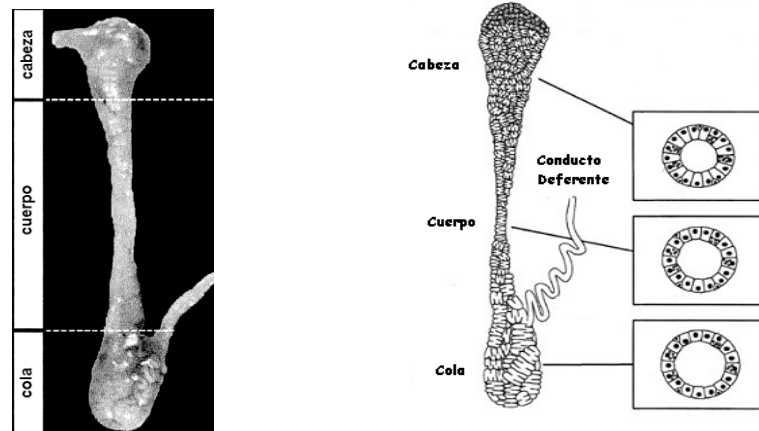
## **1. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES**

### **Obtención de tejido testicular y epididimal**

Se utilizaron ratas Wistar macho de entre 14 a 55 días para los estudios sobre el desarrollo postnatal y de 120 días en el caso animales adultos. Los animales fueron sacrificados previa exposición a una atmósfera de CO<sub>2</sub> e inmediatamente después se obtuvieron los testículos y/o los epidídimos.

Los testículos se decapsularon cuidadosamente, los vasos sanguíneos visibles se eliminaron, y el material resultante, consistente principalmente en los túbulos seminíferos y el correspondiente intersticio testicular, se enjuagó con solución fisiológica. Para aislar los epidídimos, se retiró cuidadosamente el tejido graso extraepididimal sin dejar residuos visibles y se separaron los segmentos *caput*, *corpus* y *cauda*, cabeza, cuerpo y cola (**Fig. 1**), con cortes de bisturí. Cada segmento se incubó durante 2 horas con colagenasa (5 mg/ml) en buffer HBSS (Hanks' Balanced Salt solution), el más adecuado para la óptima actividad de la colagenasa, a 37 °C, bajo un ambiente de 95%O<sub>2</sub>: 5%CO<sub>2</sub> y con agitación constante de 130 ciclos/min. Esta digestión fue necesaria para eliminar al máximo posible el tejido extraepididimal, extremadamente rico en grasa (en especial triglicéridos con un alto porcentaje de

18:2n-6). Después de la incubación, se realizaron varios lavados con el buffer HBSS, manteniendo el ambiente de O<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub> 95:5, luego de lo cual los túbulos epididimales se escurrieron y se trataron con solventes para la extracción de los lípidos.



**Fig. 1.** Epidídimo de rata y sus tres regiones principales, cabeza, cuerpo y cola. A la izquierda se muestra una fotografía, y a la derecha se presenta un esquema que ilustra diferencias en el epitelio que recubre cada región.

## Estudios en testículo y epidídimo enteros

### Desarrollo postnatal

Para analizar el efecto del desarrollo postnatal sobre los lípidos testiculares, se estudiaron ratas de entre 14 y 120 días de edad. Para el caso de los lípidos epididimales, la edad más temprana fue de 30 días teniendo en cuenta que el epidídimo se encuentra en un periodo de diferenciación a esa edad.

### Hipertermia moderada intermitente

La hipertermia se realizó sumergiendo durante 15 minutos la parte caudal de los animales, previamente anestesiados, en un baño de agua termostatzado a 43°C, llevando a cabo una exposición por día durante 5 días consecutivos. Luego de este tratamiento, los animales se secaron y se retornaron a su lugar en el bioterio a temperatura ambiente durante distintos tiempos, cumplidos los cuales se sacrificaron. Se utilizaron como controles animales de la misma camada sometidos a los mismos procedimientos y manipulaciones, salvo por la temperatura del baño (22-25°C).

### Histología y microscopía

Los testículos y epidídimos controles y tratados se fijaron en formaldehído al 10% en buffer fosfato salino (PBS), se deshidrataron y se incluyeron en parafina. Se hicieron cortes de tejido en secciones de 3-5 µm en micrótopo tipo Minot Leica®, los

cuales se tiñeron con hematoxilina-eosina y se observaron en un microscopio de campo claro utilizando objetivos de diversos aumentos.

El tratamiento de deshidratación e inclusión en parafina extrae gran parte de los lípidos del tejido, razón por la cual para estudiar gotas lipídicas *in situ* se realizaron cortes de tejido testicular en criostato. Para ello, luego de la fijación, los órganos se cortaron en discos de pequeño espesor, los cuales se sumergieron en una solución de sacarosa al 30% en PBS hasta que se hundieron (alrededor de 8 horas). Seguidamente se montaron en moldes plásticos Cryoplast<sup>®</sup> de 1.5 x 1.5 cm conteniendo medio de inclusión para cortes en criostato. Los bloques así formados se congelaron en nitrógeno líquido y se conservaron a -80°C hasta que fueron cortados. Los cortes se realizaron en un Crióstato IEC<sup>®</sup> y fueron adheridos a portaobjetos previamente silanizados.

### **Microscopia de fluorescencia**

Los preparados se observaron en un microscopio Nikon equipado con cámara digital, luego de utilizar distintos fluoróforos. El Hoechst 33342 se empleó para poner en evidencia los núcleos celulares y su morfología en las distintas preparaciones de tejidos o células. El bromuro de etidio y el yoduro de propidio se emplearon para determinar la viabilidad celular. Para detectar gotas lipídicas, tanto durante el desarrollo normal como asociadas a los episodios de hipertermia, se empleó Rojo Nilo, aprovechando su capacidad de emitir a 510 nm una fluorescencia amarilla brillante e intensa cuando se encuentra en un ambiente altamente hidrofóbico, como el que se genera en las gotas lipídicas repletas de lípidos neutros.

### **Expresión (ARNm) de alquil-glicerona fosfato sintasa (AGPS)**

A partir de testículos, epidídimos y regiones epididimales de animales que habían sido expuestos a los episodios de hipertermia y de sus correspondientes controles, se realizó la extracción de ARN mediante el método que utiliza el reactivo TRIzol (Invitrogen). El ARN se resuspendió en agua libre de ARNasas, se cuantificó mediante la relación de las absorbancias a 260/280 en un espectrofotómetro PicoDROP, y las muestras se almacenaron a -80 °C hasta su estudio.

Se tomaron alícuotas de 2 µg de ARN total para sintetizar ADN complementario (ADNc) en reacciones conteniendo 2.5 mM de *random primers*, 1X M-MLV-Buffer, 2 UI de inhibidor de ARNasas (RNAsin, Promega), 0.5 mM de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP and dTTP) y 200 U de la retrotranscriptasa M-MLV (Promega) en un volumen final de 25 microlitros.

El ADNc específico del gen de la AGPS resultante de la reacción de retrotranscripción fue amplificado y cuantificado mediante PCR en tiempo real (RT-qPCR). Se diseñaron y analizaron primers específicos para AGPS mediante el uso del software Primer 3 y se enviaron a sintetizar a Invitrogen. Las secuencias de los primers utilizados fueron:

- 5'-CCGAGTACCAATGAGTGCAA-3' / 5'-CCATCCATTCCATTTTCATAAGTT-3' para la enzima AGPS y
- 5'-AAGGCCAACCGTGAAAAGAT-3' / 5'-ACCAGAGGCATACAGGGACA-3' para la actina, cuyo ARN fue utilizado como referencia para la cuantificación.

La RT-qPCR se realizó en un equipo Rotor Gene 600 (Corbett Life Science). El volumen final por reacción fue de 10 µL de un medio compuesto por KAPA SYBR® FAST qPCR Master Mix (Kapa Biosystems), 0.25 mM de cada primer y el ADNc. La eficiencia de cada par de primers fue calculada mediante la fórmula  $E = 10^{-(1/\text{pendiente})}$ , con motivos comparativos y de normalización. Las condiciones de la RT-qPCR fueron 40 ciclos de desnaturalización a 95°C por 15 segundos, apareamiento a 58°C por 20 segundos, y síntesis a 72°C por 30 segundos.

## **Estudios en células y gametas**

### **Células espermatogénicas**

Las células de la línea germinal estudiadas fueron los espermatoцитos en paquitenio (EP) y las espermátidas redondas (ER). También se obtuvieron de las mismas preparaciones los cuerpos residuales (CR). Para obtener los EP y ER, los túbulos seminíferos provenientes de 4 testículos de ratas adultas por muestra se incubaron en 20 mL de medio Krebs-Henseleit (KH) conteniendo tripsina 0.4 mg/mL (T-7409) por 2 minutos en un baño termoregulado a 33 °C, con agitación a 70-80 ciclos por minuto, bajo atmósfera de 95% O<sub>2</sub> - 5% CO<sub>2</sub>. Los túbulos se disgregaron mecánicamente con pipeta Pasteur plástica, evitando la formación de burbujas. El homogenado así obtenido se filtró a través de mallas de nylon de 250 y 70 micrones, y se lavó con medio KH tres veces, centrifugando cada vez durante 3 minutos a 1200 rpm (225 g) para obtener un pellet que contenía las células intratubulares.

Para separar los distintos tipos celulares se utilizó el procedimiento STA-PUT (Romrell *et al.* 1976). El pellet conteniendo las células se resuspendió en 10 mL de medio, se cargó en un gradiente de 350 mL de BSA fracción V (A-7906) al 2-4 % en medio KHS, y se dejó sedimentar por 3 horas a gravedad unitaria y a temperatura ambiente. Pasado el tiempo de sedimentación se colectaron 100 fracciones de 3 mL

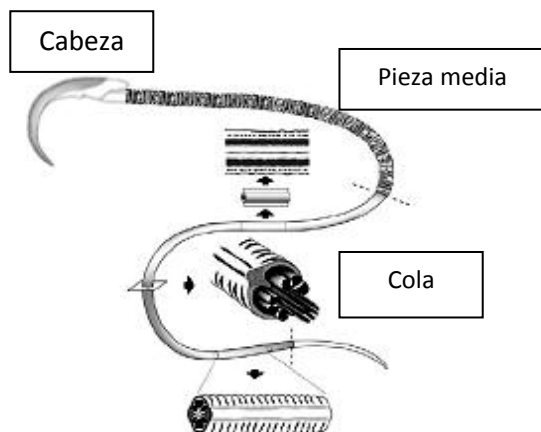
cada una, a una velocidad de 3 mL/minuto en un colector de fracciones Gilson FC 203B®.

Utilizando como criterio el tamaño celular y la observación por microscopía de transmisión, se seleccionaron aquellas fracciones enriquecidas en espermatozoides en paquitenio (EP) y en espermátidas redondas (ER). Como es usual frecuentemente, los primeros se encontraron en las fracciones 5-25 y las segundas entre las fracciones 50-70. En las fracciones 80-95 se obtuvieron los cuerpos residuales (CR). Las fracciones elegidas se agruparon y se lavaron con medio KHs.

La pureza de las fracciones y la integridad de las células aisladas se evaluaron mediante microscopía de fluorescencia luego de la tinción de los núcleos con Hoescht 33342 (Reyes *et al.* 1997). Para expresar los resultados de concentración de lípidos por célula, la cantidad de éstas por fracción se determinó utilizando una cámara Neubauer.

### **Aislamiento de espermatozoides**

El espermatozoide de rata presenta características que lo diferencian del de otros mamíferos. Tiene una cabeza muy pequeña con forma falciforme o de gancho, la pieza media, y una larga cola. Estas dos últimas porciones, juntas, representan el 90% de la longitud total del espermatozoide de rata (**Fig. 2**).



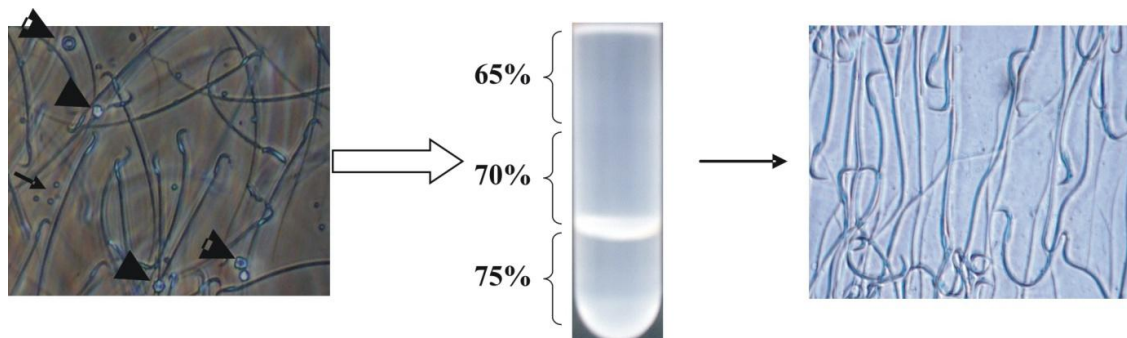
**Fig 2.** Características de un espermatozoide de rata. Esquema, adaptado de Knobil and Neill (2006) donde se destacan la particular forma de gancho de la cabeza y la gran longitud y volumen de la cola espermática.

Para obtener estas gametas, se aisló la región caudal de los epidídimos de varias ratas adultas, en las cuales se realizaron 2 o 3 cortes transversales con bisturí cuidando de no desgarrar el tejido. Para facilitar la liberación de espermatozoides, estas piezas de tejido se incubaron en buffer fosfato salino (PBS) durante 15 minutos a

34°C con suave agitación, bajo atmósfera de 95% O<sub>2</sub> - 5% CO<sub>2</sub>. Luego de estas incubaciones, se obtuvo el medio sobrenadante conteniendo los espermatozoides y se descartaron los restos de tejido. Como se describe más adelante, se prepararon controles en cuyo medio de aislamiento se había agregado una concentración de 2.5 mM del quelante de iones bivalentes EDTA con el fin de impedir o limitar las reacciones de hidrólisis de lípidos dependientes de dichos iones.

### **Separación de cabezas y colas espermáticas**

Para conocer los lípidos de cabezas y colas de espermatozoides, éstas se purificaron previamente, a fin de liberar a las preparaciones de las pequeñas cantidades de otras células y partículas con membranas que frecuentemente están presentes en los preparados que se obtienen del epidídimo. Según pudimos observar, entre éstas suele haber ocasionales eritrocitos y células epiteliales epididimarias, que no se logran eliminar completamente con los filtrados a través de mallas de nylon. Los espermatozoides se obtuvieron como se explica más arriba en presencia de EDTA, y se procedió al lavado de los mismos mediante dos resuspensiones sucesivas en PBS y centrifugaciones a 1500 rpm por 15 minutos. El pellet conteniendo espermatozoides se resuspendió cuidadosamente en sacarosa al 65%, la cual fue cargada en el tope de un gradiente 65-70-75% de sacarosa para proceder a la purificación de los espermatozoides (**Fig. 3**). Los tubos conteniendo este gradiente se colocaron en una ultracentrífuga Beckman® y se centrifugaron a 104.000 x g durante una hora utilizando un rotor SW28.

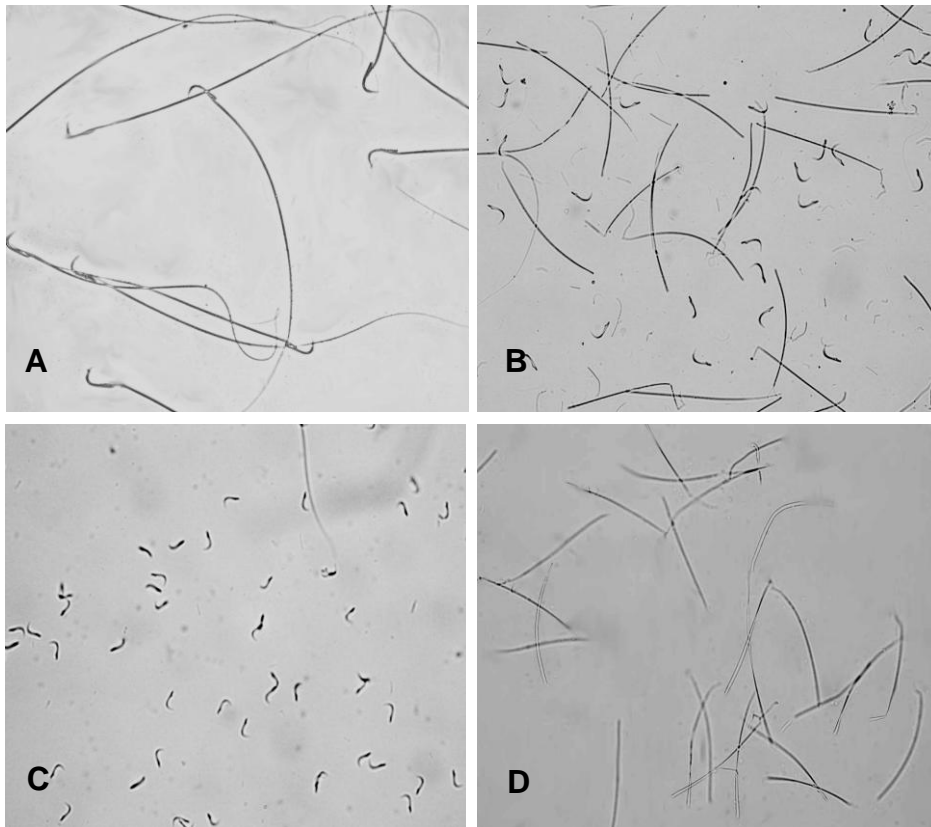


**Fig. 3.** Espermatozoides de rata antes y después de la purificación en gradientes de sacarosa. Las cabezas de flechas señalan eritrocitos y las flechas apuntan a células provenientes del epidídimo.

Para separar las cabezas de las colas se aplicó el protocolo descrito por Gitlits *et al.* (2000). Las gametas, preparadas y purificadas como se acaba de describir, se resuspendieron en buffer fosfato (PBS) conteniendo 1 mM de fenilmetilsulfonilfluoruro



(PMSF) y se sometieron a sonicación (en hielo, 6 veces, durante 15 segundos cada vez), con intervalos de 30 segundos, en un sonicador Branson modelo 250. La suspensión resultante de cabezas y colas se sedimentó a 600g a 4°C. El pellet se resuspendió en una solución de sacarosa al 65% y se cargó en el tope de un gradiente de dos capas: 70% y 75% de sacarosa (p/v) preparados en PBS-PMSF.



**Fig. 4:** Fotomicrografías de espermatozoides de rata y sus partes. A, espermatozoides enteros, aislados de la región caudal del epidídimo; B, homogenado conteniendo cabezas y colas de espermatozoides separadas, luego de la sonicación; C, fracción de cabezas y D, fracción de colas, luego de su purificación.

Los tubos conteniendo los gradientes se centrifugaron a 104.000g a 4°C por 60 minutos. La fracción conteniendo las cabezas de los espermatozoides se colectó como un pequeño pellet, mientras que la correspondiente a las colas, que permanecen unidas a la pieza media, se colectó en la interfase 65-70% de sacarosa. Esta fracción se colectó y se re-centrifugó a 104.000g, a 4°C durante 60 minutos en un gradiente de sacarosa 65-75% para su mayor purificación. La pureza de las fracciones se evaluó mediante microscopia (**Fig. 4**)

### Efectos del aislamiento y de las incubaciones sobre los lípidos espermáticos

Los espermatozoides fueron aislados como se detalló más arriba, de la región caudal de los epidídimos de varias ratas, realizando cortes transversales con bisturí e incubaciones de 15 min en PBS a 34 °C, con suave agitación, bajo atmosfera de 95% O<sub>2</sub>- 5% CO<sub>2</sub>. Para determinar el efecto del aislamiento sobre los lípidos se preparó una muestra control (que denominaremos C1) en el cual el aislamiento y el lavado se hicieron en PBS conteniendo 2.5 mM EDTA, para *evitar* en lo posible cualquier hidrólisis “espontánea” de los lípidos. El resto de los espermatozoides se obtuvo y se trató del mismo modo, aunque en *ausencia* de EDTA, y utilizando el medio Biggers-Whitten - Whittingham (BWW) suplementado con glucosa (5.5 mM), piruvato (0.3 mM) y lactato (21 mM) (BMW-gpl). Combinamos cada vez varias preparaciones similares de distintas ratas con el objetivo de obtener una muestra común grande, que luego se dividiría en muestras no incubadas (controles que denominaremos C2 para compararlos con los C1) y muestras incubadas en tres condiciones: 1) sin otros agregados (controles incubados, que denominaremos C3), 2) con el agregado de concentraciones de apropiadas de suplementos para inducir la capacitación (Cap), y 3) con el agregado de un ionóforo de calcio para inducir la reacción acrosomal (RA)

Para limitar en lo posible el estrés físico de los pipeteos y centrifugaciones que afectan la motilidad de los espermatozoides (Varisli *et al.* 2009), se procedió a obtener *por dilución*, a partir de las suspensiones en medio BWW-gpl, las muestras a incubar. Una vez separada la alícuota que contenía los controles (C2) no incubados en medio BMW-gpl, las suspensiones con las gametas en ese medio se ajustaron a una concentración de 10 x 10<sup>6</sup> células/ ml agregando más del mismo, y el volumen total se dividió en tres fracciones iguales. Luego, cada una ellas fue diluida hasta lograr 5 x10<sup>6</sup> células/ ml simplemente agregando el mismo volumen de medio BWW, ahora con tres *contenidos* distintos. La primera, se diluyó con el medio BWW-gpl sin ningún agregado, y se incubó durante 5.5 horas (control incubado que denominaremos C3). Las otras dos, se diluyeron con el mismo medio conteniendo 25 mM NaHCO<sub>3</sub> 1.7 mM CaCl<sub>2</sub>, y 0.4% albúmina libre de ácidos grasos, y se incubaron durante 5 horas para lograr su capacitación (Cap). Al cumplirse este tiempo, a una de estas muestras Cap se le agregó el ionóforo A23197 (10 µM) para inducir la reacción acrosomal (RA), a la otra se le agregó el vehículo, y ambas se incubaron durante 30 minutos más.

En resumen, contamos con dos controles no incubados, C1 obtenido en presencia de EDTA y C2 obtenido en medio BMW-gpl, y tres muestras incubadas en este mismo medio en 3 condiciones: C3, Cap y AR.

Antes de realizar la extracción de los lípidos, de las suspensiones de espermatozoides en las 5 condiciones se tomaron alícuotas para determinar el número de espermatozoides, que se hizo utilizando una cámara de Neubauer, y realizar comprobaciones importantes y necesarias, entre ellos la viabilidad celular, que se hizo mediante la cuantificación del número de espermatozoides cuyos núcleos se teñían con yoduro de propidio (PI), el grado de fosforilación en residuos tirosina de proteínas espermáticas, que se utilizó como criterio para corroborar que los espermatozoides habían alcanzado el estado de capacitación (Visconti *et al.* 1995), y el grado de reacción acrosomal alcanzado en cada condición, que se evaluó mediante la coloración con azul brillante del Coomassie G-250 (Larson & Miller 1999) con algunas modificaciones (Bendahmane *et al.* 2002). Estos controles no fueron realizados por mí sino por otros miembros del grupo con quienes colaboramos en esta parte del proyecto.

## **2. SEPARACIÓN Y ANÁLISIS DE LOS LÍPIDOS**

### **Extracción de lípidos**

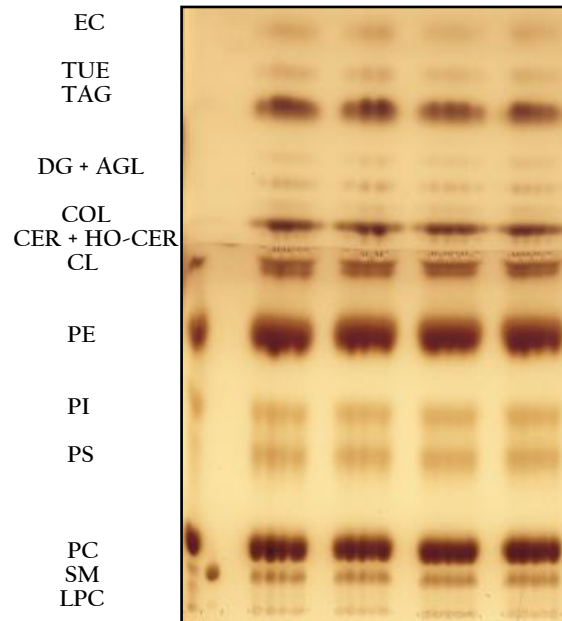
Para la extracción de los lípidos desde células y tejidos se utilizaron mezclas de cloroformo y metanol, siguiendo el procedimiento de Bligh & Dyer (1959). Los tejidos, células o fracciones se homogeneizaron en los solventes utilizando un recipiente de vidrio y un pistón de Teflón<sup>®</sup> accionado con un motor eléctrico. A los extractos, en cloroformo: metanol 1:2, se les agregó un volumen de cloroformo y dos de agua. Los tubos se agitaron en vortex y se centrifugaron para separar las fases. Luego de descartar la capa metanólica-acuosa superior, se recuperó la capa clorofórmica inferior conteniendo los lípidos. La capa proteica intermedia se lavó dos veces con cloroformo: metanol, lavados que se combinaron con el extracto clorofórmico para asegurar una buena recuperación de los lípidos.

Los extractos se llevaron a sequedad bajo nitrógeno, se resuspendieron en volúmenes conocidos de cloroformo:metanol, y se tomaron alícuotas para la determinación de fósforo lipídico total, que se realizó mediante el procedimiento de Rouser *et al.* (1970). En algunos casos también se tomaron alícuotas para la determinación de ácidos grasos totales en los extractos lipídicos.

### **Procedimientos preparativos y analíticos**

Para el sondeo inicial de muestras desconocidas, para estudios comparativos entre muestras y para análisis de composición de fosfolípidos se empleó cromatografía

en capa fina (TLC) sobre placas cromatográficas de alta performance (HPTLC), de 20 x 10 cm (Merck), utilizando un solvente polar para separar fosfolípidos (p. ej., cloroformo:metanol: ácido acético: agua (50:37,5:3,5:2, en vol.) o mezclas de hexano y éter (p. ej., hexano: éter, 80:20) para separar lípidos neutros. Esta combinación de solventes permite separar la mayor parte de las clases lipídicas presentes en extractos conteniendo lípidos testiculares de rata (**Fig. 5**).



**Fig. 5.** Separación de fosfolípidos y lípidos neutros a partir de extractos de lípidos testiculares de rata. Se sembró la misma cantidad (10 µg) de fósforo lipídico por cada muestra. Se corrió hasta aproximadamente el 60% de la placa el solvente que separó los fosfolípidos, se secó, y se corrió hasta el tope de la placa el solvente que separó los lípidos neutros. Las manchas se revelaron por exposición a vapores de yodo.

Para determinar la composición en fosfolípidos de las muestras, una vez separadas las distintas clases, las zonas de sílica gel conteniendo cada una se transfirieron a tubos de vidrio, se digirió la materia orgánica con ácido perclórico, y se cuantificó el contenido de fósforo como fosfato inorgánico (Rouser *et al.* 1970).

Para la separación preparativa de los distintos lípidos para otros estudios, como la composición en subclases o en ácidos grasos, se utilizó cromatografía en capa fina en placas de 20 x 20 cm hechas en el laboratorio, de unos 500 µm de espesor. En general, se utilizó sílica gel G y el desarrollo en una dimensión para separar los lípidos neutros por una parte, y sílica gel H y el desarrollo en dos dimensiones con solventes

más polares para separar fosfolípidos por otra. La mayor parte de los procedimientos de siembra y secado de solventes se realizó bajo atmósfera de nitrógeno.

Para localizar los lípidos una vez separados sobre las placas cromatográficas preparativas, éstas se rociaron con diclorofluoresceína al 0.1% en metanol, seguido de exposición de las mismas a vapores de amoníaco, rociado con agua, e inspección bajo una lámpara ultravioleta. Las zonas conteniendo la sílica gel con las clases lipídicas se rasparon cuidadosamente y se transfirieron a tubos de vidrio a los cuales se agregaron mezclas de solventes conteniendo agua (cloroformo: metanol: agua, 5:5:1, en vol.). Se agitó en un vortex y se centrifugó para decantar la sílica y recuperar los lípidos en el solvente, el cual se transfirió a nuevos tubos. Se lavó dos veces el residuo sólido de sílica resuspendiendo en el mismo solvente y centrifugando. Por último, se particionó el extracto agregando cuatro volúmenes de agua, para particionar los solventes y recuperar los lípidos en la fase clorofórmica.

### **Separación de clases de fosfolípidos**

Alícuotas de las soluciones o extractos conteniendo los fosfolípidos (PL) se sembraron sobre un ángulo de placas de sílica gel H (20 x 20 cm) y se desarrollaron utilizando TLC en dos dimensiones (Rouser *et al.* 1970). Este método se utilizó ventajosamente para separar los GPL de colina y de etanolamina (CGP, EGP).

### **Separación de subclases de glicerofosfolípidos de colina y etanolamina**

Para separar los GPL con una unión alquenoilo (plasmalógenos) de CGP y EGP, se tomó ventaja de la labilidad al ácido de la unión vinil-éter que éstos presentan. Se trató a la clase lipídica total (CGP o EGP), previamente eluida desde la sílica gel y seca, con 1 volumen de 0.5 N HCl en acetonitrilo, agitando suavemente los tubos por 1 minuto a temperatura ambiente. Luego se neutralizó con 1 volumen de NaHCO<sub>3</sub> 1.2 N y se agregó 1 volumen de cloroformo para particionar los solventes y recuperar el lípido en la fase clorofórmica por centrifugación. Dicha fase se separó, se llevó a sequedad bajo nitrógeno, y se sembró inmediatamente en placas de TLC que se desarrollaron con cloroformo : metanol : agua (65:25:4 en vol. %). De esta manera las subclases plasménil de ambos GPL se recuperaron en forma de liso-fosfolípidos, mientras que la pequeña subclase plasmanil se recuperó junto a la gran subclase fosfatidil, esto es PC y PE, la principal en ambos casos.

Para separar a estas últimas, una vez eluidas de la sílica se las sometió a un tratamiento alcalino, consistente en la exposición del lípido seco durante 10 minutos a una solución de NaOH 0.5 N en metanol a 50 °C. Este tratamiento generó metil-ésteres de AG de las subclases plasmanil y fosfatidil, dejando como producto un alquil-

liso-fósfolípido a partir de las primeras, el cual fue separado por TLC para su posterior dosaje de fósforo.

Dado que el procedimiento descrito, basado en el contenido de fósforo, implica que para cuantificar la subclase plasmanil ésta debe perder sus ácidos grasos, para conocer dichos componentes se empleó una forma alternativa de aislar las tres subclases de CGP y de EGP. Se utilizó la fosfolipasa C de *Bacillus cereus*, que hidrolizó el fosfato unido a los GPL dando diglicéridos. Estos se convirtieron luego en acetildiglicéridos, esto es, especies de triglicéridos en los cuales la posición *sn*-3 del glicerol está esterificada por un grupo acetilo.

Partiendo de la base de que una unidad enzimática liberaba 1,0 mmol de fósforo soluble agua a partir de la PC por minuto a pH 7.3 y a 37 °C, el ensayo se realizó a temperatura ambiente durante la noche, con lo cual se logró que la enzima, con mínimas concentraciones, digiriera importante cantidad de lípido. El buffer utilizado fue 50 mM Tris HCl, pH 7.3, en presencia de 3 mM de CaCl<sub>2</sub>.

A los CGP y EGP aislados y secos, se les agregó la enzima contenida en el buffer mencionado además de una capa de éter etílico donde se fueron recogiendo los diglicéridos (diradil-gliceroles) generados. Esta fase, así como un lavado con éter realizado a la fase inferior, se combinaron y se llevaron a sequedad. Sobre los diglicéridos secos, se agregó una mezcla de anhídrido acético: piridina (2:1, v/v), y se esperó unos 10 minutos bajo nitrógeno seco para que se acetilase su grupo hidroxilo libre. Los acetil-diglicéridos resultantes se disolvieron en cloroformo y se separaron en placas de sílica gel G, utilizando hexano:éter (80:20, v/v). Esto permitió separar dos bandas de acetil-diglicéridos: la inferior (más grande) contenía los derivados acetilados de los 1,2-diacil-*sn*-gliceroles (DAG provenientes de PC y de PE), y la superior los derivados acetilados de los diglicéridos que a su vez provenían de los GPL con una unión éter (GPL-UE ), esto es, de las subclases plasmanil- y plasmenil-, respectivamente, de -colina y de -etanolamina.

Luego de una TLC con hexano:éter 80:20, la banda inferior mayor, correspondiente a los acetil-diacilgliceroles se analizó sin tratamiento ulterior, mientras la que contenía los acetil-diglicéridos con una unión éter (1-alkuil- y 1-alkenil) se aisló y se sometió a un tratamiento rápido con ácido igual al recién descrito para los plasmalógenos, a fin de romper la unión vinil-éter de la última.

Después del tratamiento ácido, la TLC consistió en una primera corrida con hexano:éter (40:60 v/v) hasta la mitad de las placas, secando este solvente, y una segunda con hexano:éter 95:5 (v/v) hasta el frente de las mismas. Esto permitió

obtener por separado 1) un acetildiglicérido intacto, que contenía un grupo alquilo en *sn-1*, y 2) un diglicérido (proveniente del acetildiglicérido que había perdido su aldehído graso de *sn-1*).

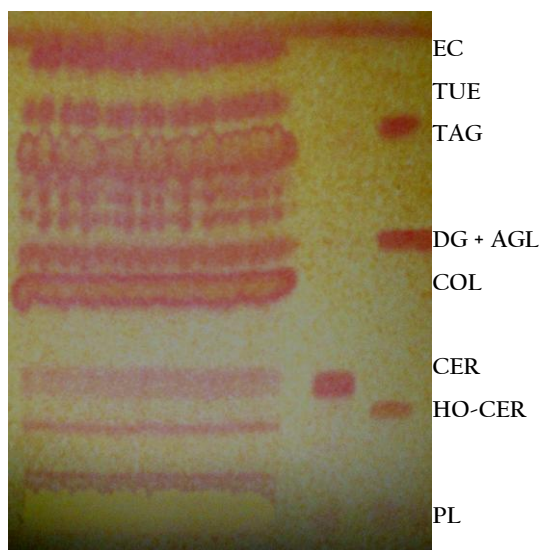
Una vez separadas como glicéridos neutros, las seis subclases (tres de CGP y tres de EGP), se eluyeron de las placas, y se convirtieron en metil-ésteres para cuantificarlas y conocer la composición de sus ácidos grasos. La cuantificación realizada por este procedimiento no difirió significativamente en sus porcentajes de la previamente realizada por medición de fósforo.

### Separación de lípidos neutros

Una porción importante de los extractos lipídicos de los tejidos y células se destinó a la separación preparativa de lípidos neutros para su estudio, triacilgliceroles (TAG), triglicéridos con una unión éter (TUE) y ésteres de colesterol (EC). Para ello se utilizaron placas de sílica gel G y mezclas de hexano y éter, en la mayor parte de los casos en proporción 80:20 (v/v). En el caso de los lípidos testiculares, esta mezcla de solvente se utilizó en combinación con otras mezclas para separar otras clases de lípidos neutros en adición a las tres mencionadas, entre ellas colesterol libre, ácidos grasos libres y ceramidas, como se ilustra en la **Fig. 6**. En este caso se utilizó cloroformo:metanol: ácido acético: agua (95:4,5:0,5 en vol) o bien hexano:éter:acetona: ácido acético (30:40:20:1 en vol) hasta aproximadamente la mitad de las placas, seguido de secado y de una nueva corrida con hexano:éter 80:20 (v/v) hasta el frente de las mismas. Debido a su abundancia, los lípidos polares (mayoritariamente fosfolípidos, PL) al emplear este tipo de solventes quedan localizados en el lugar de siembra, pudiendo recuperarse como se explicó antes para estudios ulteriores.

### Subclases de triglicéridos

Los triacilgliceroles (TAG) tendieron a separarse directamente de los triglicéridos con una unión éter (TUE) utilizando hexano:éter 80:20 v/v (**Fig. 6**). Para separar a partir de estos últimos a los triglicéridos con una unión *alquilo* (1-alquil-2,3-diacil-*sn*-gliceroles) de los triglicéridos con una unión *alquenilo* (1-alquenil-2,3 diacil-*sn*-gliceroles) (alquil-DAG y alquenil-DAG, respectivamente) nuevamente se tomó ventaja de la labilidad al ácido de la unión alquenilo de estos últimos.



**Fig. 6.** Cromatografía en capa fina preparativa de los lípidos neutros provenientes de una muestra de testículo de rata. Se sembró una cantidad equivalente a 500  $\mu\text{g}$  de fósforo lipídico y se corrieron dos sistemas de solventes en forma sucesiva. El primero, corrido hasta la mitad de la placa, permitió separar las ceramidas (Cer) claramente de los fosfolípidos, y el segundo, hexano:éter: ácido acético (80:20:2, en vol.), hasta el frente de las placas, permite ver separados a los TAG, TUE y EC testiculares. Las bandas con los lípidos se revelaron bajo luz uv luego de rociar la placa con diclorofluoresceína disuelta en metanol.

Los TUE se aislaron de tejido testicular o epididimal y luego se trataron como se describió antes para los plasmalógenos, es decir, se expusieron durante un minuto a 0.5 N HCl en acetonitrilo: cloroformo (1:1), seguido de neutralización con bicarbonato de sodio 2 N, una corta centrifugación, un rápido secado de la fase orgánica e inmediata siembra en capa fina. Luego de afectarse la unión vinil-eter, los alquenil-DAG se convirtieron en DAG y aldehído graso, que se separaron ampliamente de los alquil-DAG no afectados por el ácido. Para aislar a cada uno se utilizaron, en forma sucesiva, 1) hexano: éter (60:40 v/v) hasta la mitad de las placas, secado, y 2) hexano: éter (95:5 v/v) hasta la parte superior de las mismas.

Todos los procedimientos hasta aquí descritos, incluyendo la evaporación de los extractos, la siembra de las muestras sobre las placas, la preparación de los derivados de lípidos, la evaporación de solventes, el secado de las placas para evaporar solventes entre distintas corridas, y el rociado de las placas, así como los pasos de purificación de los metil ésteres de ácidos grasos que se describan a continuación, se realizaron bajo atmósfera de nitrógeno para minimizar la exposición de las muestras al aire.



### **3. ANÁLISIS DE LOS ÁCIDOS GRASOS**

Los ácidos grasos de lípidos totales, fracciones, clases y subclases lipídicas se convirtieron en metil ésteres (ME), los cuales se analizaron por cromatografía en fase gaseosa, previa purificación por capa fina.

#### **Preparación de metil-ésteres de ácidos grasos**

Los lípidos a analizar se transfirieron a tubos con tapa a rosca recubierta de Teflón y se secaron bajo nitrógeno. Al lípido seco se agregó una solución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2.5% en metanol anhidro (Christie, 1982). Se colocó nitrógeno en los tubos, los cuales se cerraron y se dejaron a 45°C durante la noche para efectuar la metanólisis. Los ME así obtenidos se extrajeron mediante una partición, que se realizó agregando, al metanol presente, agua y cloroformo en proporción (1:1:1, en vol.). Luego de agitar y separar las fases, los ME quedaron en la fase clorofórmica.

Antes de su análisis por cromatografía gaseosa, los ME se purificaron en todos los casos sobre placas de sílica gel G preparadas en el laboratorio, secas y previamente lavadas con metanol: éter (75:25, en vol). Es muy importante este paso para evitar la presencia, en las muestras a inyectar en el cromatógrafo, de impurezas provenientes de solventes y de la sílica gel, que interfieren en los análisis de ácidos grasos, sobre todo cuando las muestras son pequeñas.

Los ME se separaron usualmente utilizando hexano: éter (95:5, v/v), y se localizaron bajo luz UV después de rociar con diclorofluoresceína en metanol como se describió antes. Las zonas de sílica conteniendo los ME se rasparon a tubos y los ME se eluyeron por partición luego de agregar agua, metanol y hexano (1: 1:1, en vol.) y agitar, pasando estos al hexano. Habitualmente se hicieron tres de estas extracciones con hexano, que se combinaron, se llevaron a sequedad, y se resuspendieron en volúmenes conocidos para la inyección de alícuotas en el cromatógrafo.

#### **Cromatografía en fase gaseosa**

La identificación de los ácidos grasos por fase gaseosa se hizo comparando los tiempos de retención de los ME con los de estándares conocidos. Para el análisis cuantitativo se utilizó el método del estándar interno, incorporando a las muestras de ME, generalmente antes del paso de metanólisis, cantidades conocidas de metil-heneicosanoato (metil-21:0).

Para el análisis de los ácidos grasos se utilizó un cromatógrafo Varian 3700 provisto de dos columnas de vidrio de 2 m de longitud x 2 mm de diámetro empaquetadas con una fase estacionaria polar, 15% SP2330 OV-275 (Sulpeco),

empleando N<sub>2</sub> como gas portador (a un flujo de 30 ml/min). A la salida de las columnas el instrumento estaba equipado con dos detectores de ionización de llama operados en el modo dual-diferencial desde el electrómetro. Las temperaturas del inyector y del detector fueron 220°C y 230°C respectivamente. El análisis de las muestras luego de las corridas se realizó por integración electrónica (Varian Chromatography Workstation, Version 4.51).

Las separaciones se realizaron programando la temperatura del horno de las columnas. El gradiente utilizado en la mayor parte de los casos consistió en incrementos lineales de 5°C por minuto, programado desde una temperatura inicial de 150 °C a una temperatura final de 230°C. Una vez alcanzada esta última, se la mantuvo constante el tiempo necesario para permitir la salida de los ácidos grasos de muy larga cadena, en algunos casos de hasta 30 minutos.

#### **4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

En la mayor parte de las figuras y tablas de esta tesis los datos representan valores promedios  $\pm$  desviación estándar de al menos tres muestras, provenientes de animales distintos. La significancia estadística de las diferencias que presentaron las muestras experimentales con respecto a los correspondientes controles se determinó mediante el test de Student a dos colas. Dichas diferencias son señaladas en las figuras con un asterisco (\*). Mientras que aquellos experimentos cuyas muestras requirieron comparaciones múltiples fueron analizados mediante el análisis de Varianza (ANOVA) de una vía seguido del test de Bonferroni. En este último caso las diferencias significativas se muestran en las figuras mediante el uso de diferentes letras. En ambos casos se consideraron significativas las diferencias con respecto a los correspondientes controles cuando los valores del parámetro p fueron menores o iguales a 0.05.

***RESULTADOS***

***CAPÍTULO I***

En el presente capítulo se estudiaron las principales clases y subclases de glicerofosfolípidos y de lípidos neutros testiculares y sus posibles cambios en situaciones fisiológicas normales, como lo son el desarrollo postnatal y la diferenciación celular durante la espermatogénesis, y en una condición fisiopatológica, como lo es la lesión seguida de pérdida y ulterior recuperación de las células espermatogénicas a consecuencia de exposiciones intermitentes in vivo a la hipertermia moderada.

## 1. CAMBIOS DURANTE EL DESARROLLO

### 1.1. Aspectos micro y macroscópicos

De acuerdo con los datos de la bibliografía sobre la primera onda de espermatogénesis en el testículo postnatal en la rata, que resumimos en la Introducción, se eligieron los siguientes días postnatales, teniendo en cuenta la abundancia relativa de los distintos tipos celulares. A los 14 días de vida postnatal (P14) el epitelio germinal sólo contiene células de Sertoli y espermatogonias tipo A (células diploides). Al día 21 (P21), además de éstas, se encuentra el máximo porcentaje de espermátidas (células tetraploides) que se alcanza durante el desarrollo (aproximadamente proporciones iguales con las diploides). Al día 30 postnatal, han aparecido espermátidas, y el número de células diploides, tetraploides y haploides es de aproximadamente de un tercio cada una. El día 45 se eligió porque alrededor de esa fecha está reportado que en la rata se completa la primera ronda de espermatogénesis, y el día 55 porque a partir de este momento están presentes en los túbulos todas las poblaciones celulares de la línea germinal, desde espermatogonias hasta espermatozoides. Ratas de cuatro meses de edad (día P120) se utilizaron como controles adultos, donde predominan las espermátidas en diferenciación y espermatozoides.

En nuestros animales, la histología corroboró lo esperado en las fases elegidas del desarrollo postnatal (**Fig. 1**). El diámetro de los túbulos seminíferos aumentó varias veces con el desarrollo, con la concomitante disminución en la proporción del espacio ocupado por el intersticio (Fig.1). Al día 14 postnatal, la luz de los túbulos aún no estaba abierta, proceso que había comenzado el día 21. En este último, se observaron claramente en los túbulos dos capas de células cerca de las membranas basales, lo que puede interpretarse como una de ellas correspondiente a espermatogonias y la otra correspondiente a espermátidas primarias. En P30, el número de capas celulares aumentó, de las cuales las células más alejadas de la membrana basal deben corresponder a espermátidas tempranas y redondas. En P45 se observaron en

muchos túbulos espermáticas en diversos pasos de la espermiogénesis anteriores a la elongación y en P55 espermáticas elongadas. Finalmente, en P120, se observaron abundantes porcentajes de espermáticas elongadas, así como espermatozoides con sus largas colas apuntando hacia la luz de los túbulos.

Como podía esperarse, el peso por testículo aumentó significativamente con cada etapa del desarrollo postnatal con respecto a la etapa anterior (**Fig. 2**), con escasa diferencia sólo en el período de 6 días entre P37 y P45. Esto puede adjudicarse a que en ese lapso se estaban produciendo los distintos pasos de la primera ronda de espermiogénesis, laborioso proceso que en la rata toma aproximadamente una semana, lo que no implica aumento del número de células sino remodelación de las espermáticas.

## 1.2. Fosfolípidos

El aumento de peso del tejido se reflejó casi en paralelo en el aumento del contenido de fósforo lipídico por testículo (Fig. 2), incluyendo la menor pendiente de aumento en el período P37-P45. Tanto el peso como el fósforo lipídico aumentaron hasta P45, en que se completó el primer ciclo de espermatogénesis, y notoriamente 10 días después (P55), llegando a su máximo valor en el adulto.

Al expresar la cantidad de fósforo lipídico por gramo de tejido, la *concentración* de fosfolípidos fue comparativamente más alta que la del adulto al día 14. Por otra parte, dicha concentración se incrementó notablemente alrededor de P21, tanto con respecto a la etapa anterior (P14) como a la subsiguiente (P30). El pico del día 21 puede adjudicarse a que alrededor del día 20-22 había aumentado el número de células con respecto al día 14 (Fig. 1) por la proliferación de espermatogonias que se habían diferenciado a espermatocitos primarios. Durante la larga profase de la meiosis, estos despliegan una notable actividad biosintética. No sólo deben duplicar la cantidad de ADN, sino también sintetizar los componentes celulares que formarán parte de las primeras espermáticas tempranas que se formarán a partir de ellos al concluir la meiosis II, lo que debe incluir a los fosfolípidos de las membranas plasmáticas y las organelas intracelulares.

La **Fig. 3** describe los cambios cuantitativos que sufrió cada una de las tres subclases de glicerofosfolípidos de colina (CGP) y de etanolamina (EGP) de interés en este estudio con el desarrollo postnatal. Todas ellas aumentaron su contenido por testículo durante la maduración testicular, siendo las subclases fosfatidilcolina (PC) y fosfatidiletanolamina (PE) las mayoritarias en todas las etapas del desarrollo. En el caso de los CGP, desde el estadio prepúber (14 días) hasta el adulto, la PC predominó

ampliamente sobre los dos CGP con uniones éteres, plasmenilcolina y plasmanilcolina. En cambio, en el caso de los EGP, la PE fue seguida en importancia por abundante plasmeniletanolamina, y ésta en tercer lugar por la plasmaniletanolamina.

Al expresar la evolución del contenido de cada subclase por gramo de tejido (**Fig. 3**), se observó un aumento notorio de la *concentración* de las tres subclases de CGP y EGP, que, como el fósforo total, presentaron un máximo alrededor del día 21. Enfocándonos en los GPL con uniones éteres, las concentraciones de plasmaniletanolamina, y su producto plasmeniletanolamina también aumentaron notablemente ese día, lo que sugiere que los espermatozoides en paquitenio ya tienen la capacidad de sintetizar este plasmalógeno. En comparación, la proporción de plasmanilcolina fue algo menor que la de plasmaniletanolamina, pero mayor que la de plasmenilcolina. Esta última, aún siendo minoritaria, tendió a aumentar en estadios posteriores del desarrollo.

Al integrar las tres subclases de CGP y de EGP con el resto de los fosfolípidos para comparar en perspectiva el efecto del desarrollo sobre la composición de fosfolípidos, las diferencias en sus porcentajes entre los distintos tiempos fueron escasas, como puede concluirse al comparar los dos extremos estudiados, P14 y P120 (**Fig. 4**). PC y PE predominaron en ambas edades, variando la primera entre el 46% y el 43% y la segunda entre un 20% y un 19% del total de los PL. Entre ambos extremos del desarrollo la plasmeniletanolamina fue el tercer fosfolípido en abundancia, disminuyendo sólo entre un 10 y un 8% de los PL entre el período prepúber y el adulto. Este plasmalógeno superó por lo tanto en cantidad a la PS, al PI, y a la CL, que representaron el 6%, el 4.5% y el 3% de los PL respectivamente. La plasmaniletanolamina, la plasmanilcolina y la plasmenilcolina, aún en el adulto, no superaron este último porcentaje.

Si bien los cambios en la composición (%) de GPL con una unión éter asociados al desarrollo fueron pequeños, se produjo un incremento gradual, que entre ambos extremos del mismo fue significativo en el porcentaje de plasmanilcolina y plasmaniletanolamina. Por otra parte, nos pareció interesante que al enriquecerse el testículo en células germinales disminuyera la proporción de plasmeniletanolamina y aumentara la de plasmenilcolina (**Fig. 4**), porque estaría de acuerdo con que la primera es precursora de la segunda (**Fig. 7** de la Introducción).

### 1.3. Lípidos neutros

Como los fosfolípidos, los TAG, TUE y EC testiculares mostraron progresivos y sostenidos aumentos en sus contenidos por testículo con el desarrollo (**Fig. 5**, panel izquierdo). Este incremento alcanzó su valor máximo con la madurez sexual, permaneciendo los tres en niveles más o menos constantes en promedio durante el resto de la vida adulta. Al expresar la concentración de estos lípidos neutros sobre la base de una cantidad fija de fósforo lipídico (**Fig. 5**, panel central), resultó claro que los tres lípidos neutros tendieron a incrementarse igual o por encima del aumento que sufrieron los fosfolípidos con el desarrollo.

En el caso de los **TAG**, que en todas las etapas en estudio fueron los lípidos neutros mayoritarios; su concentración con respecto al fósforo se mantuvo relativamente constante durante las primeras dos semanas, indicando que aumentaron a una misma velocidad que los fosfolípidos hasta el día 21. Dicha concentración sufrió un aumento considerable hacia el día 30, en que los TAG aumentaron, en proporción, más que los fosfolípidos. Este incremento coincidió con la presencia por primera vez de *espermátidas* en el testículo, las cuales en este momento están en proporciones similares a espermatogonias y espermatocitos. Alrededor del día 37, y en adelante a partir de allí, la relación TAG/fosfolípidos se mantuvo constante hasta la adultez y durante toda ella.

Los **TUE** fueron francamente minoritarios en el testículo a los 14 días de vida, pero mostraron un marcado aumento en su concentración con relación al fósforo lipídico al día 21, que en términos relativos fue aún mayor que el de los TAG, y continuaron su incremento hasta P30. Luego de una tendencia a bajar en P37, aumentaron nuevamente en relación a los fosfolípidos en P45 y en P120.

Por su parte, los niveles de **EC** por testículo, como los de TUE, fueron bajos en P14, se incrementaron hasta P37, permanecieron sin cambio entre P37 y P55, y se incrementaron entre este último momento y la adultez. Con respecto a los fosfolípidos, tendieron a aumentar en P30 y en el adulto (**Fig. 5**).

Al expresar los contenidos de los tres lípidos neutros por gramo de tejido, se observó un aumento notorio de la concentración de los tres en P21 (**Fig. 5** panel derecho). El máximo de concentración de TAG se alcanzó al día 30 postnatal, disminuyendo en P37 y estabilizándose a partir de allí. En el caso de los TUE se observaron dos máximos, uno en P21 y el segundo el P45. En el caso de los EC la concentración por gramo a P21 fue la máxima alcanzada durante el desarrollo, tendiendo a aumentar nuevamente hacia la adultez.

Utilizando en criocortes de tejido el marcador fluorescente Rojo Nilo para localizar gotas lipídicas (**Fig. 6**) pudimos observar que ya a partir del día 21 era posible visualizarlas, tanto en las células del intersticio como en las de la parte basal del epitelio presente dentro de los túbulos seminíferos, aún cuando éstos últimos eran pequeños y con su lumen comenzando a abrirse. A partir del día posnatal 45 en adelante, las gotas lipídicas cercanas a la membrana basal tubular aumentaron su tamaño y su número, y además se hizo evidente la presencia de nuevas gotas, más pequeñas pero mucho más numerosas, localizadas en cercanías del aspecto luminal del epitelio seminífero. En conjunto, el hecho de que las gotas lipídicas aumenten en tamaño y número con el avance de la espermatogénesis se correlaciona con el aumento en la cantidad y concentración de lípidos neutros (Fig. 5) observada durante ese proceso.

#### 1.4. Ácidos grasos de GPL

En contraste con la relativa constancia en la composición de fosfolípidos (Fig. 4), en todos los lípidos estudiados, tanto polares (**Fig. 7**) como neutros (**Fig. 8**) hubo importantes cambios en los perfiles de ácidos grasos con el desarrollo testicular. La modificación cuantitativamente más importante y significativa entre P14 y P120 se produjo a nivel de los PUFA de la serie n-6, teniendo en cuenta que su proporción aumentó varias veces en lípidos cuya cantidad también aumentó varias veces.

En P14, el PUFA mayoritario presente en las dos subclases de CGP y de EGP estudiadas fue el araquidónico (20:4n-6); en P30, el 22:5n-6 había aumentado hasta alcanzar proporciones similares a las del 20:4n-6, y en P55 el 22:5n-6 aumentó tanto que alcanzó los niveles del primero en PC y en PE, y lo superó ampliamente en los correspondientes plasmalógenos (Fig. 7). La relación entre los porcentajes de estos dos PUFA se invirtió con la maduración sexual.

Aparte de que las proporciones entre estos dos ácidos grasos reflejaron claramente una relación prácticamente recíproca entre ellos, como corresponde a una relación precursor-producto, llamó nuestra atención el comportamiento de los dos PUFA de 24 carbonos, 24:4n-6 y 24:5n-6. El 24:5 en particular claramente aumentó su proporción a partir de P14, continuando hasta P45 en los CGP y hasta P30 en los EGP, para luego disminuir su porcentaje a partir de dichos máximos.

En P14, el 18:2n-6 estuvo presente en mayor proporción en los CGP que en los EGP, mientras lo contrario ocurrió con el 22:6n-3 (Fig. 7). El primero tendió a mantenerse con pocos cambios durante el desarrollo, mientras el segundo disminuyó



drásticamente con el mismo hasta convertirse en un ácido graso minoritario en el adulto.

### 1.5. Ácidos grasos de los lípidos neutros

También en los lípidos neutros pudo observarse el aumento, si bien mucho más gradual, en el porcentaje de 22:5n-6 con el desarrollo (**Fig. 8**). En ratas de 14 días, las subclases TAG y los TUE de triglicéridos presentaban cantidades mínimas de 20:4n-6 y de 22:5n-6, con el primero ligeramente mayor que el segundo. El 22:5n-6 aumentó mucho su proporción con el desarrollo, en contraste con el primero, que se mantuvo en un 5% o menos del total de ácidos grasos de ambos glicéridos aún en la adultez. Llamativamente, tanto los TAG como los TUE concentraron, además de 22:5n-6, porcentajes comparativamente muy superiores a los presentes en los GPL (**Fig. 7**) de 24:4n-6, 24:5n-6 y otros VLCPUFA (**Fig. 8**).

La detección de especies moleculares con 22:5n-6 y VLCPUFA en los TAG y TUE en P21 coincidió con la presencia en los túbulos seminíferos de una generación de espermatoцитos además de espermatogonias y células de Sertoli. A partir de allí la proporción de las especies moleculares con estos ácidos grasos sólo continuó aumentando hasta llegar a valor característico del tejido adulto (**Fig. 8**).

En cuanto a los **EC**, los de ratas del día 14 postnatal también carecieron de 22:5n-6 y de PUFA más largos, pero a diferencia de los glicéridos neutros fueron, en todos los tiempos estudiados, relativamente ricos en 20:4n-6 (**Fig. 8**). Una vez instaurada la espermatogénesis se incrementaron el 22:5n-6 y los VLCPUFA de más de 24 carbonos en los EC. En el grupo de estos últimos, es de señalar el incremento con el desarrollo de VLCPUFA pentaenoicos de hasta 32 átomos de carbono, siendo el principal el 28:5n-6 (**Fig. 10**). En este sentido, los EC se asemejaron a los TAG y a los TUE. Sin embargo, es de destacar una interesante diferencia: sólo en los EC testiculares aumentó el nivel de 20:4n-6 entre P30 y P37. Dado que como los TAG y los TUE los EC de los túbulos seminíferos de la rata adulta son pobres en 20:4n-6 (Furland *et al.* 2003), las especies de EC que contienen altas proporciones de este PUFA en nuestro caso deben pertenecer a células extratubulares, entre ellas, las células de Leydig.

Tanto los GPL (**Fig. 7**) como los lípidos neutros (**Fig. 8**) estudiados compartieron la característica de contener 22:6n-3 en P14, cuya proporción disminuyó continuamente con el desarrollo hasta ser minoritaria en el adulto. Un factor responsable de esto puede ser el cambio en la dieta de los animales, ya que su destete se produjo a partir de P20-P21.

En las **Figs. 9 y 10** se comparan los cambios en ácidos grasos de fosfolípidos y de lípidos neutros, respectivamente, entre los dos extremos del desarrollo testicular estudiados, P14 y P120. En los GPL (Fig. 9), se destaca la gran acumulación de 22:5n-6, y que ésta impactó en una magnitud significativamente mayor en las subclases plasmenil- que en sus contrapartes fosfatidil- de colina y etanolamina. Este cambio maduracional estuvo acompañado por un aumento en el mismo sentido en los TAG, TUE y EC (Fig. 10), aunque en este caso con una tendencia muy llamativa a acumular no sólo 22:5n-6 sino también especies con PUFA de 24 carbonos y aún más largos.

## 2. CAMBIOS CON LA DIFERENCIACIÓN CELULAR

En vista de que con el progreso de la espermatogénesis se incrementaba el contenido de especies ricas en PUFA en todos los lípidos, se decidió estudiar en el adulto la contribución de la diferenciación celular a estos cambios. Gracias a la posibilidad de aislar espermatocitos en paquitenio (EP) y espermátidas redondas (ER) con un aceptable grado de pureza aplicando modificaciones para la rata (Oresti *et al.* 2010) de los métodos originalmente diseñados para el ratón (Bellve *et al.* 1977, Romrell *et al.* 1976), se investigaron en ellas las subclases de CGP y EGP, así como sus ácidos grasos. También se estudiaron por comparación los cuerpos residuales (CR) que como mencionamos en la introducción derivan de las espermátidas más diferenciadas (paso 19 de la espermiogénesis en la rata). Las fracciones aisladas de los dos tipos de células germinales purificadas, EP y ER, y de los CR satisficieron los criterios generalmente aceptados de viabilidad y pureza para este tipo de preparaciones (89, 96, y 77% para EP, ER y CR, respectivamente) (**Fig. 11**).

### 2.3. Fosfolípidos y sus ácidos grasos

Los EP y las ER exhibieron una composición en fosfolípidos (**Fig. 12**) similar a la de los túbulos seminíferos (TS) de los cuales se aislaron, puesto que ambos tipos celulares, sumados, representan una parte importante de las células presentes en los TS del animal adulto. Los CGP y EGP fueron las dos clases de fosfolípidos mayoritarias en los dos tipos celulares (en promedio, un 55% y 30% del total, respectivamente), mientras fosfolípidos como SM, PS y PI se presentaron en proporciones similares y llamativamente bajas, de alrededor de un 4% cada uno en las células. La cardiolipina, al igual que los lisofosfolípidos, representó un porcentaje aún menor (menos del 3%).

La composición en clases fosfolipídicas de los CR también tuvo como mayoritarios a los CGP y EGP. Una característica interesante de estas partículas fue

que la PS fue el tercer fosfolípido en importancia cuantitativa en ellas (8,5% del total de los fosfolípidos).

En comparación con los dos tipos de células en estudio, los túbulos seminíferos contuvieron una proporción significativamente mayor de SM (7%) y una proporción ligeramente menor de CGP. Esta diferencia puede atribuirse a las células de Sertoli que están presentes en los túbulos sin fraccionar, las cuales contienen hasta un 20% de sus fosfolípidos en forma de SM, en contraste con el escaso 4% de las células.

Entre las subclases de CGP, la PC fue ampliamente mayoritaria (87-89%), en segundo lugar se ubicó la plasm<sub>an</sub>ilcolina (un 9%), y en tercer lugar la plasm<sub>en</sub>ilcolina (un 2-4% del total), tanto en los dos tipos de células germinales como en los CR (**Fig. 12**, panel inferior). En cambio en los EGP de las células, el orden de importancia de las subclases fue significativamente distinto que en los CGP. Así, prevaleciendo la PE (74%), en segundo lugar estuvo la plasm<sub>en</sub>iletanolamina (12-14%), y muy cercana a ésta estuvo la proporción de plasm<sub>an</sub>iletanolamina (12%).

En los CR, como en los dos tipos celulares, el orden de importancia de las subclases fue fosfatidil > plasm<sub>en</sub>il > plasm<sub>an</sub>il etanolamina, pero, con respecto a las células, los porcentajes de plasm<sub>an</sub>iletanolamina fueron menores (9%) mientras que los de plasm<sub>en</sub>iletanolamina fueron mucho mayores (23%), es decir que estas partículas fueron casi 2 veces más ricas en plasm<sub>en</sub>iletanolamina que las células.

Con relación a los ácidos grasos de las subclases fosfatidil- y plasm<sub>en</sub>il- de CGP y EGP (**Tablas 1 y 2**), en concordancia con lo observado al transcurrir el tiempo durante el desarrollo posnatal, conforme avanzó el grado de diferenciación de espermatozoides a espermátidas las células se enriquecieron en PUFA, en especial el 22:5n-6.

En EP, los dos fosfolípidos con uniones ésteres, PC y PE, se asemejaron entre sí en que mostraron un porcentaje mayor de 20:4n-6 que de 22:5n-6 (20:4 > 22:5). Por su parte, los mismos dos GPL de las ER se asemejaron entre sí en que alcanzaron proporciones muy parecidas de estos dos PUFA (20:4 ≈ 22:5). En contraste, los dos plasmalógenos, plasm<sub>en</sub>ilcolina y plasm<sub>en</sub>iletanolamina, presentaron una proporción considerablemente mayor de 22:5n-6 que de 20:4n-6 (22:5 >> 20:4) en ambos tipos celulares. Llamativamente, los CR contuvieron una proporción de PUFA aún mayor que la de las células estudiadas, en especial en los dos plasmalógenos.

En la **Fig. 13** se resumen gráficamente los contrastes mencionados en el 20:4n-6 y el 22:5n-6. Confrontando primero túbulos seminíferos con células, resultó evidente que *los dos* PUFA fueron proporcionalmente más abundantes en los GPL de estas

últimas. Como ya mencionamos, esto es consistente con el hecho de que los túbulos contienen células de Sertoli, las cuales son más pobres en ellos que las células germinales (Beckman & Coniglio 1979). Comparando ahora las células entre sí, la proporción de 22:5n-6 se incrementó mucho con el progreso de la diferenciación mientras la de 20:4n-6 bajó en las cuatro subclases, muy especialmente en los dos plasmalógenos.

Siguiendo el siguiente orden EP → ER → CR, la relación 22:5n-6 / 20:4n-6 pudo calcularse, respectivamente, en 0.5, 1 y 4 en PC y 0.8, 1.0 y 1.2 en PE, mientras que en los correspondientes plasmalógenos esa relación fue de 2, 4, y 8 en plasmenilcolina y 4, 10, y 60 en plasmeniletanolamina. Por lo tanto, la fracción de los CR no sólo mostró la más alta relación entre plasmenil y fosfatidil subclases en CGP y EGP, sino también la más alta relación entre 22:5n-6 y 20:4n-6 en las cuatro subclases estudiadas.

## 2.2. Lípidos neutros y sus ácidos grasos

La **Tabla 3** compara el *contenido* de TAG y TUE, así como de EC, en los dos tipos celulares y en los CR. La concentración de TAG aumentó con la diferenciación de espermatozoides a espermátidas, y resultó mucho más alta en los cuerpos residuales. Este hecho señala que los TAG son componentes importantes de las células espermatozoides, y que su contenido aumenta con su grado de diferenciación.

En contraste con los TAG, los TUE, así como los EC, fueron lípidos minoritarios tanto en las células germinales como en los CR, y con tendencia a decrecer con la diferenciación celular. El hecho de que el contenido de estos lípidos fuera significativamente menor en las células espermatozoides que en los túbulos seminíferos, en los que están presentes las células de Sertoli, permite pensar que éstas últimas, si bien no necesariamente las únicas, son la fuente principal de TUE y de EC intratubulares.

Con el progreso de la diferenciación, los TAG aumentaron su porcentaje de 22:5n-6 (Tabla 4) y de PUFA más largos, tal como los GPL (Tablas 1 y 2), en el orden EP → ER → CR. Por su parte, los minoritarios TUE detectados en las células germinales tendieron a aumentar levemente su 22:5n-6 pero a disminuir sus PUFA de 24 carbonos y de más larga cadena, entre ellos el 28:5n-6 o el 30:5 n-6 con la diferenciación. Los EC, llamativamente, contuvieron más 28:5n-6 que 22:5n-6 en espermatozoides en paquiteno, tendiendo ambos PUFA a disminuir con la diferenciación (**Tabla 4**).

### 3. EFECTOS DE LA EXPOSICIÓN A EPISODIOS INTERMITENTES DE HIPERTERMIA SOBRE LOS LÍPIDOS DEL TESTÍCULO

#### 3.1. Cambios micro y macroscópicos

Estudios clásicos (Chowdhury & Steinberger 1964) para cuantificar los efectos de la temperatura sobre el epitelio germinal de la rata mostraron que una única exposición a una temperatura bien definida (15 min a 43°C) no afecta la distribución de frecuencias de los varios estadios de la espermatogénesis, ni el número de células de Sertoli, espermatogonias, o espermatocitos en reposo. Las células dañadas por este tratamiento son, por una parte, los espermatocitos primarios desde el estadio IX a XIV de la espermatogénesis (leptoteno hasta, e incluyendo, a los espermatocitos en división, salvo paquiteno en estadios V y VI), y por otra, a las espermátidas tempranas (pasos 1 y 2 iniciales de la espermiogénesis) pues aquellas que están más allá del paso 2 continúan su maduración para formar espermatozoides maduros. Los autores arribaron a esta conclusión al observar las *consecuencias* de esa exposición, 2, 8, y 26 días después. Así, al día 8 se había reducido el número de espermatocitos en paquiteno en estadios VII a XII y las espermátidas entre los pasos 3 y 7 de la espermiogénesis, mientras el número de espermátidas en paso 9 en adelante se continuaba formando y liberando desde el testículo. Al día 26, el número de espermatocitos se había normalizado, así como el de espermátidas en los pasos 1 a 13 de la espermiogénesis, pero ahora estaban aún ausentes las más maduras (pasos 14 a 19) y los espermatozoides en la mayoría de los túbulos.

La exposición del testículo de ratas adultas a períodos de hipertermia idénticos pero aplicados en forma repetida y espaciada, es decir, intermitente, que utilizamos en el presente estudio (una exposición de 15 minutos a 43 °C, una vez por día, durante 5 días consecutivos) dieron resultados que en la histología (**Fig. 14**) fueron compatibles con esta descripción. Se produjo una notoria reducción en el número de células germinales presentes en los túbulos seminíferos en las semanas subsiguientes, llegando dicho número a su valor *mínimo* a la semana 2 (día 14 después de la última exposición).

La devastación celular causada por las repetidas exposiciones a 43 °C se hizo evidente durante la primera semana (día 7) posterior al tratamiento (Fig. 14). En secciones transversales de muchos túbulos pudo verse que la población de células espermatogénicas había disminuido notablemente su número. Las células que aún estaban presentes pueden atribuirse a las células que habían sido “resistentes” a ese tratamiento, esto es, principalmente células de Sertoli y espermatogonias (Fig. 14, cerca de la membrana basal) por una parte, y por otra, a las espermátidas más

diferenciadas y espermatozoides (Fig. 14, hacia el lumen de los túbulos). Consistentemente con el daño ocasionado, en el lumen de los túbulos se observaron células gigantes multinucleadas el día 7 (Fig. 14), que también se observaron tras una única exposición a 43 °C (Chowdhury & Steinberger 1964). Estas masas de células, conocidas como simplastos, constituyen un hallazgo patológico común en el testículo lesionado por una variedad de agentes nocivos, y provienen de clones de espermátidas *desprendidas* desde su ubicación normal alrededor de las células de Sertoli que las sostienen. Esto nos sugirió que éstas últimas, pese a haber sobrevivido, también debieron haber estado afectadas funcionalmente, al menos durante la primera semana.

Las espermátidas y espermatozoides que aún quedaban en los túbulos seminíferos a la semana 1 post-tratamiento continuaron disminuyendo en número, y estuvieron prácticamente ausentes durante las semanas subsiguientes (Fig. 14), en que los túbulos tenían un menor diámetro y un lumen patente. A la semana 2, espermatogonias y células de Sertoli, reconocibles por la morfología típica de sus núcleos, fueron virtualmente las únicas que poblaban el interior de una gran proporción de los túbulos, la altura de cuyo epitelio se había reducido significativamente. Esto sugiere que a la semana 2 post-hipertermia los espermatozoides que finalmente se formaron a partir de las espermátidas en ese período, en su mayor parte habían egresado del testículo, o se habían dañado a tal punto que fueron removidos por las células de Sertoli. A la semana 3 (día 21) habían comenzado a *reaparecer* algunos espermatoцитos primarios en muchos túbulos, los que, al cumplirse la semana 4 (día 28) habían alcanzado estadios más avanzados. A la semana 6 (día 42) la mayoría de los túbulos había aumentado su diámetro con respecto a las semanas anteriores, con presencia de espermatoцитos y espermátidas en maduración. Éstas aparentemente alcanzaron estadios más avanzados a la semana 9 (día 63), y a la semana 12 (día 84) habían aparecido formas elongadas de las mismas y colas de espermatozoides en la luz de la mayoría de los túbulos (Fig. 14). Consideramos que a la semana 12 los efectos de las aplicaciones de hipertermia se habían revertido. Si bien en este momento el epitelio seminífero en la mayor parte de los túbulos tenía características histológicas similares al de los animales controles no tratados, la membrana basal de los túbulos estaba más engrosada, y el intersticio aparecía más hiper celular que el de los controles a la semana 12 post-hipertermia.

El descenso del peso testicular que ocurrió durante las primeras 3-4 semanas luego de las exposiciones a la hipertermia (**Fig.15**) así como de la recuperación gradual del mismo a partir de la semana 4 en adelante pueden adjudicarse

principalmente, si bien no únicamente, a los cambios celulares descritos. El contenido de fosfolípidos por testículo acompañó los cambios observados en el peso testicular, ocurriendo *casi* en paralelo (Fig.15). Sin embargo, al comparar la caída en la cantidad de fósforo con la del peso de tejido, el fósforo bajó cerca de un 50% mientras que el peso bajó un 34% durante la primera semana, y ambos habían bajado un 50% a la segunda semana. Esto es consistente con la presencia de importantes cambios hidrolíticos afectando a los fosfolípidos, y con la presencia de cambios inflamatorios afectando el volumen tisular, durante la primera semana, que se ajustaron durante la segunda. A la semana 3 (día 21) se produjo un aumento del contenido de fósforo que si bien fue pequeño, ocurrió mientras continuaba la reducción del peso, lo que sugiere un aumento en la producción de fosfolípidos en células que no estaban aumentando en número. Tanto el fósforo lipídico como el peso estaban aumentando a partir de la semana 4 (día 28) para continuar esa tendencia a partir de ese momento hasta la reversión del efecto de la temperatura a la semana 12.

### 3.2. Efectos sobre los fosfolípidos y sobre las subclases de CGP y EGP

Entre la primera y segunda semanas post-tratamiento, el porcentaje de reducción en el contenido de fósforo lipídico observado en la Fig. 15 puede atribuirse principalmente a la reducción del contenido de CGP y de EGP (**Fig. 16**). También se observaron caídas en los niveles de lípidos cuantitativamente menores, aunque la SM disminuyó relativamente *menos* en las primeras dos semanas que GPL como el PI, la CL y PS. Notablemente, el contenido de lisofosfatidilcolina (LPC) *aumentó* varias veces durante la primera semana y virtualmente se normalizó en la segunda (Fig. 16, paneles superiores). Un patrón similar pudo haber ocurrido con otros lisofosfolípidos.

Las disminuciones de distintos fosfolípidos a distinta velocidad resultan en que durante las dos primeras semanas post-tratamiento la composición de fosfolípidos se mostró alterada. Por ejemplo, la rápida disminución de CGP y EGP a la semana 1 se reflejó en un aumento en el porcentaje de todos los demás GPL (Fig. 16, paneles inferiores). Otro factor que influyó en estos cambios fue el tipo celular que permanecía. Así, el aumento duradero hasta la semana 2 en el porcentaje de SM (Fig. 16) puede adjudicarse a que se perdieron en ese período células germinales relativamente pobres en SM pero permanecieron células más ricas en ella, entre las cuales están las células de Sertoli.

La subclase fosfatidil, tanto de colina como de etanolamina, fue la principal responsable de la disminución observada en los niveles de GPL, durante las primeras dos semanas estudiadas, si bien la PC disminuyó *más* que la PE, tanto en términos

relativos (composición) como absolutos (contenido) (**Fig.17**). Los plasmalógenos también mostraron una significativa reducción continuando hasta la semana 2, aunque en este caso la plasmeniletanolamina disminuyó comparativamente *más* que la plasmencilolina. Esto podría encontrar explicación en el hecho de que en este período los túbulos se despoblaron de espermátidas y de sus CR ricos en plasmeniletanolamina.

En cuanto al contenido de plasmanil -colina y -etanolamina, ambos disminuyeron proporcionalmente durante las primeras 2 semanas, aumentando a la semana 6 en adelante (Fig. 17). Llamativamente, la plasmencilolina pareció aumentar su contenido por testículo sobre el de los controles a la semana 12 post-tratamiento.

### 3.3. Efectos sobre los ácidos grasos de fosfolípidos y subclases

La disminución del fósforo lipídico total en función del tiempo post-hipertermia fue acompañada de la correspondiente mengua en el contenido de ácidos grasos propios de los GPL. Entre éstos, el 20:4n-6 y el 22:5n-6 fueron los que más disminuyeron en la masa decreciente de GPL durante las semanas en que disminuía el número de células. Esto se vio en forma muy marcada en los GPL totales y en los GPC totales (**Fig. 18**), donde, llamativamente, el porcentaje de 20:4 disminuyó durante la primera semana y el de 22:5n-6 en forma continuada durante las primeras dos semanas. Es de destacar la significativa caída que paralelamente al 22:5n-6 sufrieron los porcentajes de 24:4n-6 y especialmente el 24:5n-6 durante esas primeras 2 semanas. Otros ácidos grasos disminuyeron menos o no se afectaron, lo que explica que se incrementara varias veces su porcentaje (Fig.18), como el 18:2n-6 y el 18:1n-9.

La disminución del porcentaje de 20:4n-6 y de 22:5n-6 afectó a las 2 subclases de CGP y de EGP estudiadas (**Fig. 19**), aunque las caídas de ambos ácidos grasos fueron relativamente más intensas en los dos plasmalógenos que en los dos diacil-GPL. En PC y PE el porcentaje de 16:0 disminuyó hasta la semana 2, lo que es congruente con su presencia de las mismas especies moleculares en las que está esterificado el 22:5n-6 (en *sn-1* y *sn-2* del glicerol, respectivamente).

Teniendo en cuenta los datos cuantitativos de la Fig. 17 y las proporciones de ácidos grasos mostradas en la Fig. 19, puede estimarse que a la semana 2 post-tratamiento la cantidad de 20:4n-6 había disminuido 3,5 y 4,6 veces, y la que de 22:5n-6 unas 10 y 8 veces, en fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina, respectivamente. En comparación, el 20:4n-6 había disminuido 2 y 6 veces, y el 22:5n-6 había caído tanto como 4 y 14 veces con respecto a sus valores iniciales, en la plasmencilolina y en la



plasmeniletanolamina respectivamente. En esta última, fue particularmente notoria la disminución del 24:4n-6 y del 24:5n-6 a la semana 2.

El hecho más destacable fue que la proporción de 20:4n-6, luego de su caída a la semana 1 en general ya mostraba tendencia a recuperarse a la semana 2, mientras la de 22:5n-6 había llegado a su nivel más bajo en ese momento (relación 22:5/20:4 inferior a 1.0) y comenzó a recuperarse recién después de la semana 2 (Figs. 18 y 19). A la sexta semana post-tratamiento el 22:5n-6 ya había aumentado mucho con respecto al 20:4n-6 (relación 22:5/20:4 cercana a 1 en PE y PC, y muy superior a 1 en los correspondientes plasmalógenos). A la semana 12, tal como en los adultos no tratados, la relación 22:5/20:4 fue cercana a 1 en PC y PE, y significativamente mayor que 1 en plasmencil-colina y etanolamina (Fig. 19). Los cambios en los perfiles de ácidos grasos sugieren que en este período hubo una recuperación de la capacidad de las células que reaparecieron en el tejido para sintetizar sus propios lípidos.

### 3.4. Efectos sobre los lípidos neutros y sus ácidos grasos

Al contrario de lo ocurrido a los GPL, los cambios ocurridos en los lípidos neutros como consecuencia del tratamiento térmico mostraron un importante aumento en su concentración, particularmente notable durante las primeras dos semanas (**Fig. 20**, paneles superiores).

Los TAG tendieron a aumentar durante la primera semana de este período, si bien disminuyeron un 50% entre las semanas 1 y 2, y hasta las semanas 4 y 6, tal como lo hicieron los GPL. A partir de ésta última, los niveles de TAG comenzaron a aumentar hasta llegar a los relativamente altos valores que son característicos del tejido testicular adulto normal. En la semana 12 tanto el contenido testicular de TAG (Fig. 20) como el de fosfolípidos (Fig. 15) era similar al de los animales control.

También como en el caso de los GPL, la disminución de los TAG que ocurrió a partir de la semana 2 post-tratamiento involucró principalmente a aquellas especies moleculares que contenían 22:5n-6, con caídas importantes en las especies con 24:4n-6 y 24:5n-6 y con polienos más largos (**Fig. 20**, paneles inferiores). La persistencia durante la primera semana del contenido de TAG, en especial los TAG que contienen los PUFA mencionados, es consistente con el hecho de que estos lípidos neutros son típicos de las células germinales más diferenciadas, esto es, las espermátidas elongadas y sus correspondientes CR (Oresti *et al.* 2010) y Tabla 1). Éstas células fueron las últimas en desaparecer del testículo como consecuencia de las exposiciones a la temperatura (semana 2), y también las últimas en reaparecer semanas después de haber cesado las mismas (semana 6).

En claro contraste con los TAG, durante la primera, y también la segunda, semana post-hipertermia el contenido de TUE se *incrementó* 2 veces con respecto a los controles no tratados, y el de los EC aún más, unas 4 veces (Fig. 20). Alrededor de la semana 6, los TUE y los EC habían retornado a valores similares a los controles y continuaron así de ahí en adelante.

Los **TUE** difirieron de los TAG en que aumentaron significativamente durante el mismo lapso de 2 semanas en que disminuían los GPL, entre ellos los que tenía uniones éteres. El 22:5n-6 fue el ácido graso cuyo nivel más disminuyó en GPL y el que más aumentó en los TUE, y lo mismo ocurrió con el 24:4n-6 y el 24:5n-6. La correspondencia temporal cuantitativa y cualitativa entre aumento de TUE y disminución de plasmalógenos sugiere que los TUE podrían formarse durante el catabolismo de los primeros a diglicéridos, seguido de la incorporación de un ácido graso extra a la posición *sn*-3 del glicerol.

Entre los ácidos grasos acumulados en los EC, fue cuantitativamente importante el acopio de 22:5n-6, así como el de VLCPUFA de más de 24 carbonos en ellos (Fig. 20), entre los cuales más que los de 24 carbonos se destacaron PUFA como el 28:5n-6 (Fig. 10), un PUFA característico, prácticamente exclusivo, de estos lípidos.

### 3.5. Gotas lipídicas

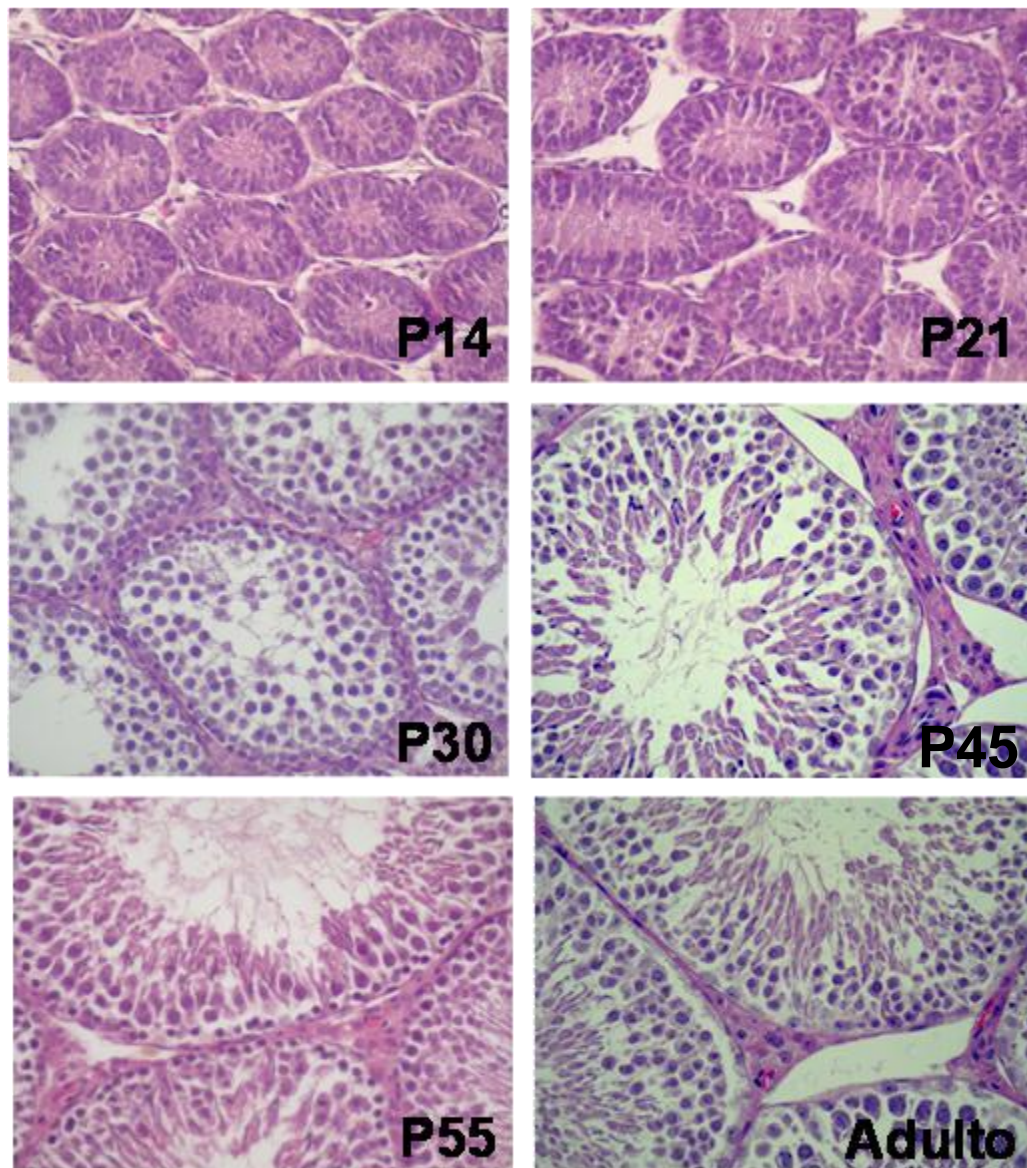
En la Fig. 6 se había observado que en los túbulos seminíferos de ratas adultas controles coexisten dos poblaciones de gotas lipídicas, una formada por gotas relativamente grandes, bastante dispersas, ubicadas en la parte basal del epitelio seminífero, y la otra formada por gotas pequeñas y mucho más numerosas distribuidas en cercanías de cara luminal del epitelio seminífero. En estudios previos se había visto que las primeras corresponden a gotas ubicadas en el citoplasma de células de Sertoli, mientras las segundas corresponden a gotas que se localizan en forma concentrada en los CR (Oresti *et al.* 2010). La activa acumulación de los tres lípidos *neutros* que tenía lugar en el testículo 1-2 semanas después de los episodios de hipertermia, así como su normalización ulterior (Fig. 20), se correlacionó con los cambios que se observaron en la distribución de gotas lipídicas (**Fig. 21**).

Una semana después de la exposición a la hipertermia, los dos tipos de gotas se encontraron más cercanos entre sí en el epitelio y más cerca de la membrana basal que en los controles, lo que se correlaciona con el hecho de que se habían perdido las capas de células conteniendo espermatoцитos primarios, por lo que las gotas pequeñas que persistían se pueden adjudicar a las espermátidas aún existentes no afectadas. Dos semanas después, cuando virtualmente no quedaban otras células germinales

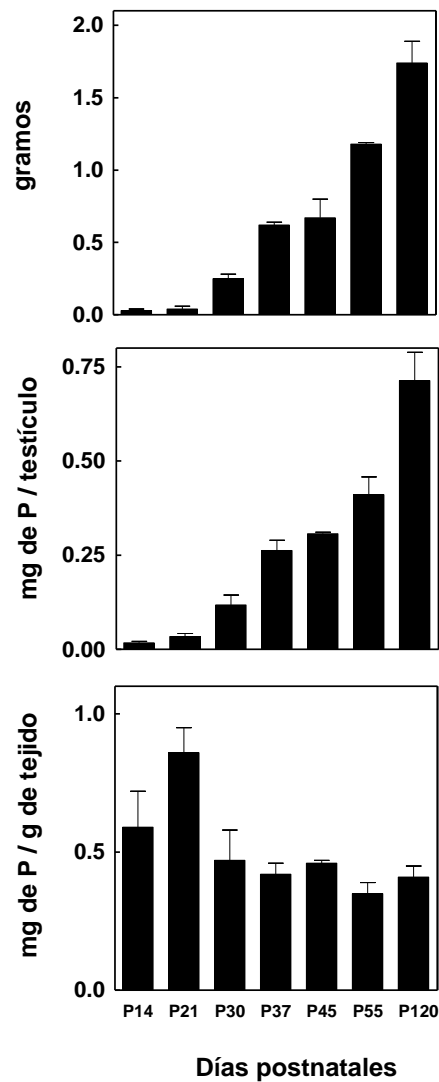
que espermatogonias y células de Sertoli en los túbulos seminíferos, tanto las gotas lipídicas grandes como pequeñas aparecían juntas, mezcladas en el reducido epitelio germinal virtualmente constituido sólo por células de Sertoli (**Figs. 21 y 22 A**). Esto ocurrió exclusivamente dentro de los túbulos, no siendo detectables cambios en gotas lipídicas del intersticio. Este resultado sugiere que a la semana 2 ambos tipos de gotas lipídicas estaban contenidas en las células de Sertoli, lo que a su vez sugiere que éstas ya había retomado una de sus funciones específicas, que es la fagocitosis seguida del catabolismo de los cuerpos apoptóticos y residuales. Las gotas presentes a la semana 2 como consecuencia del shock térmico nos permiten pensar que contenían los lípidos neutros cuya cantidad, en conjunto, había aumentado tan significativamente con respecto a los disminuidos fosfolípidos en ese momento. Luego de la semana 6 se normalizó gradualmente tanto la distribución como la abundancia relativa de las gotas lipídicas grandes y pequeñas, hasta alcanzar, en la duodécima semana post-hipertermia, los parámetros típicos del tejido normal.

En las **Figs. 22 y 23** se presenta un resumen de los cambios histológicos y bioquímicos producidos en los lípidos y ácidos grasos estudiados en comparación con los controles, al cumplirse dos momentos claves después de cesados los episodios transitorios de exposición a la hipertermia, esto es, la semana 2 (día 14) y su reversión a la semana 12 (día 84).

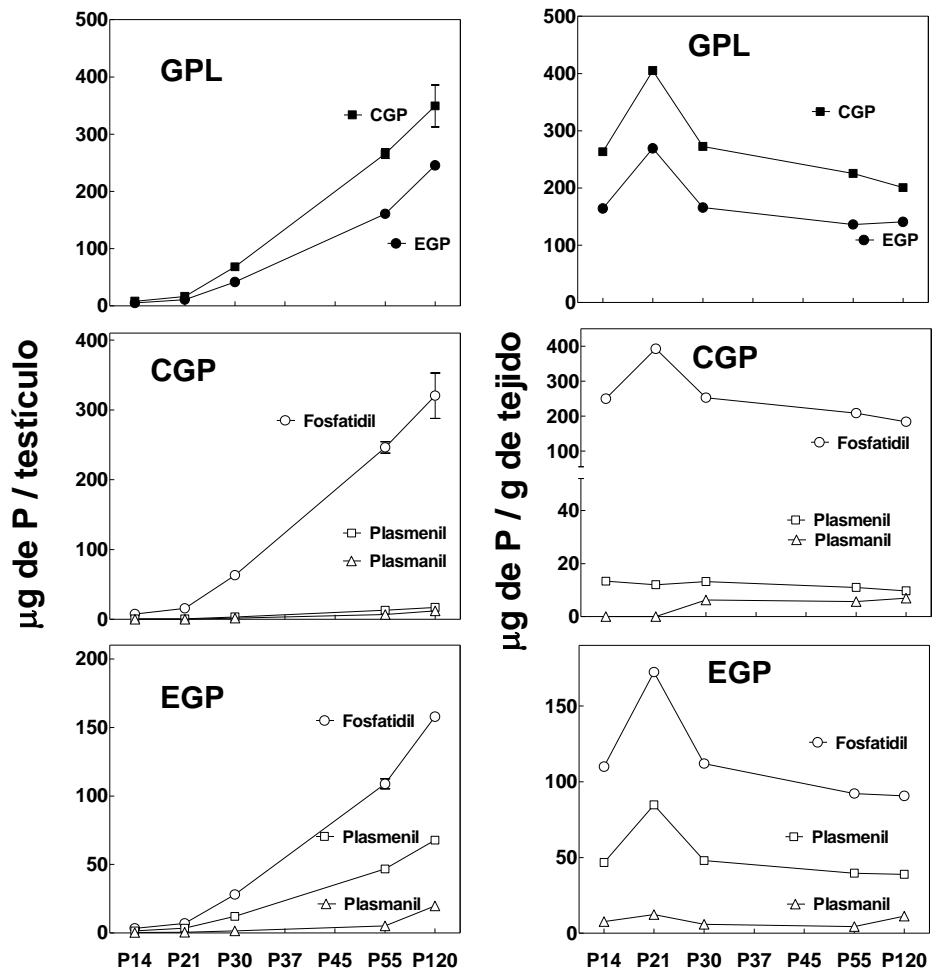
A la semana 2, el aumento del tamaño y número de gotas lipídicas (**Fig. 22 A**) se correlacionó con el incremento en la cantidad de lípidos neutros por testículo (**Fig. 23**), que obviamente aumentaron muchísimo su *concentración* por gramo de tejido al disminuir notoriamente el peso del órgano (Fig. 15). Otro hecho que los correlacionó fue que el 22:5n-6 fue el PUFA que más se perdió en proporción y cantidad desde los fosfolípidos, en especial de los plasmalógenos, y el que más aumentó con respecto a los controles en los lípidos neutros, en especial en los TUE, y también en los EC de la semana 2 (Fig. 22 B y 23). A la semana 12 (día 84) luego de las exposiciones a la temperatura, la distribución y tamaños de las gotas lipídicas, así como las cantidades y ácidos grasos principales de lípidos neutros y polares, prácticamente se habían normalizado.



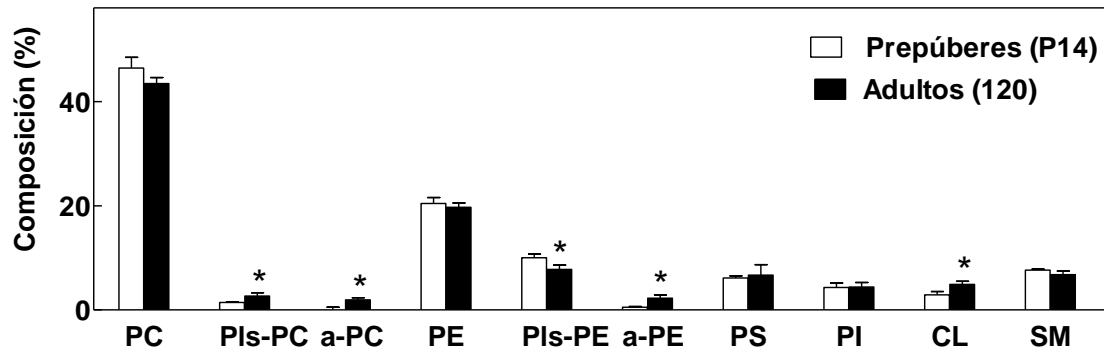
**Fig. 1.** Cambios en la histología del testículo de la rata con el desarrollo. Se muestran fotomicrografías de secciones testiculares coloreadas con hematoxilina-eosina (X400) a diferentes tiempos del desarrollo postnatal. Los días postnatales que se muestran se designan precedidos por la letra P (en este caso P14, P21, P30, P45, P55 y adulto). Nótese el aumento gradual del espesor del epitelio germinal, del diámetro de los túbulos seminíferos y de la población celular.



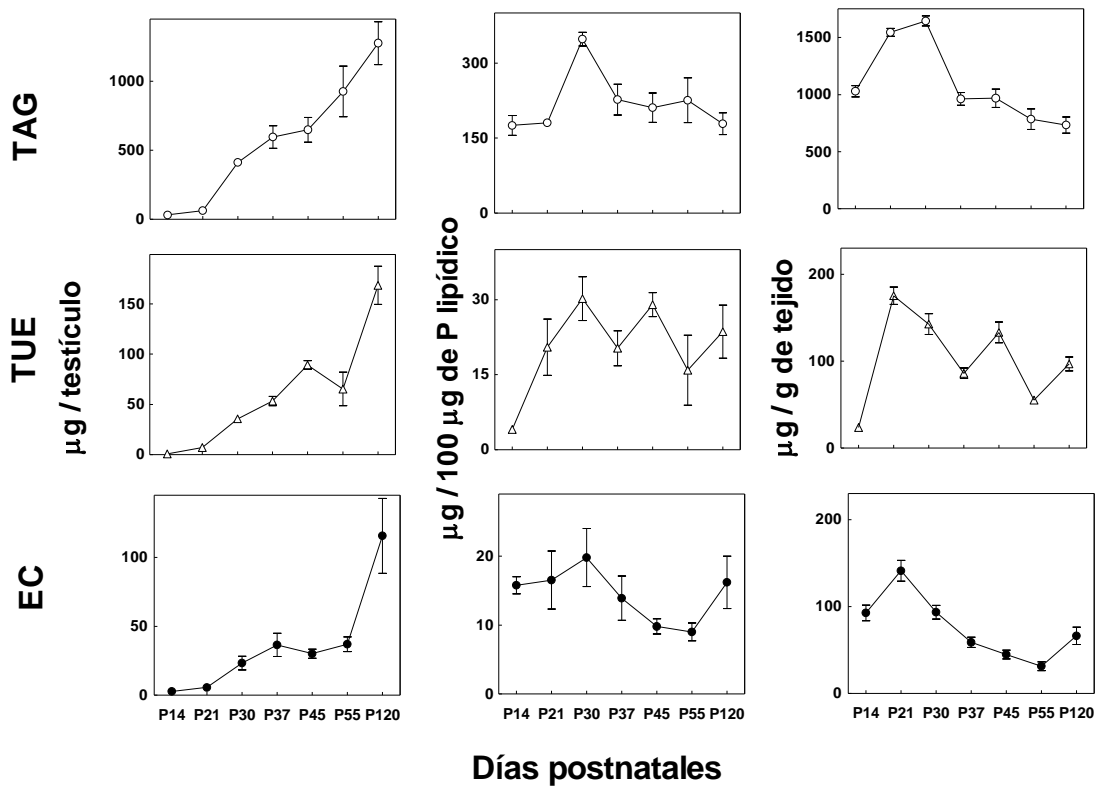
**Fig. 2.** Aumentos en el peso, en la cantidad y concentración de fosfolípidos en el testículo de rata con el desarrollo. Los días postnatales estudiados se designan precedidos por la letra P, correspondiendo en este caso P120 al adulto. P, fósforo lipídico.



**Fig. 3.** Cambios con el desarrollo postnatal en el contenido testicular de glicerofosfolípidos de colina y de etanolamina (CGP y EGP) y de sus tres subclases. Las subclases se indican como fosfatidil (1,2-diacil-*sn*-glicero-3-fosfolípidos), plasmenil (alc-1-enil-2-acil-*sn*-glicero-3-fosfolípidos), y plasmanil (1-O-alkil-2-acil-*sn*-glicero-3-fosfolípidos).

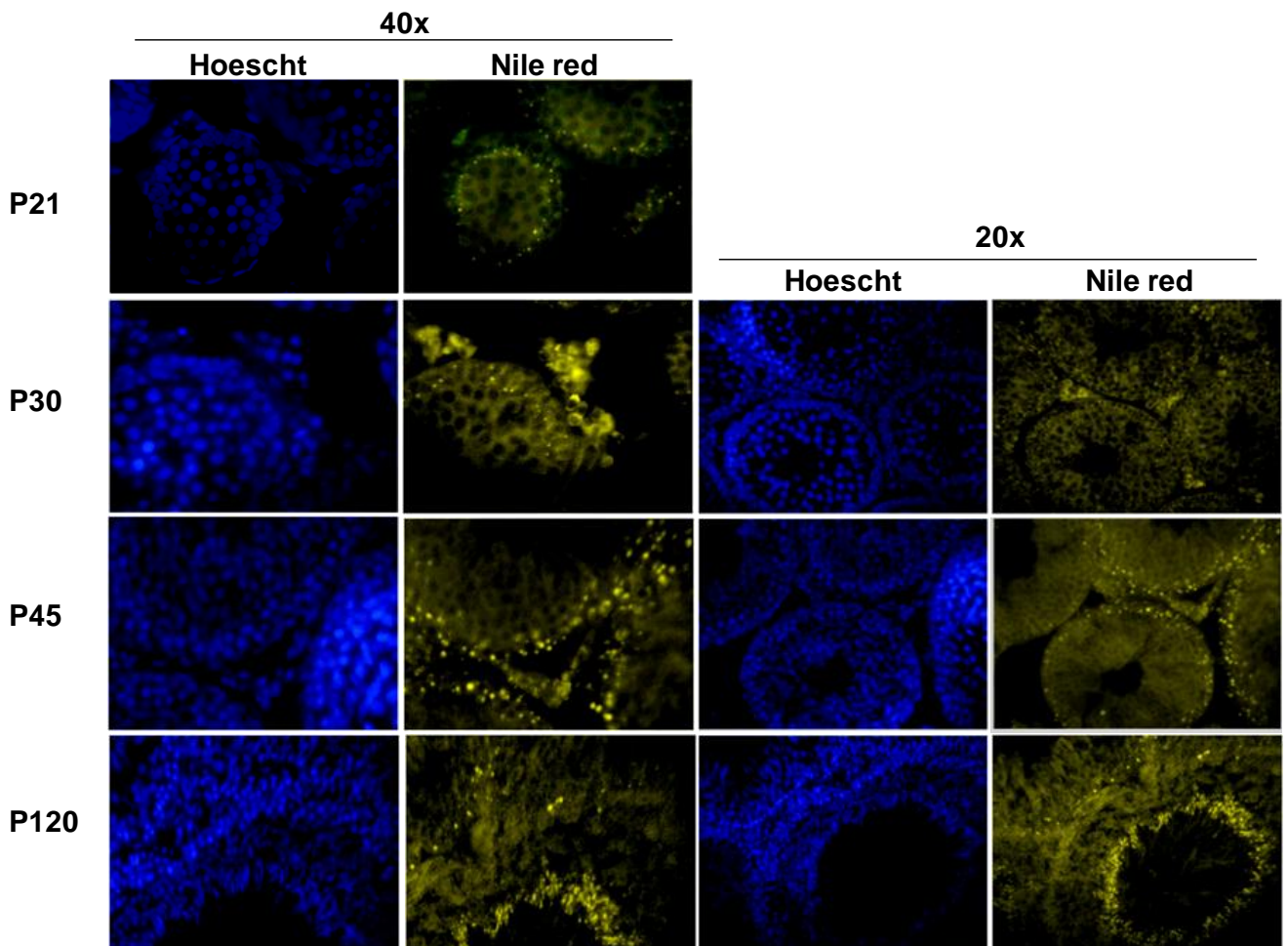


**Fig. 4.** Comparación de las proporciones de las tres subclases de GPL de colina y de etanolamina con las de otros fosfolípidos testiculares en animales prepúberes y adultos. Las abreviaturas PC, Pls-PC y a-PC corresponden a fosfatidil, plasmenil y plasmanil colina, mientras PE, Pls-PE y a-PE corresponden a fosfatidil, plasmenil y plasmanil subclases de EGP. PS, fosfatidilserina, PI, fosfatodilinositol; CL, cardiolipina; SM, esfingomielina. Los asteriscos (\*) denotan diferencias significativas entre las muestras.

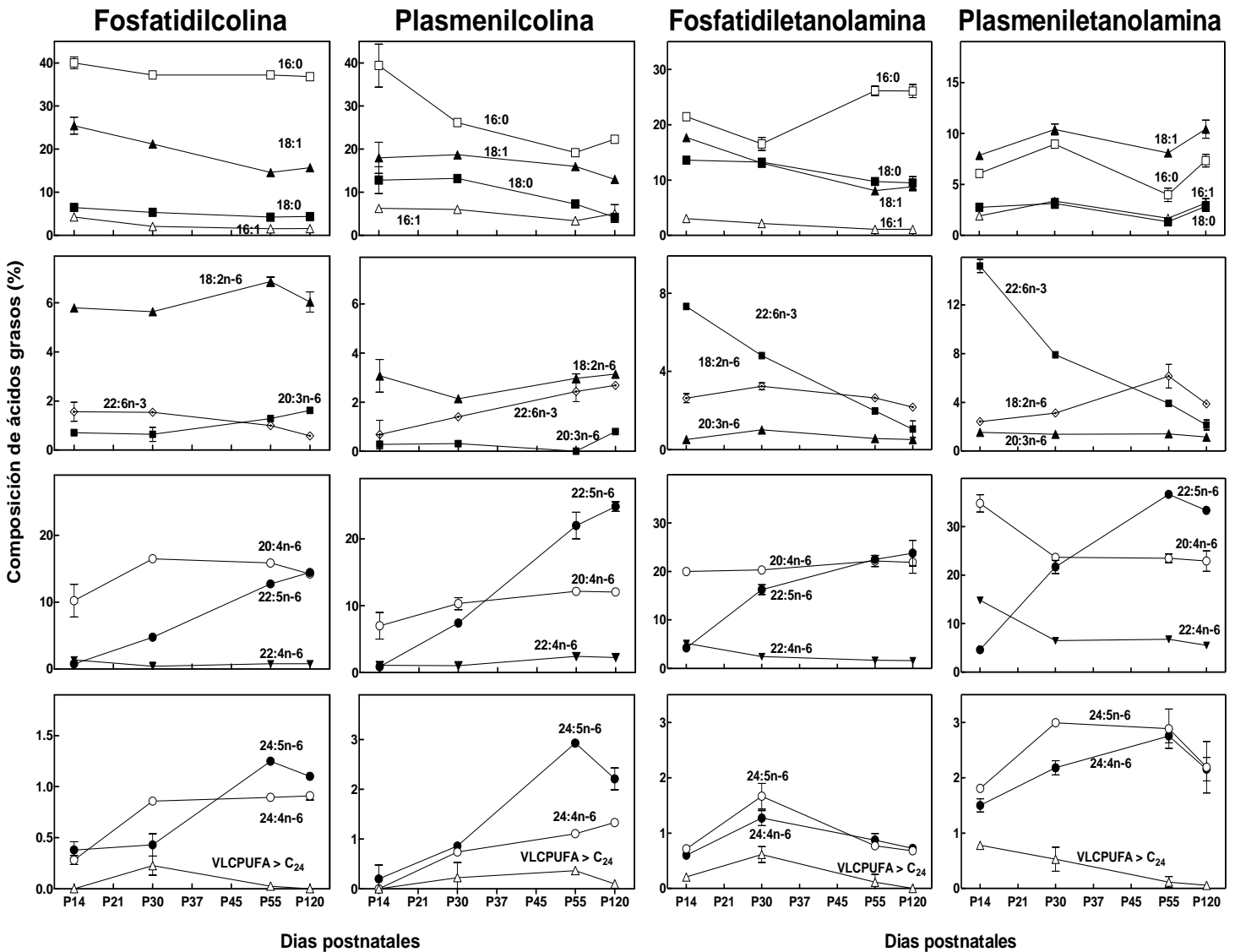


**Fig. 5.** Cambios en el contenido y en la concentración de lípidos neutros testiculares con el desarrollo postnatal. TAG, triacilglicerol; TUE, triglicéridos con una unión éter; EC, ésteres de colesterol

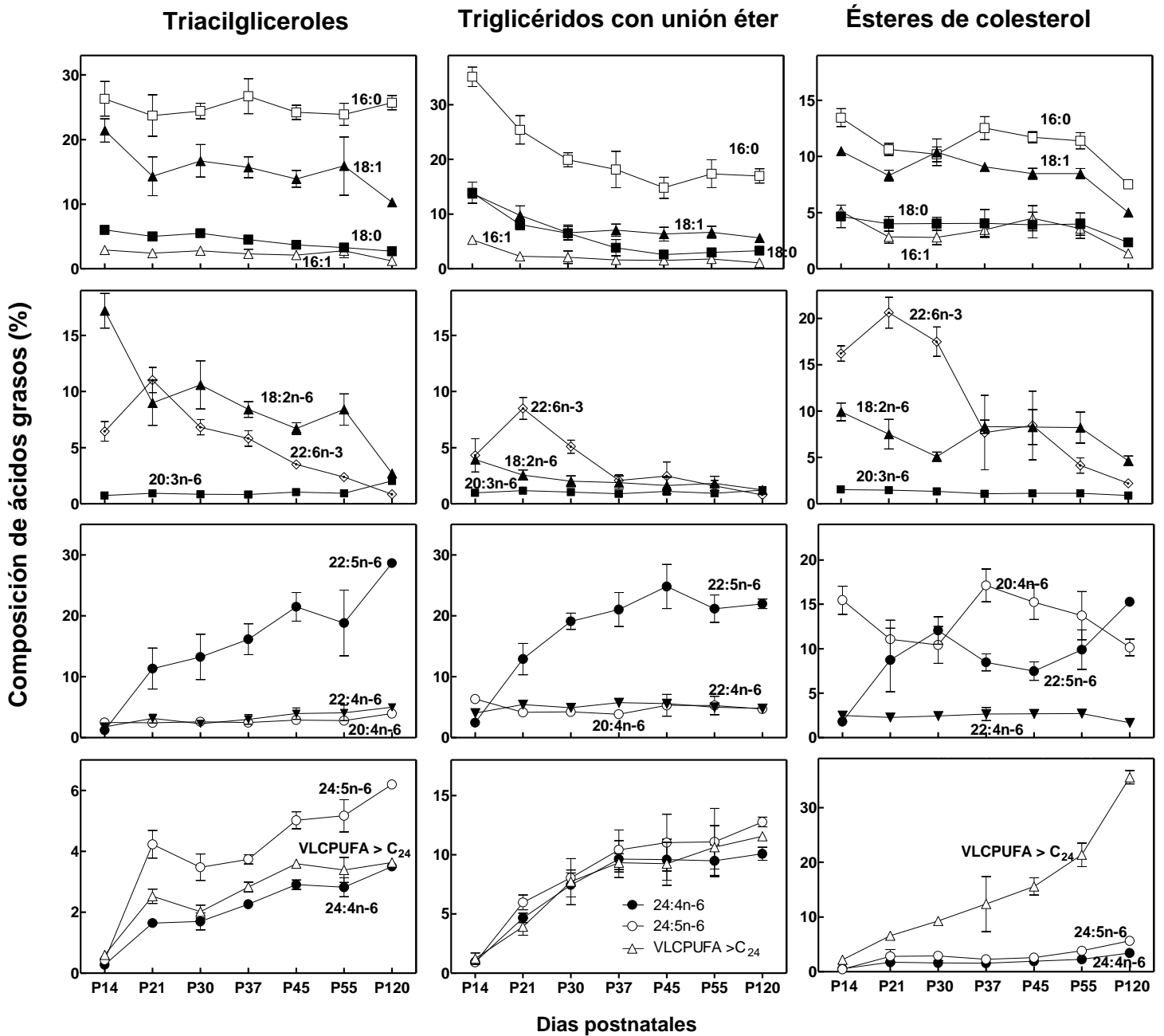




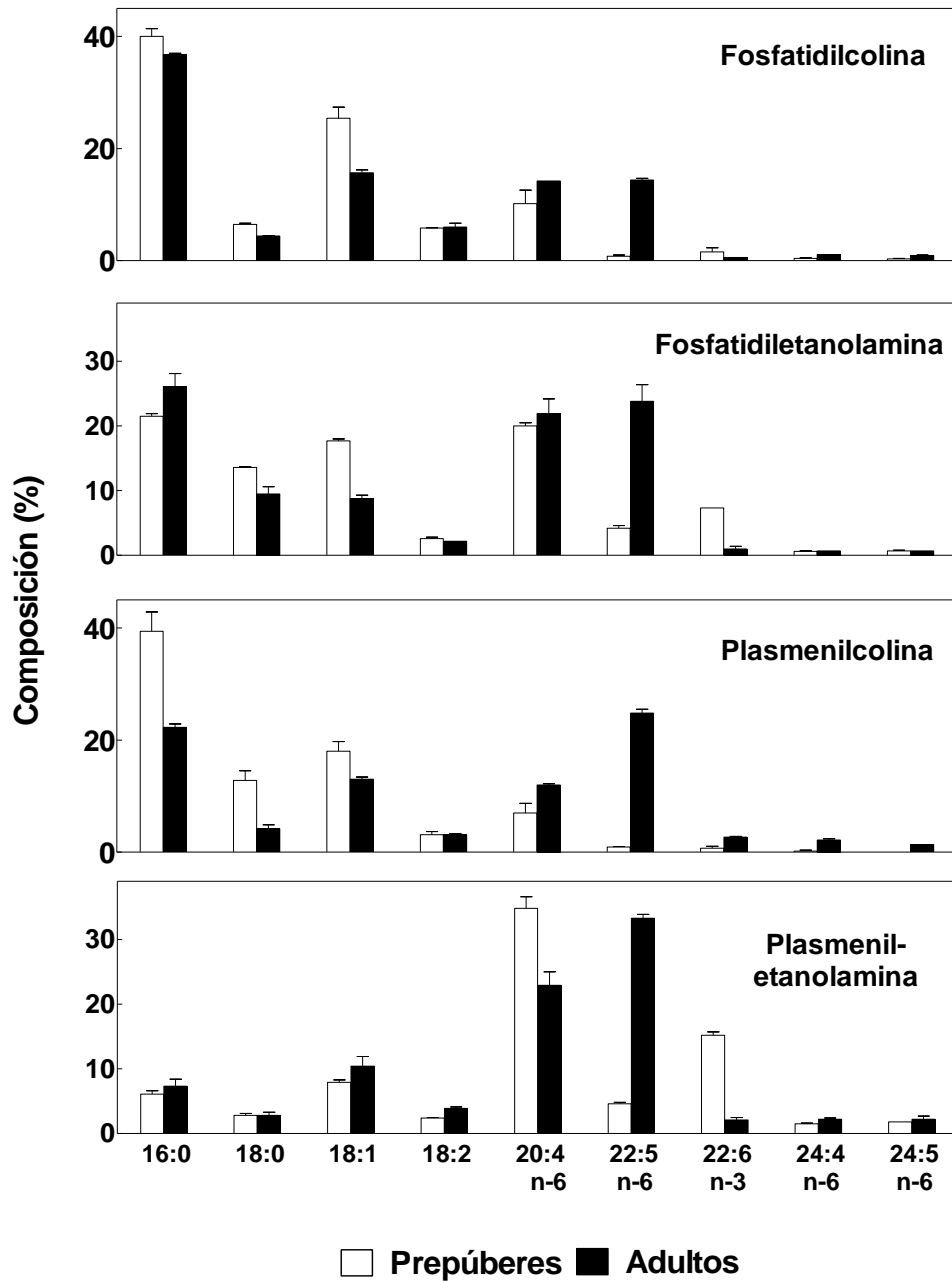
**Fig. 6.** Presencia de gotas lipídicas a diferentes edades del desarrollo testicular. Se muestran, a dos aumentos, fotomicrografías de secciones de testículo teñidas con Rojo Nilo (Nile red) para localizar gotas lipídicas y Hoechst 33342 para marcar los núcleos, a los días del desarrollo postnatal indicados (P21, P30, P45 y P120). En este último tiempo, perteneciente a testículos adultos, se observó la presencia de dos poblaciones de gotas lipídicas en los túbulos seminíferos, una de gotas grandes localizadas cerca de la parte basal y otra de gotas más pequeñas y numerosas, arracimadas en la cara epitelial de los túbulos seminíferos que mira hacia el lumen de los mismos.



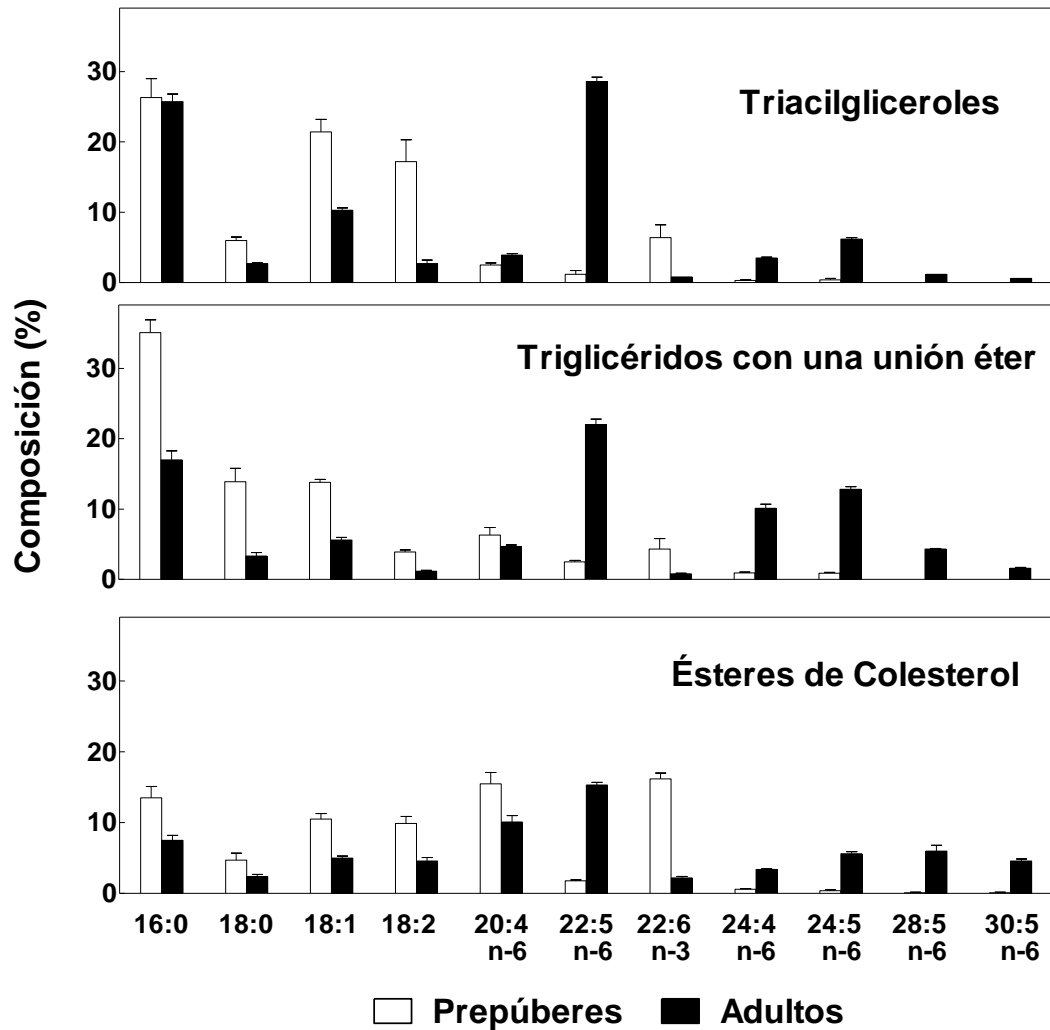
**Fig. 7.** Cambios en la composición en ácidos grasos de subclases de CGP y de EGP testiculares con el desarrollo postnatal. Los ácidos grasos se representan mediante la convención, número de átomos de carbono: número de dobles ligaduras, mientras n-3 o n-6 se refieren a la serie. La abreviatura VLCPUFA>C<sub>24</sub> representa la suma de ácidos grasos pentaenoicos y tetraenoicos de más de 24 carbonos. Un PUFA que tendió a disminuir con la edad fue el 22:6n-3. El cambio dominante en la composición de ácidos grasos, en los cuatro casos, fue el aumento en la proporción de 22:5n-6.



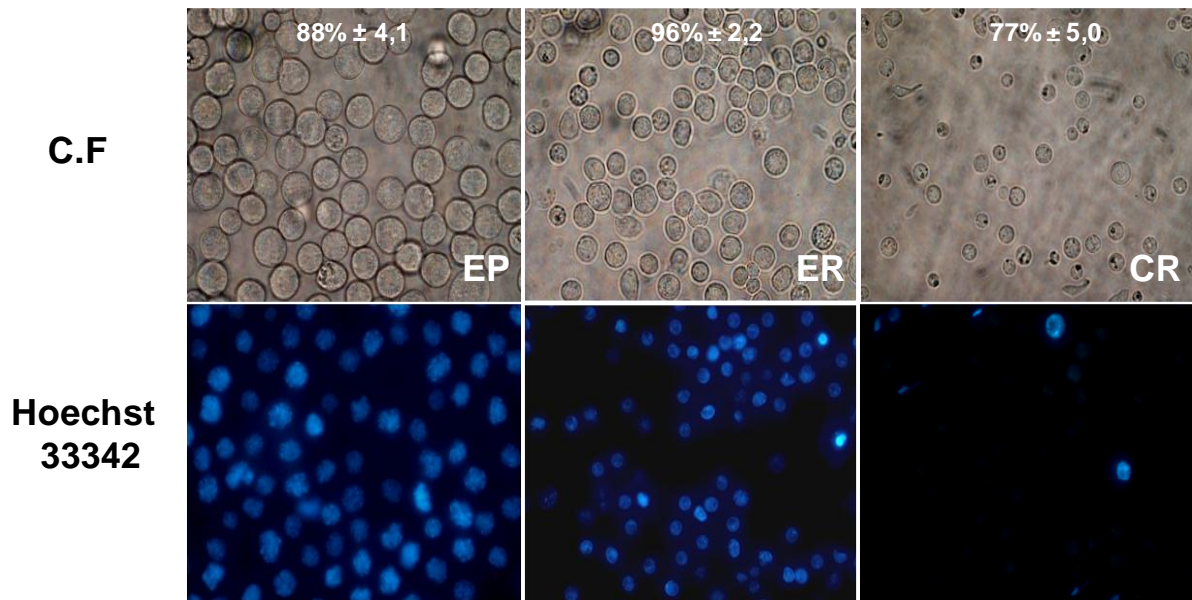
**Fig. 8.** Cambios con el desarrollo postnatal en la composición ácidos grasos de triacylgliceroles, triglicéridos con una unión éter y ésteres de colesterol testiculares. En los tres lípidos neutros, como en los GPL (Figs. 7 y 8), el cambio dominante fue la acumulación de 22:5n-6. Los VLCPUFA de 24 carbonos y los VLCPUFA de más de 24 carbonos (VLCPUFA > C<sub>24</sub>) también se incrementaron, éstos últimos especialmente en los ésteres de colesterol.



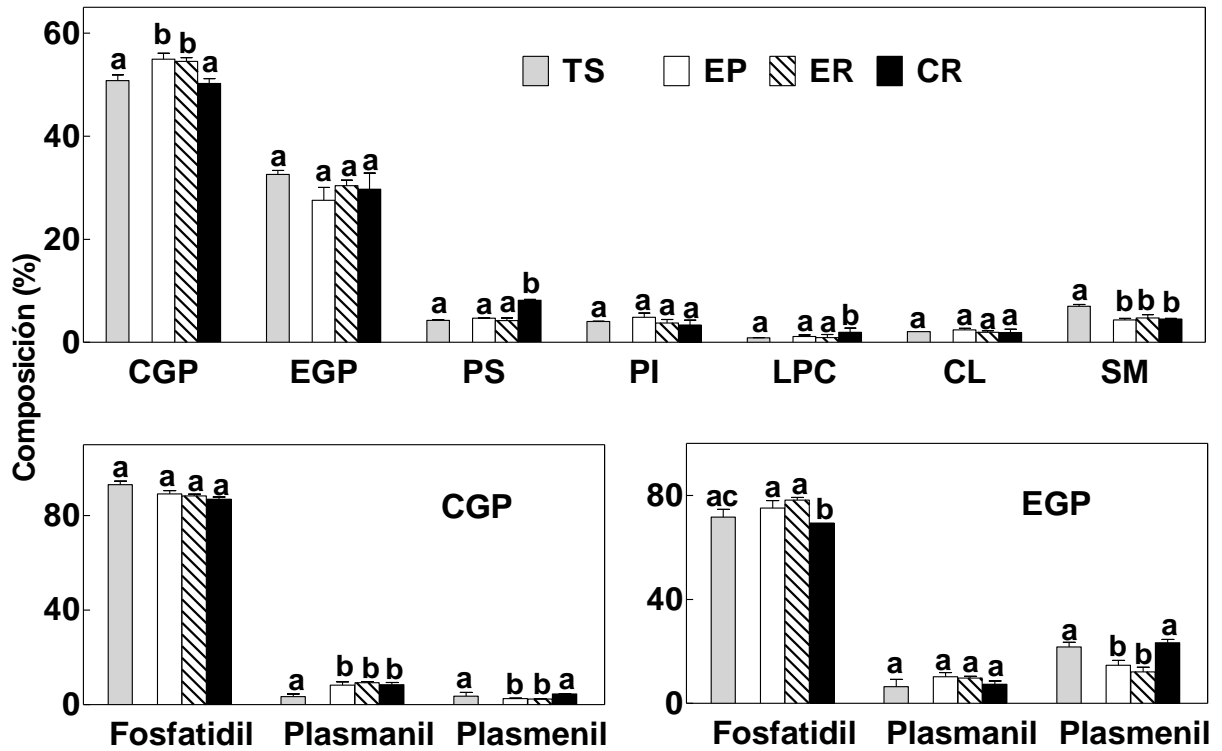
**Fig. 9.** Cambios permanentes en la composición de ácidos grasos de glicerofosfolípidos de colina y de etanolamina que resultan de la presencia en los túbulos seminíferos de las células de la línea germinal totalmente diferenciadas. Los datos de animales prepúberes corresponden a P14 y los de adultos a P120.



**Fig. 10.** Cambios permanentes en la composición de ácidos grasos de lípidos neutros que resultan de la presencia en los túbulos seminíferos de las células de la línea germinal totalmente diferenciadas. Los datos de animales prepúberes corresponden a P14 y los de adultos a P120. En estos lípidos, como en los GPL, hubo una virtual desaparición del 22:6n-3, y un notable el enriquecimiento en 22:5n-6, así como en VLCPUFA, con la madurez sexual.



**Fig. 11.** Observación microscópica de las fracciones enriquecidas en las células germinales en estudio. Se muestran fracciones correspondientes a espermatocitos en paquiteno (EP) y a espermátidas redondas (ER), así como una fracción de cuerpos residuales (CR), que se incluye en el estudio por comparación. La marcación con Hoechst 33342 permite identificar a las células a través del sus núcleos. Los CR no se marcan con éste por carecer de núcleos. Los números muestran el porcentaje de enriquecimiento de cada una de las fracciones. C.F, contraste de fase.



**Fig. 12.** Clases y subclases de fosfolípidos en células germinales. A partir de túbulos seminíferos (TS), se obtuvieron espermatoцитos en paquiteno (EP), espermátidas redondas (ER), y cuerpos residuales (CR). De cada uno de éstos se extrajeron los lípidos. Los fosfolípidos se separaron en clases, los CGP y EGP en subclases, y se cuantificaron por medición de fósforo. Las tres subclases se indican abreviadamente como fosfatidil, plasmanil y plasmenil. Es de señalar que los EGP fueron proporcionalmente más ricos en plasmenil que los CGP en los dos tipos celulares en estudio. La *proporción* (%) de fosfatidilserina (PS) y la de los dos plasmalógenos fue significativamente mayor en los CR que en las células. Las diferentes letras de a-c denotan diferencias significativas entre las muestras con  $p < 0.05$ .

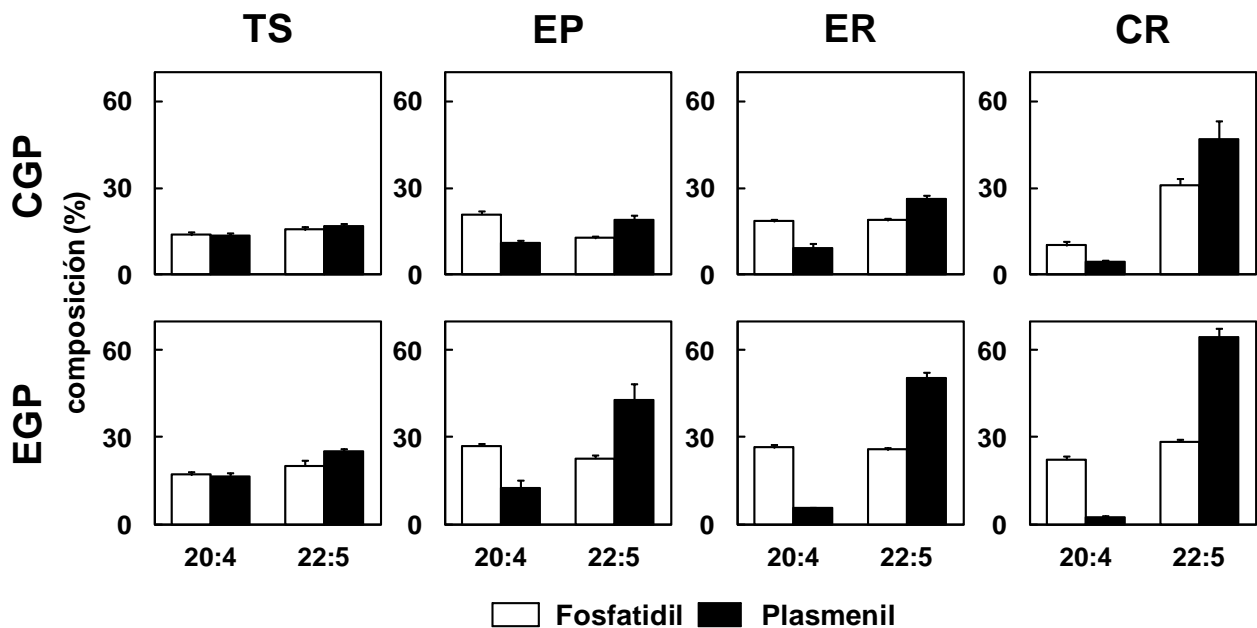
**Tabla 1**  
**Composición de ácidos grasos de GPL de colina en células germinales y cuerpos residuales**

	<b>Espermatocitos en paquitenio</b>	<b>Espermáticas Redondas</b>	<b>Cuerpos Residuales</b>
<b>Ácido graso</b>	<i>% del total de ácidos grasos</i>		
<i>Glicerofosfolípidos de colina totales</i>			
<b>16:0</b>	39,54 ± 0,93	38,40 ± 0,83	41,13 ± 0,91
<b>16:1</b>	1,43 ± 0,09	1,27 ± 0,11	1,11 ± 0,15
<b>18:0</b>	1,28 ± 0,04	1,37 ± 0,05	1,01 ± 0,06
<b>18:1</b>	17,51 ± 0,68	12,13 ± 0,32	5,46 ± 0,23
<b>18:2</b>	3,66 ± 0,11	3,79 ± 0,28	2,35 ± 0,09
<b>20:3n-6</b>	2,00 ± 0,05	2,68 ± 0,07	2,36 ± 0,05
<b>20:4n-6</b>	20,01 ± 0,97	17,07 ± 0,60	8,19 ± 0,11
<b>22:4n-9</b>	0,11 ± 0,00	0,13 ± 0,01	0,11 ± 0,01
<b>22:4n-6</b>	0,50 ± 0,01	0,60 ± 0,03	0,97 ± 0,04
<b>22:5n-6</b>	10,45 ± 0,46	17,63 ± 0,73	32,06 ± 1,37
<b>22:6n-3</b>	0,40 ± 0,02	1,16 ± 0,33	2,52 ± 0,07
<b>24:4</b>	1,05 ± 0,01	1,06 ± 0,01	0,57 ± 0,02
<b>24:5</b>	0,33 ± 0,03	0,54 ± 0,02	0,90 ± 0,04
<b>SFA</b>	41,17 ± 0,98	40,16 ± 0,87	42,51 ± 0,97
<b>MFA</b>	19,05 ± 0,71	13,49 ± 0,36	6,63 ± 0,40
<b>DFA</b>	3,91 ± 0,11	4,11 ± 0,29	2,58 ± 0,12
<b>PUFA</b>	33,70 ± 1,41	38,76 ± 1,03	44,11 ± 1,46
<b>VLCPUFA</b>	2,18 ± 0,18	3,48 ± 0,33	4,17 ± 0,09
<i>Subclase fosfatidilcolina</i>			
<b>16:0</b>	30,81 ± 2,73	28,80 ± 1,23	33,53 ± 2,61
<b>16:1</b>	1,98 ± 0,27	1,64 ± 0,14	1,52 ± 0,14
<b>18:0</b>	1,57 ± 0,29	1,66 ± 0,16	1,22 ± 0,13
<b>18:1</b>	18,27 ± 0,30	13,64 ± 0,52	6,80 ± 1,15
<b>18:2</b>	4,88 ± 0,64	4,92 ± 0,45	3,22 ± 0,52
<b>20:3n-6</b>	2,79 ± 0,46	3,63 ± 0,34	3,23 ± 0,55
<b>20:4n-6</b>	21,01 ± 1,04	18,53 ± 0,66	10,30 ± 1,24
<b>22:4n-9</b>	0,20 ± 0,04	0,21 ± 0,02	0,21 ± 0,03
<b>22:4n-6</b>	0,66 ± 0,12	0,83 ± 0,05	1,28 ± 0,17
<b>22:5n-6</b>	12,70 ± 0,55	19,04 ± 0,52	31,05 ± 2,16
<b>22:6n-3</b>	0,60 ± 0,12	1,64 ± 0,39	3,32 ± 0,66
<b>24:4</b>	1,44 ± 0,26	1,46 ± 0,09	0,78 ± 0,11
<b>24:5</b>	0,52 ± 0,14	0,87 ± 0,06	1,29 ± 0,17
<b>SFA</b>	32,85 ± 2,26	30,70 ± 1,08	35,07 ± 2,59
<b>MFA</b>	20,52 ± 0,54	15,71 ± 0,65	8,82 ± 1,09
<b>DFA</b>	5,28 ± 0,71	5,39 ± 0,48	3,62 ± 0,57
<b>PUFA</b>	38,80 ± 0,95	44,72 ± 0,28	50,11 ± 0,79
<b>VLCPUFA</b>	2,54 ± 0,48	3,48 ± 0,24	2,38 ± 0,33
<i>Subclase plasménicolina</i>			
<b>16:0</b>	26,09 ± 1,73	26,17 ± 1,18	18,57 ± 3,12
<b>16:1</b>	3,91 ± 1,07	2,30 ± 1,16	1,95 ± 1,17
<b>18:0</b>	5,97 ± 1,51	6,00 ± 1,18	5,50 ± 2,03
<b>18:1</b>	19,54 ± 0,87	14,89 ± 1,05	6,07 ± 0,90
<b>18:2</b>	2,27 ± 0,09	2,11 ± 0,13	1,45 ± 0,47
<b>20:3n-6</b>	0,85 ± 0,04	0,88 ± 0,13	0,41 ± 0,36
<b>20:4n-6</b>	11,21 ± 0,75	9,08 ± 1,67	4,40 ± 0,68
<b>22:4n-9</b>	0,52 ± 0,13	0,44 ± 0,22	0,57 ± 0,23
<b>22:4n-6</b>	2,40 ± 0,34	1,99 ± 0,41	1,78 ± 0,27
<b>22:5n-6</b>	19,08 ± 1,72	26,47 ± 0,96	46,93 ± 6,26
<b>22:6n-3</b>	1,21 ± 0,11	3,02 ± 0,39	7,33 ± 0,60
<b>24:4</b>	2,01 ± 0,27	1,90 ± 0,22	1,16 ± 0,30
<b>24:5</b>	0,63 ± 0,12	0,43 ± 0,06	0,40 ± 0,13
<b>SFA</b>	33,03 ± 2,60	32,66 ± 0,42	24,40 ± 5,09
<b>MFA</b>	24,87 ± 0,97	18,49 ± 1,00	8,51 ± 2,02
<b>DFA</b>	2,34 ± 0,07	2,20 ± 0,24	1,45 ± 0,47
<b>PUFA</b>	36,37 ± 2,83	43,18 ± 1,14	63,24 ± 7,01
<b>VLCPUFA</b>	3,39 ± 0,56	3,48 ± 0,43	2,40 ± 0,27



**Tabla 2**  
**Composición de ácidos grasos de GPL de etanolamina en células germinales y cuerpos residuales**

	Espermatocitos en paquiteno	Espermátidas Redondas	Cuerpos Residuales
<b>Ácido graso</b>	<i>% del total de ácidos grasos</i>		
<i>Glicerofosfolípidos de etanolamina totales</i>			
<b>16:0</b>	21,86 ± 1,49	24,42 ± 1,17	19,98 ± 1,23
<b>16:1</b>	0,69 ± 0,08	0,52 ± 0,07	0,19 ± 0,23
<b>18:0</b>	7,84 ± 0,40	6,69 ± 0,39	5,74 ± 0,20
<b>18:1</b>	8,27 ± 0,16	5,25 ± 0,14	3,81 ± 0,09
<b>18:2</b>	1,18 ± 0,09	0,91 ± 0,12	0,49 ± 0,04
<b>20:3n-6</b>	0,61 ± 0,01	0,46 ± 0,02	0,27 ± 0,04
<b>20:4n-6</b>	27,56 ± 1,28	26,29 ± 0,16	20,43 ± 0,70
<b>22:4n-9</b>	0,07 ± 0,07	0,06 ± 0,05	0,00 ± 0,00
<b>22:4n-6</b>	1,67 ± 0,05	1,40 ± 0,04	1,16 ± 0,08
<b>22:5n-6</b>	26,72 ± 0,32	30,28 ± 1,19	42,09 ± 1,43
<b>22:6n-3</b>	1,26 ± 0,16	2,13 ± 0,20	4,25 ± 0,21
<b>24:4</b>	0,72 ± 0,07	0,39 ± 0,09	0,18 ± 0,17
<b>24:5</b>	0,36 ± 0,10	0,23 ± 0,05	0,30 ± 0,03
<b>SFA</b>	29,90 ± 1,39	31,26 ± 1,53	25,87 ± 1,21
<b>MFA</b>	9,06 ± 0,17	5,82 ± 0,05	4,05 ± 0,39
<b>DFA</b>	1,22 ± 0,12	0,97 ± 0,07	0,51 ± 0,07
<b>PUFA</b>	57,33 ± 1,65	58,95 ± 1,60	64,35 ± 1,49
<b>VLCPUFA</b>	2,50 ± 0,40	3,00 ± 0,12	5,22 ± 0,09
<i>Subclase fosfatidiletanolamina</i>			
<b>16:0</b>	26,67 ± 1,66	27,84 ± 0,24	30,69 ± 1,08
<b>16:1</b>	1,01 ± 0,06	0,76 ± 0,04	1,03 ± 0,44
<b>18:0</b>	7,95 ± 0,26	7,15 ± 0,41	6,44 ± 0,53
<b>18:1</b>	8,06 ± 0,76	5,30 ± 0,19	4,71 ± 0,09
<b>18:2</b>	1,26 ± 0,22	1,01 ± 0,11	0,69 ± 0,03
<b>20:3n-6</b>	0,66 ± 0,03	0,54 ± 0,03	0,39 ± 0,04
<b>20:4n-6</b>	27,03 ± 0,77	26,51 ± 0,74	22,20 ± 1,13
<b>22:4n-9</b>	0,06 ± 0,00	0,08 ± 0,02	0,07 ± 0,01
<b>22:4n-6</b>	1,27 ± 0,14	1,14 ± 0,06	0,87 ± 0,06
<b>22:5n-6</b>	22,67 ± 1,05	25,62 ± 0,65	28,39 ± 0,95
<b>22:6n-3</b>	1,27 ± 0,19	2,31 ± 0,42	2,69 ± 0,19
<b>24:4</b>	0,58 ± 0,08	0,37 ± 0,04	0,24 ± 0,01
<b>24:5</b>	0,22 ± 0,04	0,22 ± 0,04	0,28 ± 0,02
<b>SFA</b>	35,10 ± 1,43	35,41 ± 0,56	37,64 ± 0,74
<b>MFA</b>	9,30 ± 0,70	6,21 ± 0,19	5,98 ± 0,46
<b>DFA</b>	1,32 ± 0,21	1,08 ± 0,11	0,81 ± 0,03
<b>PUFA</b>	53,41 ± 0,62	56,65 ± 0,60	55,00 ± 0,67
<b>VLCPUFA</b>	0,87 ± 0,13	0,65 ± 0,08	0,57 ± 0,04
<i>Subclase plasmeniletanolamina</i>			
<b>16:0</b>	9,61 ± 1,94	10,34 ± 3,47	7,12 ± 0,90
<b>16:1</b>	2,89 ± 1,16	3,40 ± 1,21	2,40 ± 0,99
<b>18:0</b>	3,92 ± 0,73	4,13 ± 1,20	2,72 ± 0,92
<b>18:1</b>	11,16 ± 0,85	9,18 ± 0,52	3,94 ± 1,19
<b>18:2</b>	1,57 ± 0,16	1,92 ± 0,30	0,71 ± 0,23
<b>20:3n-6</b>	0,78 ± 0,01	0,67 ± 0,09	0,37 ± 0,14
<b>20:4n-6</b>	12,48 ± 2,63	5,59 ± 0,29	2,43 ± 0,52
<b>22:4n-9</b>	0,31 ± 0,27	0,19 ± 0,22	0,02 ± 0,04
<b>22:4n-6</b>	5,00 ± 0,40	3,73 ± 0,40	2,13 ± 0,13
<b>22:5n-6</b>	42,86 ± 5,37	50,16 ± 2,15	64,43 ± 3,06
<b>22:6n-3</b>	1,92 ± 0,08	4,71 ± 0,70	9,50 ± 1,21
<b>24:4</b>	1,98 ± 0,14	1,21 ± 0,06	0,68 ± 0,13
<b>24:5</b>	0,00 ± 0,00	0,20 ± 0,35	0,13 ± 0,12
<b>SFA</b>	14,68 ± 2,86	15,77 ± 4,10	10,79 ± 2,05
<b>MFA</b>	14,68 ± 2,03	13,30 ± 1,61	6,79 ± 2,23
<b>DFA</b>	1,80 ± 0,19	2,14 ± 0,33	0,77 ± 0,27
<b>PUFA</b>	64,43 ± 5,17	66,07 ± 2,54	79,70 ± 4,64
<b>VLCPUFA</b>	4,42 ± 0,14	2,72 ± 0,16	1,95 ± 0,37



**Fig. 13.** Comparación entre las proporciones de 20:4n-6 y 22:5n-6 en subclases de glicerofosfolípidos de colina (CGP) y de etanolamina (EGP) en túbulos seminíferos (TS), espermatoцитos en paquiteno (EP), espermátidas redondas (ER) y cuerpos residuales (CR). Los datos se extrajeron de las Tablas 2 y 3 para facilitar la comparación. En las células germinales los plasmalógenos de ambos lípidos fueron más ricos en 22:5n-6 que los correspondientes lípidos de los túbulos seminíferos. La proporción de 22:5n-6 aumentó con la diferenciación celular, y fue máxima en los cuerpos residuales.

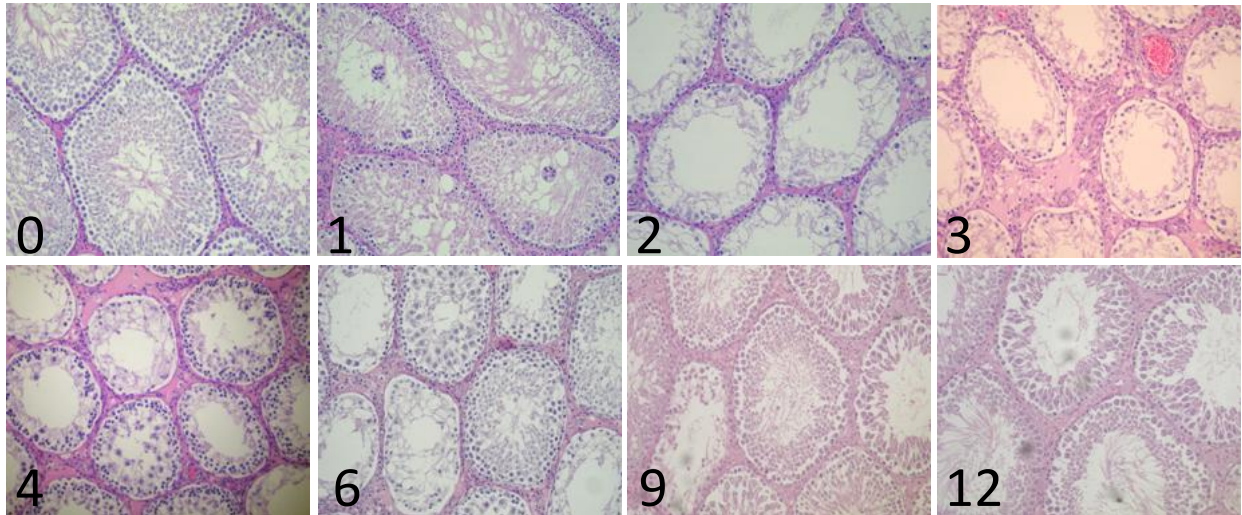
**Tabla 3**  
**Lípidos neutros en células germinales y cuerpos residuales**

	Túbulos seminíferos	Espermatocitos en paquiteno	Espermátidas Redondas	Cuerpos Residuales
<i>µg /100 µg de fósforo lipídico</i>				
Ésteres de colesterol	14 ± 2	8 ± 2	4 ± 2	4 ± 2
Triacilgliceroles	234 ± 10	122 ± 12	148 ± 14	390 ± 20
Triglicéridos con una unión éter	26 ± 2	14 ± 2	10 ± 0	8 ± 2

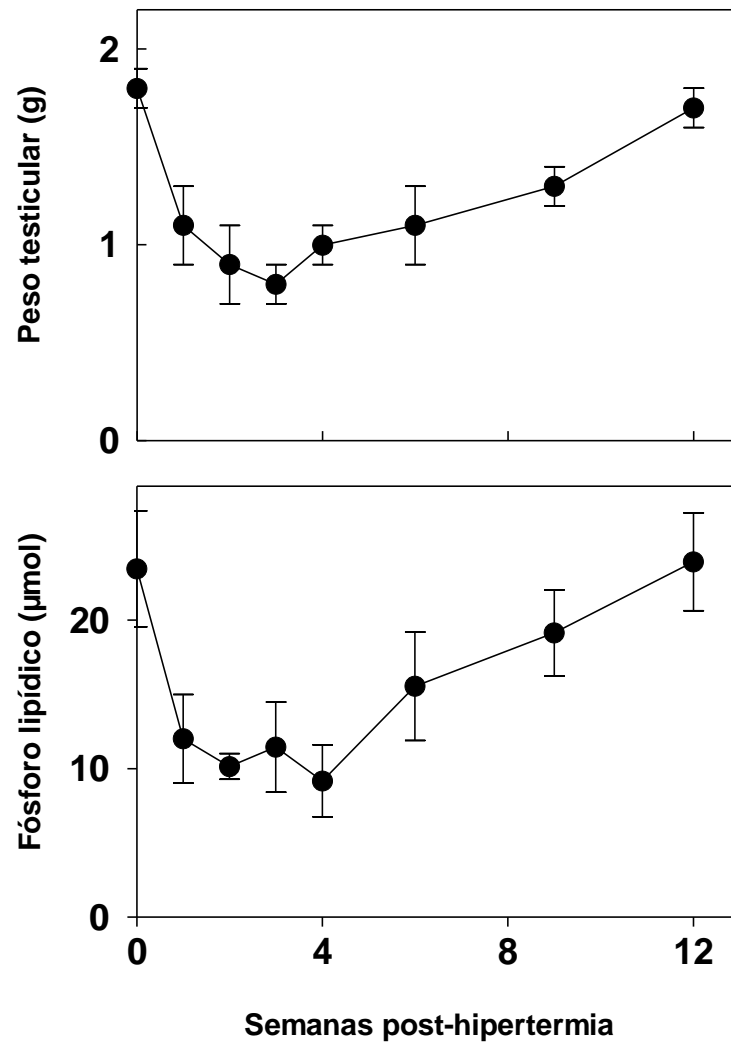
Datos obtenidos en colaboración con el Dr. Oresti. Los lípidos se cuantificaron luego de la medición del contenido de sus ácidos grasos, al cual se añadió el peso correspondiente al colesterol y al glicerol. Los contenidos de los tres lípidos neutros fueron significativamente menores en las células que en los túbulos seminíferos,  $p < 0,05$ .

Tabla 4. Composición en ácidos grasos de lípidos neutros de células germinales y cuerpos residuales

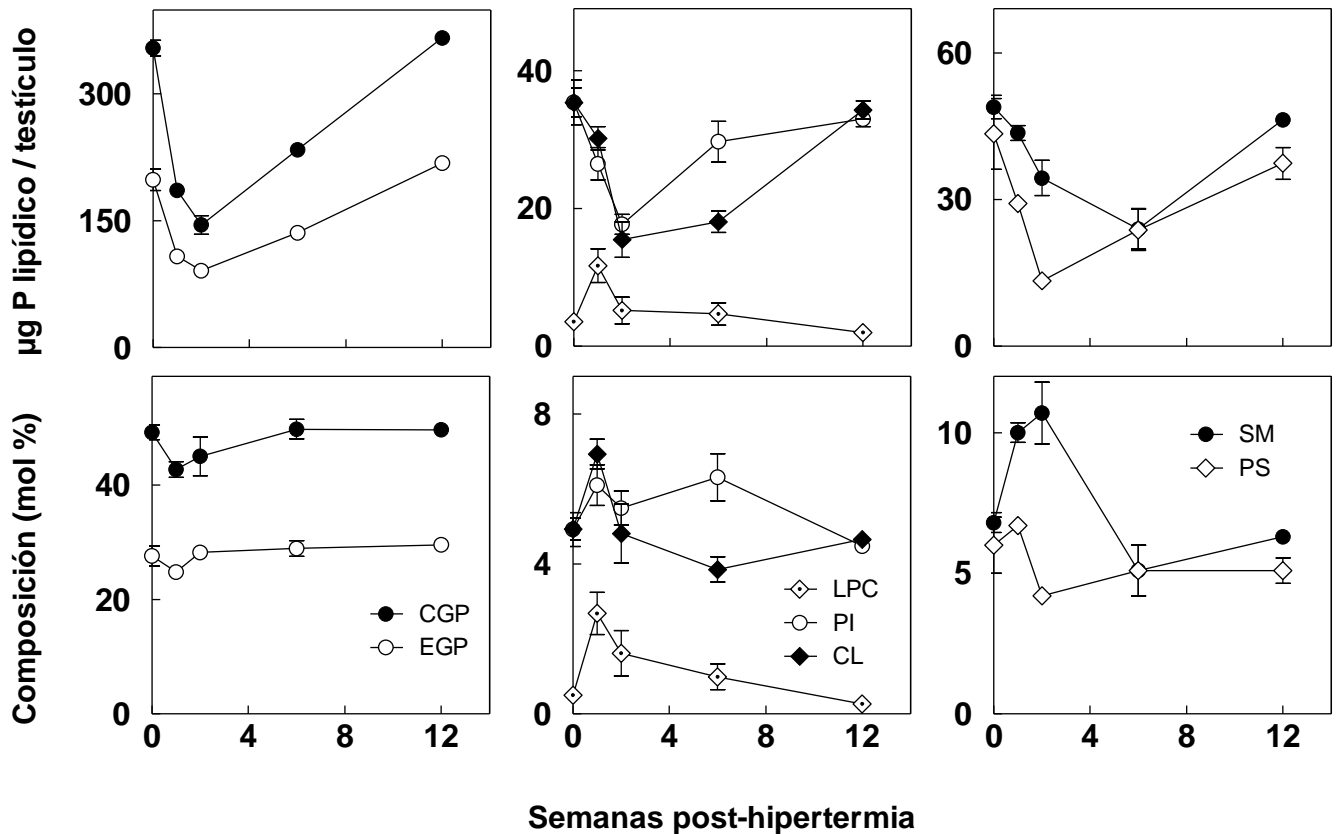
	Espermatocitos en paquiteno	Espermátidas Redondas	Cuerpos Residuales
<b>Ácido graso</b>			
<i>Triacilgliceroles</i>			
<b>16:0</b>	29,75 ± 0,22	27,23 ± 2,24	24,07 ± 1,49
<b>16:1</b>	3,27 ± 0,56	1,61 ± 0,22	1,38 ± 0,08
<b>18:0</b>	2,97 ± 0,55	1,74 ± 0,28	2,00 ± 0,16
<b>18:1</b>	11,36 ± 0,35	12,96 ± 0,71	13,20 ± 0,56
<b>18:2n-6</b>	2,56 ± 0,55	3,31 ± 0,06	3,28 ± 0,22
<b>18:3n-6</b>	0,26 ± 0,08	0,14 ± 0,04	0,12 ± 0,00
<b>20:2n-6</b>	0,58 ± 0,04	0,58 ± 0,01	0,56 ± 0,05
<b>20:3n-6</b>	1,37 ± 0,12	1,93 ± 0,47	2,41 ± 0,20
<b>20:4n-6</b>	5,02 ± 0,89	4,17 ± 0,57	4,68 ± 0,25
<b>20:5n-3</b>	0,16 ± 0,11	0,13 ± 0,04	0,08 ± 0,05
<b>22:3n-6</b>	0,45 ± 0,04	0,60 ± 0,13	0,75 ± 0,08
<b>22:3n-3</b>	0,27 ± 0,07	0,28 ± 0,03	0,32 ± 0,05
<b>22:4n-6</b>	3,14 ± 0,70	4,51 ± 0,20	6,51 ± 0,29
<b>22:5n-6</b>	20,15 ± 0,74	25,97 ± 0,88	26,60 ± 1,37
<b>22:5n-3</b>	0,45 ± 0,04	0,44 ± 0,04	0,41 ± 0,02
<b>22:6n-3</b>	0,77 ± 0,11	0,88 ± 0,14	1,07 ± 0,13
<b>24:4</b>	3,50 ± 0,18	2,69 ± 0,29	2,30 ± 0,06
<b>24:5</b>	4,66 ± 0,27	5,56 ± 0,16	6,63 ± 0,37
<b>25:4n-6</b>	0,15 ± 0,05	0,23 ± 0,03	0,27 ± 0,05
<b>25:5n-6</b>	1,62 ± 0,46	0,52 ± 0,19	0,29 ± 0,01
<b>26:4n-6</b>	0,80 ± 0,16	0,43 ± 0,10	0,33 ± 0,01
<b>26:5n-6</b>	0,21 ± 0,02	0,19 ± 0,04	0,15 ± 0,02
<b>27:4n-6</b>	0,13 ± 0,03	0,14 ± 0,01	0,15 ± 0,02
<b>28:4n-6</b>	0,28 ± 0,02	0,25 ± 0,05	0,19 ± 0,02
<b>28:5n-6</b>	1,57 ± 0,12	1,02 ± 0,31	0,69 ± 0,07
<b>29:5n-6</b>	0,24 ± 0,03	0,24 ± 0,04	0,19 ± 0,01
<b>30:5n-6</b>	1,29 ± 0,11	0,90 ± 0,31	0,52 ± 0,02
<i>Triglicéridos con una unión éter</i>			
<b>16:0</b>	25,14 ± 1,92	28,02 ± 2,90	25,05 ± 1,66
<b>16:1</b>	3,06 ± 0,45	3,09 ± 0,54	4,19 ± 0,54
<b>18:0</b>	2,74 ± 0,39	3,06 ± 0,13	4,59 ± 0,18
<b>18:1</b>	8,49 ± 2,09	6,73 ± 0,93	7,07 ± 0,43
<b>18:2n-6</b>	3,72 ± 2,20	1,88 ± 0,35	2,00 ± 0,27
<b>18:3n-6</b>	0,26 ± 0,07	0,18 ± 0,04	0,40 ± 0,14
<b>20:2n-6</b>	0,61 ± 0,22	0,48 ± 0,04	0,42 ± 0,14
<b>20:3n-6</b>	0,83 ± 0,06	0,81 ± 0,02	1,19 ± 0,19
<b>20:4n-6</b>	3,63 ± 0,47	4,89 ± 0,39	3,97 ± 0,20
<b>20:5n-3</b>	0,35 ± 0,10	0,40 ± 0,09	0,62 ± 0,17
<b>22:3n-6</b>	0,29 ± 0,14	0,24 ± 0,10	0,30 ± 0,07
<b>22:3n-3</b>	0,44 ± 0,03	0,46 ± 0,09	0,69 ± 0,29
<b>22:4n-6</b>	2,45 ± 0,18	2,29 ± 0,15	2,75 ± 0,19
<b>22:5n-6</b>	16,34 ± 1,51	22,55 ± 0,96	28,10 ± 1,74
<b>22:5n-3</b>	0,79 ± 0,01	0,63 ± 0,06	0,53 ± 0,04
<b>22:6n-3</b>	1,18 ± 0,04	1,25 ± 0,23	1,46 ± 0,38
<b>24:4</b>	9,02 ± 1,07	8,23 ± 0,88	2,64 ± 0,24
<b>24:5</b>	6,01 ± 0,95	2,99 ± 0,22	3,20 ± 0,21
<b>25:4n-6</b>	0,20 ± 0,18	0,17 ± 0,04	0,07 ± 0,13
<b>25:5n-6</b>	4,97 ± 0,56	3,05 ± 0,29	1,12 ± 0,14
<b>26:4n-6</b>	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,37 ± 0,33
<b>26:5n-6</b>	0,27 ± 0,04	0,27 ± 0,02	0,16 ± 0,14
<b>27:4n-6</b>	0,16 ± 0,04	0,15 ± 0,01	0,15 ± 0,13
<b>28:4n-6</b>	0,47 ± 0,06	0,45 ± 0,04	0,29 ± 0,15
<b>28:5n-6</b>	3,58 ± 0,37	2,81 ± 0,26	1,73 ± 0,16
<b>29:5n-6</b>	0,25 ± 0,10	0,36 ± 0,02	0,30 ± 0,04
<b>30:5n-6</b>	2,18 ± 0,15	2,51 ± 0,27	1,85 ± 0,03
<i>Ésteres de colesterol</i>			
<b>16:0</b>	12,10 ± 0,57	25,87 ± 2,33	24,80 ± 1,92
<b>16:1</b>	13,91 ± 1,14	12,41 ± 2,47	18,66 ± 5,78
<b>18:0</b>	3,86 ± 0,53	8,70 ± 1,32	6,50 ± 2,14
<b>18:1</b>	9,50 ± 1,82	11,69 ± 2,20	12,72 ± 0,73
<b>18:2n-6</b>	1,73 ± 0,20	2,22 ± 0,77	2,58 ± 0,56
<b>18:3n-6</b>	0,72 ± 0,10	1,12 ± 0,21	0,94 ± 0,21
<b>20:2n-6</b>	0,67 ± 0,16	0,74 ± 0,13	0,66 ± 0,00
<b>20:3n-6</b>	1,00 ± 0,15	1,15 ± 0,23	1,25 ± 0,60
<b>20:4n-6</b>	1,37 ± 0,25	1,46 ± 0,22	1,54 ± 0,63
<b>20:5n-3</b>	0,96 ± 0,30	1,53 ± 0,37	2,06 ± 0,12
<b>22:3n-6</b>	0,58 ± 0,18	0,76 ± 0,19	1,19 ± 0,03
<b>22:3n-3</b>	1,18 ± 0,15	1,69 ± 0,21	1,92 ± 0,39
<b>22:4n-6</b>	0,89 ± 0,13	0,98 ± 0,10	1,24 ± 0,20
<b>22:5n-6</b>	11,97 ± 0,79	8,43 ± 1,43	9,03 ± 1,29
<b>22:5n-3</b>	0,93 ± 0,23	0,76 ± 0,11	0,40 ± 0,40
<b>22:6n-3</b>	2,03 ± 0,37	1,77 ± 0,32	1,24 ± 0,57
<b>24:4</b>	3,14 ± 0,33	2,77 ± 0,58	1,23 ± 0,35
<b>24:5</b>	4,31 ± 0,26	1,67 ± 0,33	1,19 ± 0,20
<b>25:4n-6</b>	0,21 ± 0,04	0,05 ± 0,09	0,00 ± 0,00
<b>25:5n-6</b>	0,71 ± 0,20	0,93 ± 0,25	0,33 ± 0,01
<b>26:4n-6</b>	4,43 ± 0,08	1,46 ± 0,37	0,67 ± 0,06
<b>26:5n-6</b>	0,38 ± 0,17	0,28 ± 0,13	0,00 ± 0,00
<b>27:4n-6</b>	0,35 ± 0,06	0,19 ± 0,06	0,00 ± 0,00
<b>28:4n-6</b>	0,23 ± 0,12	0,32 ± 0,11	0,07 ± 0,10
<b>28:5n-6</b>	13,35 ± 0,14	3,51 ± 0,99	1,61 ± 0,25
<b>29:5n-6</b>	0,11 ± 0,14	0,37 ± 0,09	0,05 ± 0,07
<b>30:5n-6</b>	2,58 ± 0,27	1,43 ± 0,25	0,59 ± 0,06



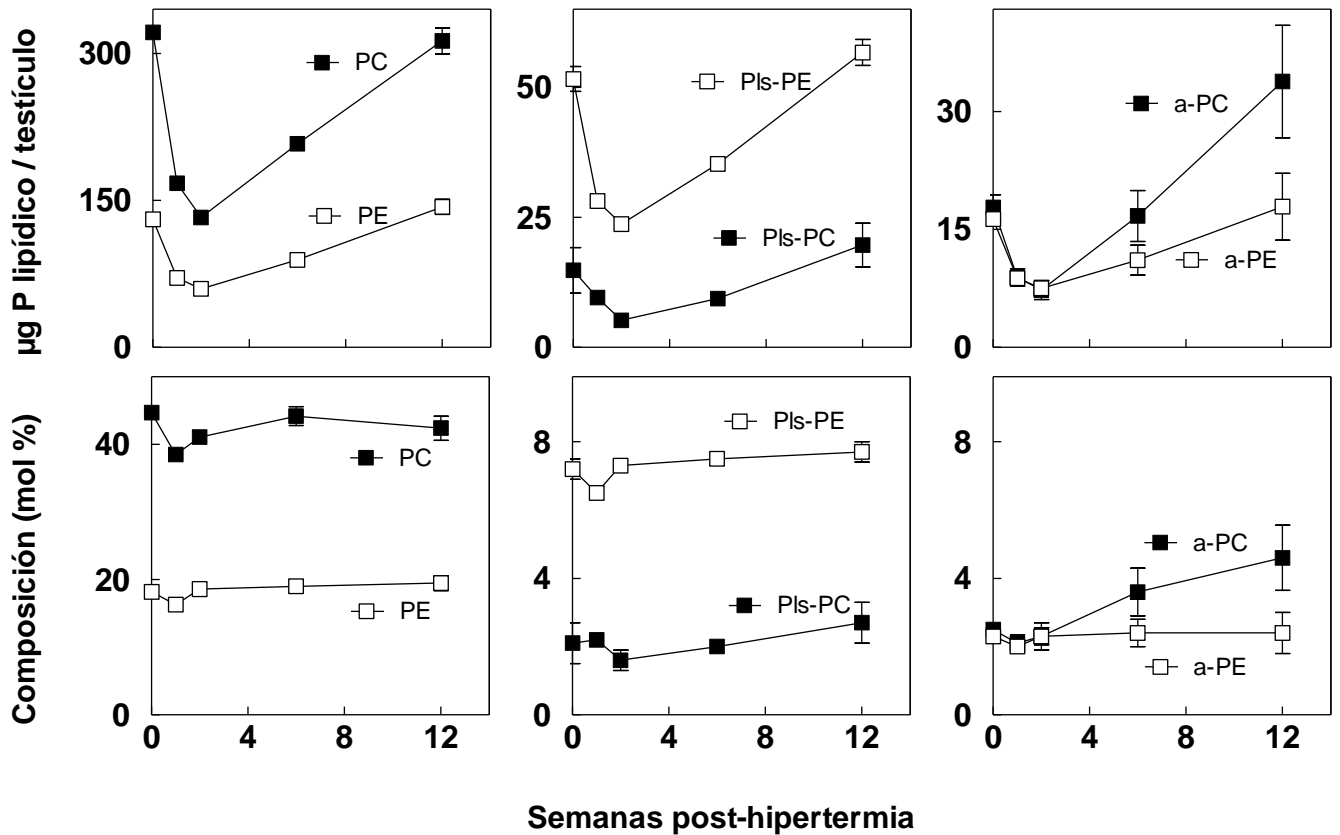
**Fig. 14.** Cambios en la histología testicular como consecuencia de la exposición a la hipertermia. Los animales se expusieron en su parte caudal durante 15 minutos a 43 °C una vez por día, durante 5 días sucesivos. Se muestran fotomicrografías de secciones del tejido coloreadas con hematoxilina-eosina (X200) obtenidas a diferentes tiempos (los números 1, 2, 3, 4, 6, 9 y 12 indican las semanas) después de la última de estas exposiciones. Es notable la disminución progresiva del diámetro de los túbulos seminíferos y del espesor del epitelio germinal presente en su interior hasta la semana 4, en comparación con el control (0), así como la repoblación celular gradual, que ya se había iniciado a la semana 4, con recuperación casi total 12 semanas después de la última exposición a la temperatura. A la semana 1 post-hipertermia, se observan células germinales desprendidas juntas, formando simplastos.



**Fig. 15.** Consecuencias de la hipertermia moderada en función del tiempo sobre el peso y sobre el contenido de fosfolípidos testiculares. Los resultados se expresan en gramos y en  $\mu$ moles de fósforo por testículo, respectivamente.

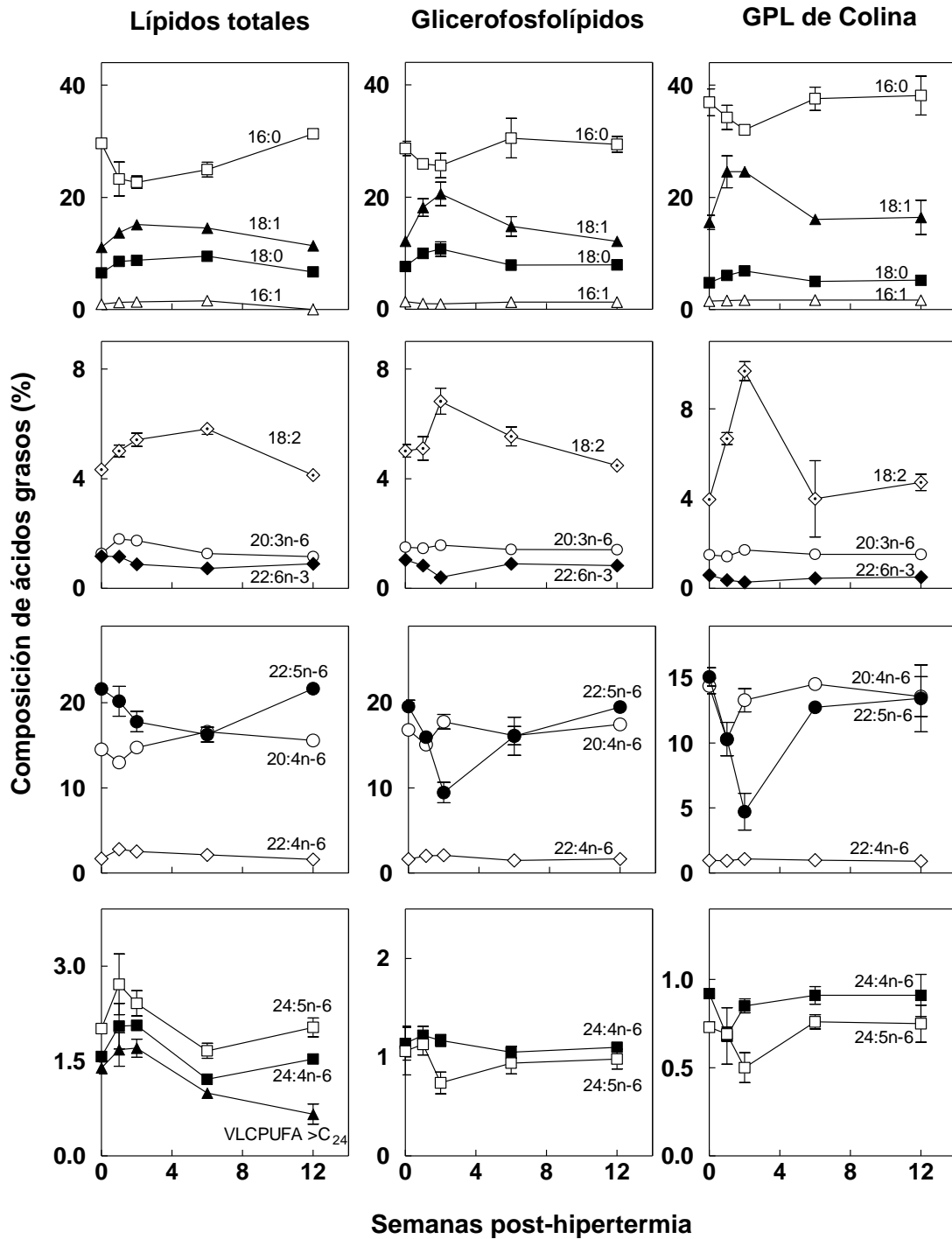


**Fig. 16.** Cambios en función del tiempo transcurrido después de las exposiciones repetidas a la hipertermia en el contenido (paneles superiores) y en las proporciones (inferiores) de los principales fosfolípidos testiculares. CGP y EGP, glicerofosfolípidos de colina y de etanolamina, respectivamente; LPC, liso-PC; PI, fosfatidilinositol; CL, cardiolipina; PS fosfatidilserina; SM, esfingomielina. Los niveles de todos los fosfolípidos (en especial la CGP y la EGP) disminuyeron mucho durante las primeras dos semanas, con la notable excepción de la LPC, cuyo contenido aumentó a la semana 1 post-hipertermia. En la composición (%), los lípidos cuyo porcentaje aumentó a la semana 2, son aquellos cuyo contenido disminuyó más lentamente, como fue el caso de la SM.

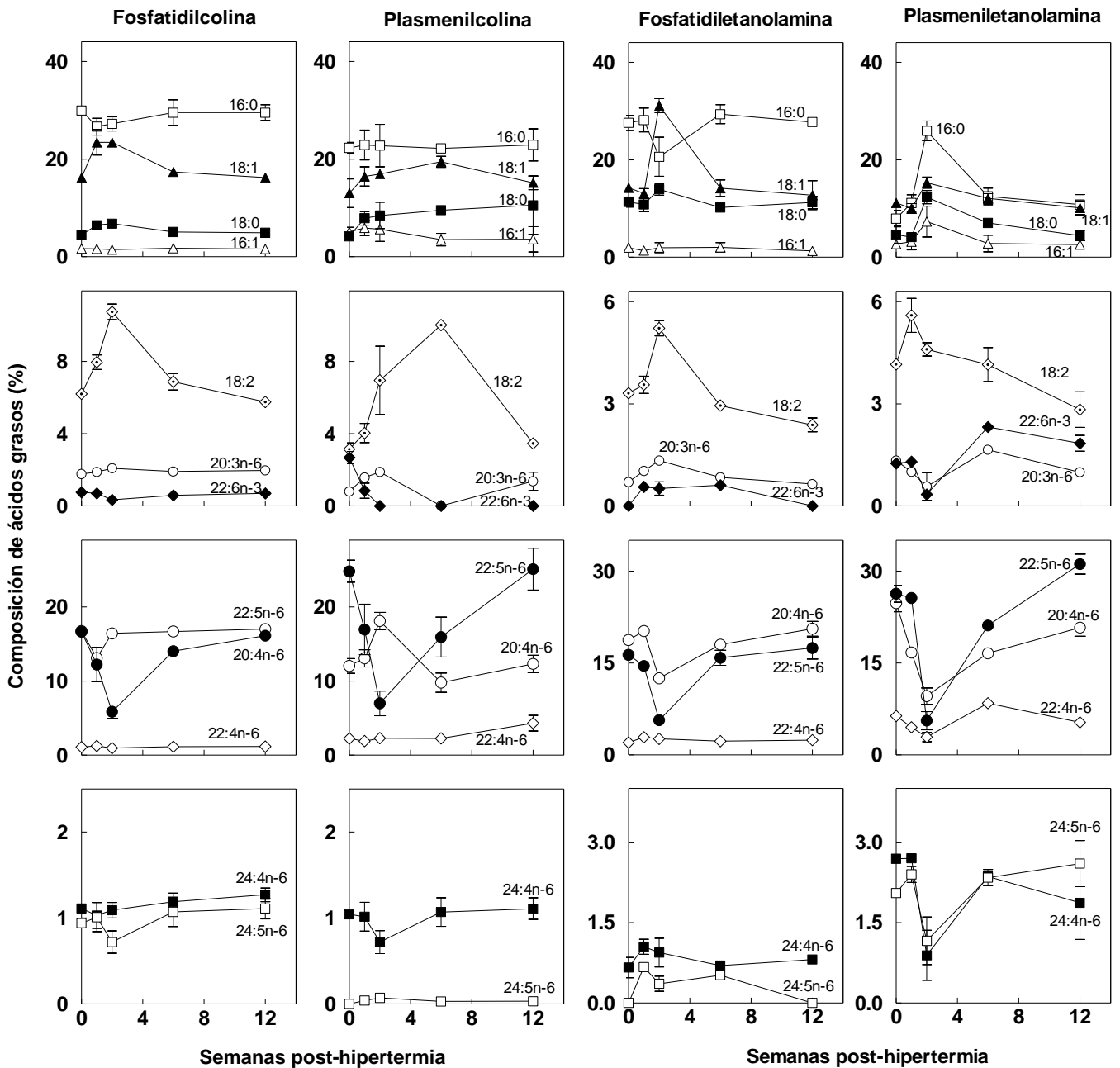


**Fig. 17.** Cambios en función del tiempo transcurrido después de las exposiciones repetidas a la hipertermia en el contenido (paneles superiores) y en las proporciones (inferiores) de las tres subclases de glicerofosfolípidos de colina y de etanolamina testiculares. PC y PE, fosfatidil-colina y -etanolamina; Pls-PC y Pls-PE, plasménil-colina y -etanolamina; a-PC y a-PE, plasmanil-colina y -etanolamina, respectivamente. Luego de disminuir, los niveles de las distintas subclases tendieron a alcanzar valores similares a los controles con el transcurso de las semanas.

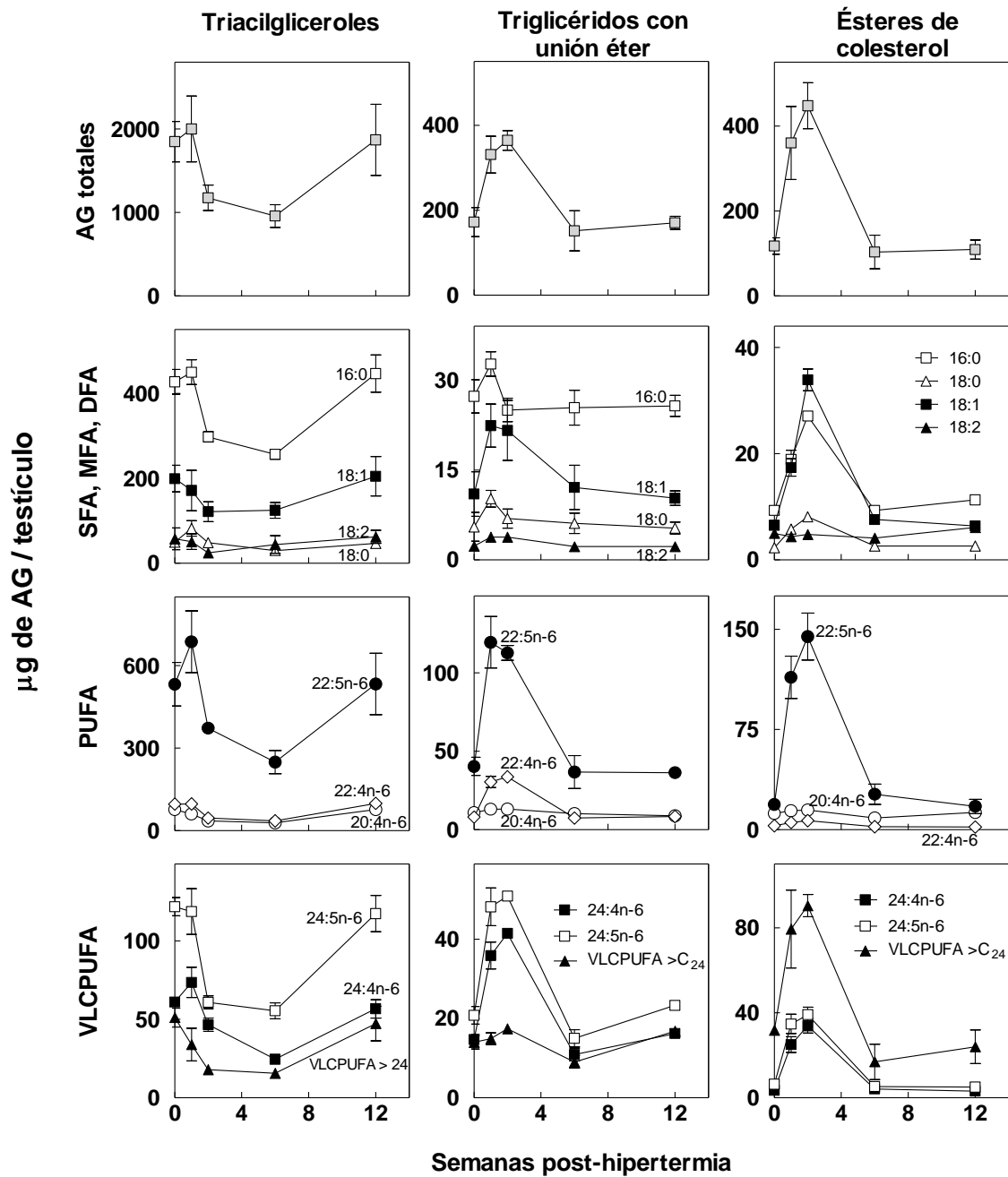




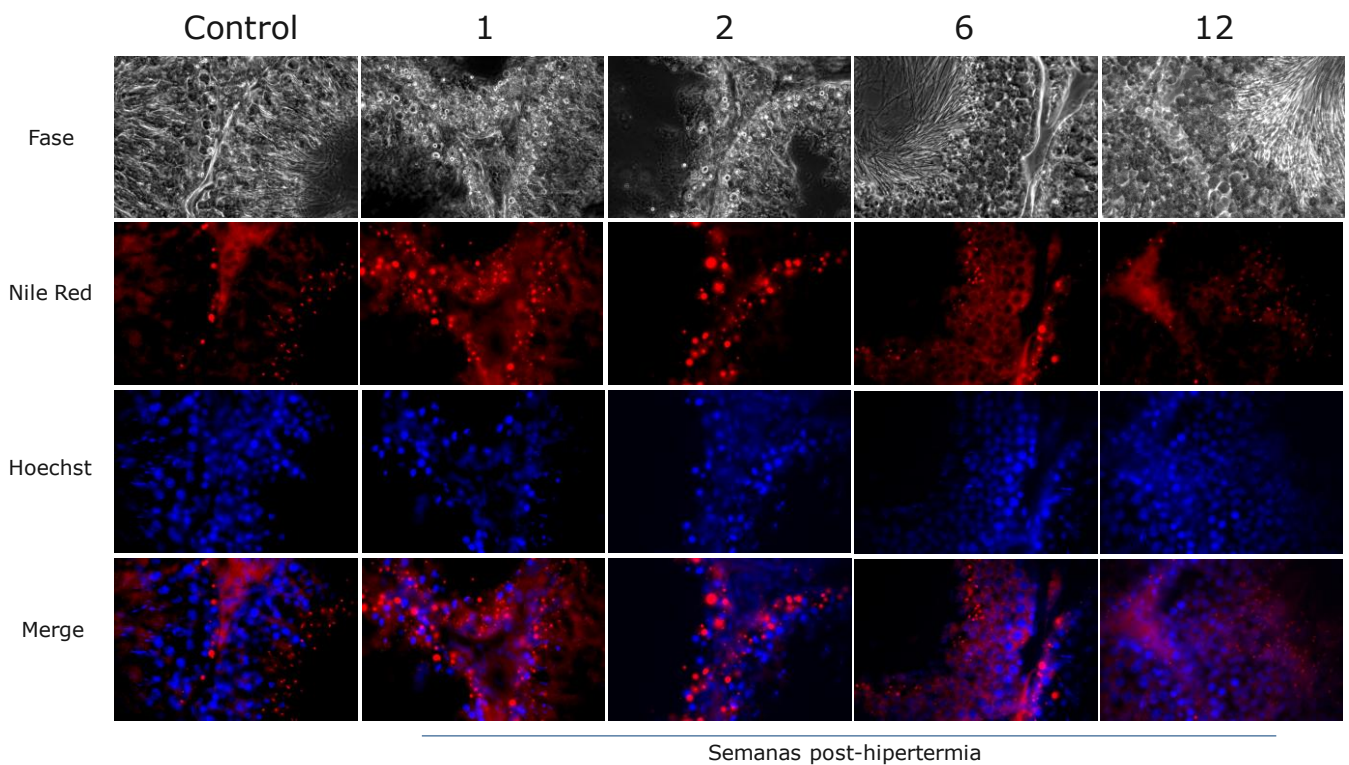
**Fig. 18.** Efectos de las exposiciones a la hipertermia sobre la composición en ácidos grasos de lípidos totales, glicerofosfolípidos totales y glicerofosfolípidos de colina. Teniendo en cuenta las distintas escalas, nótese que el cambio dominante en los tres casos fue la notoria caída, y la posterior recuperación, en la proporción del 22:5n-6. Los principales contribuyentes a esta caída fueron los GPL de colina. En los lípidos totales los cambios fueron menos notorios porque en ellos están incluidos los lípidos neutros, cuyo contenido inicialmente aumentó (Fig. 20).



**Fig. 19.** Consecuencias sobre la composición en ácidos grasos de subclases de CGP y de EGP luego de la exposición testicular a la hipertermia. Nótese que la caída, y la posterior recuperación, en la proporción del 22:5n-6, fueron más marcadas en las subclases plasménicolina y plasméniletanolamina. Sin embargo, teniendo en cuenta que la fosfatidilcolina es mayoritaria (Fig. 17), la disminución de especies con 22:5n-6 fue mayor para ésta que para las otras tres subclases aquí representadas. Entre las semanas 6 y 12 la disminución del porcentaje de 18:2n-6 coincidió con el incremento en la proporción de PUFA de 20 y 22 carbonos.

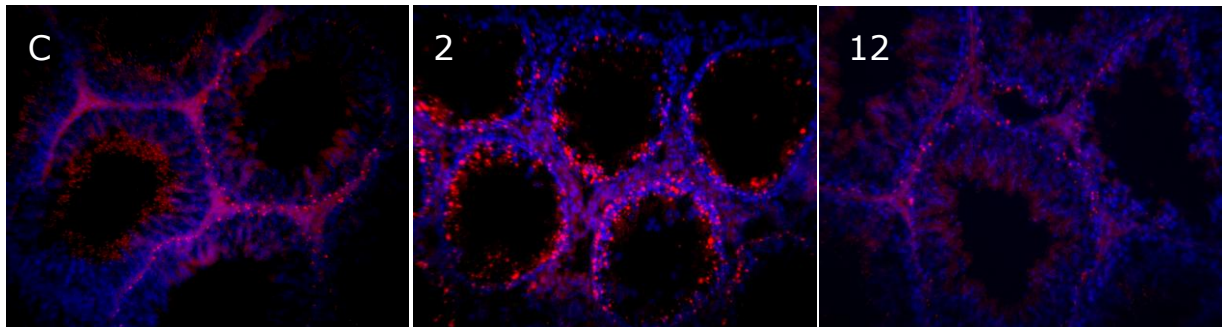


**Fig. 20.** Consecuencias de la exposición testicular a la hipertermia sobre el contenido de triacilgliceroles, triglicéridos con una unión éter y ésteres de colesterol. En el panel superior se comparan niveles de los tres lípidos, cuantificados sobre la base de la suma de sus ácidos grasos, y en los paneles inferiores la contribución al mismo de los principales ácidos grasos, discriminados en saturados (SFA), monoenoicos (MFA), dienoicos (DFA), poliinsaturados (PUFA) de 20 a 22 carbonos y poliinsaturados muy larga cadena (VLCPUFA) de 24 y de más de 24 átomos de carbono (VLCPUFA >24).

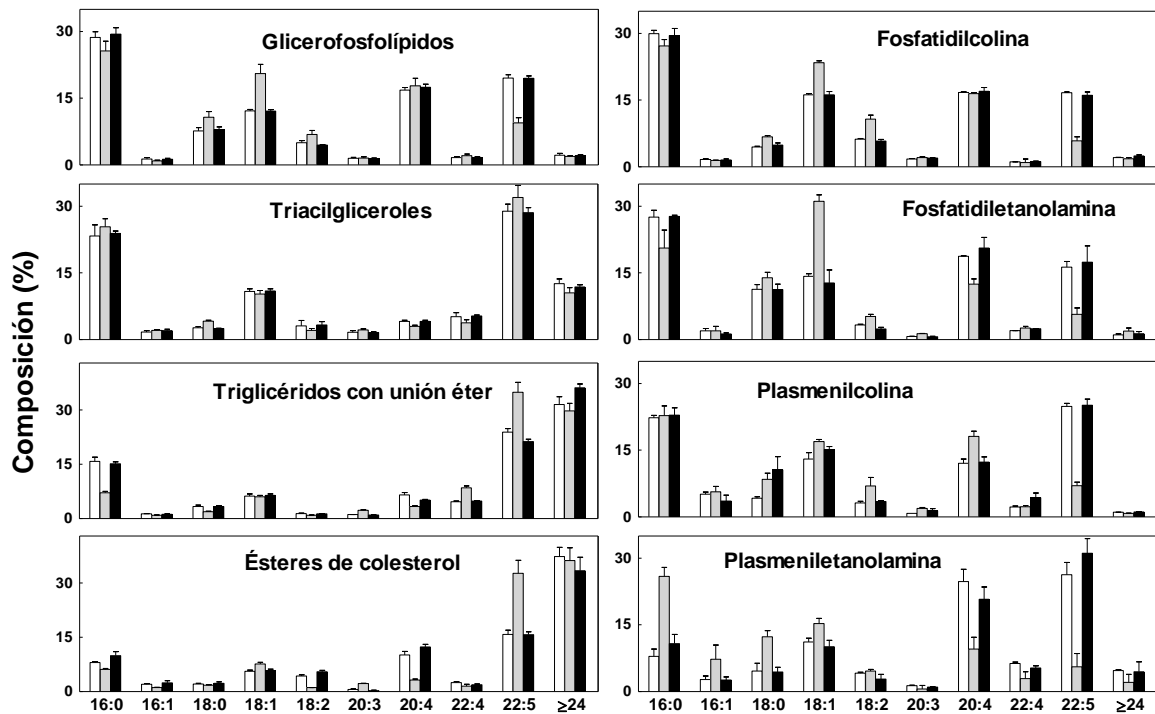


**Fig. 21.** Efectos de la hipertermia sobre el contenido de gotas lipídicas testiculares. Se muestran fotomicrografías de criocortes de testículo observadas con contraste de fases (Fase) y teñidas con Rojo Nilo (Nile Red) para ubicar gotas lipídicas y con Hoechst 33342 para localizar núcleos, a diferentes tiempos (1, 2, 6 y 12 semanas) post-hipertermia. En los controles no tratados, coexisten dos poblaciones de gotas lipídicas, unas más grandes cercanas a la parte basal y unas más pequeñas mirando hacia el aspecto luminal de los túbulos. A la semana 2 post-hipertermia es notoria la tendencia a la desaparición de las gotas pequeñas y la intensa fluorescencia de las gotas grandes asociadas a la parte basal. Esto es seguido por una lenta pero sostenida tendencia a la recuperación de la distribución normal de las gotas en el tejido, casi completa a la semana 12.

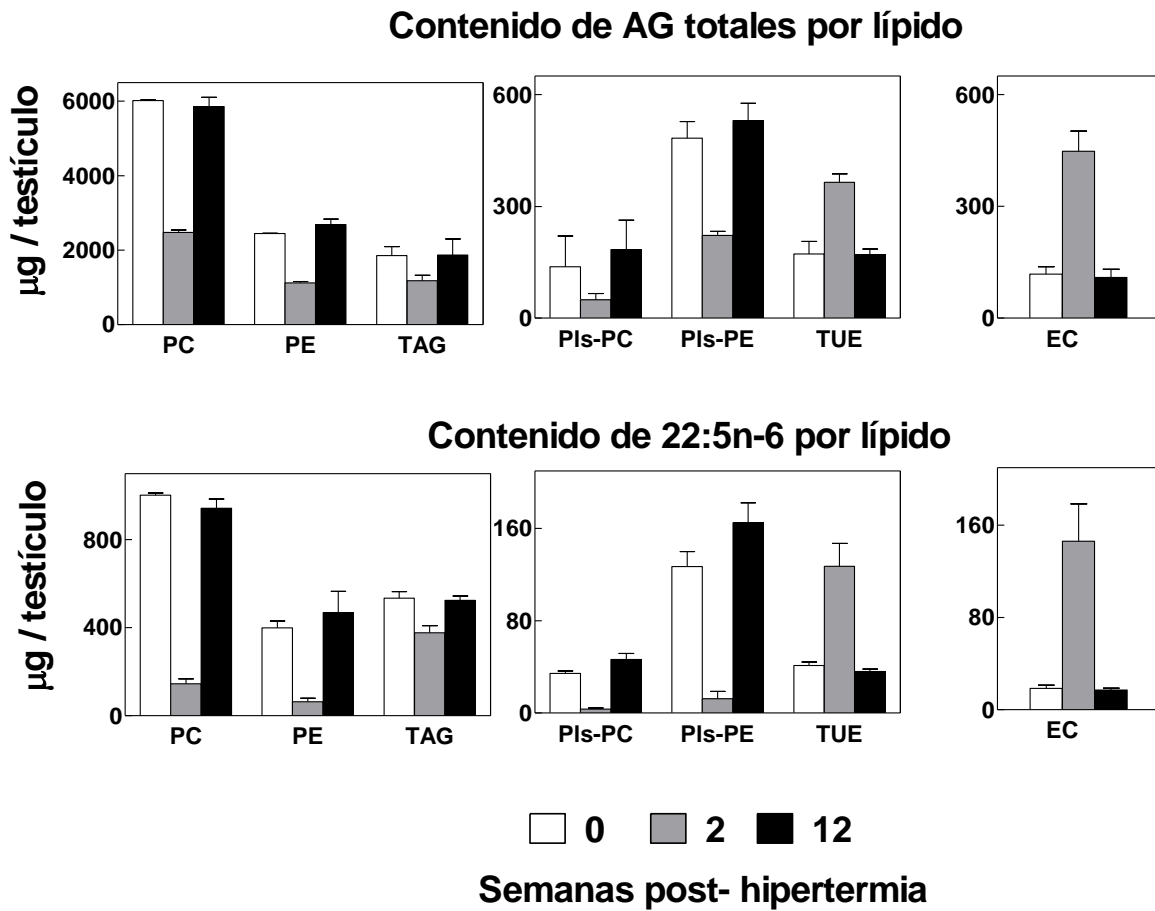
A)



B)



**Fig. 22.** Resumen de la correlación entre los cambios histológicos y bioquímicos observados con respecto a los controles no tratados ( C ) al cumplirse 2 y 12 semanas después de haber cesado los episodios transitorios de exposición a la hipertermia. A) Cambios en la histología, obtenidos como se describe en la Fig. 21. B) Cambios en la composición de ácidos grasos de los lípidos neutros y polares estudiados. Barras blancas, controles no tratados; barras grises y barras negras, 2 y 12 semanas post-hipertermia, respectivamente.



**Fig. 23.** Resumen de las alteraciones cuantitativas sufridas por los lípidos de la figura anterior después de las exposiciones a la hipertermia. Para facilitar la comparación entre los contenidos de los distintos lípidos sobre la misma base, los datos se expresan teniendo en cuenta el contenido de ácidos grasos (AG). Los únicos lípidos cuyo contenido aumentó a la semana 2 post-hipertermia, en presencia de grandes disminuciones de los demás, fueron los TUE y los ésteres de colesterol (EC). Las especies moleculares con 22:5n-6 fueron contribuyentes importantes a los cambios que se observaron en todos los casos.

***RESULTADOS***

***CAPÍTULO II***

En este capítulo nos abocamos al estudio, en la rata, de los lípidos con uniones éteres polares y neutros del epidídimo. En la primera sección investigamos sus cambios en el epidídimo entero en función del desarrollo postnatal hasta la edad adulta, en la segunda abordamos las diferencias normales entre las tres regiones o segmentos epididimales, *caput*, *corpus* y *cauda* en el animal adulto, y en la tercera describimos los efectos sobre los lípidos de cada una de estas regiones de las mismas aplicaciones de hipertermia intermitente cuyos efectos sobre el testículo y sus lípidos estudiamos en el capítulo anterior.

## 1. DESARROLLO POSTNATAL y LIPIDOS CON UNIONES ÉTERES DEL EPIDÍDIMO

### 1.1. Cambios micro y macroscópicos

El desarrollo del epidídimo de rata se divide en un período indiferenciado, desde el nacimiento al día 15; un período de diferenciación, que se extiende desde día 16 al 44; y un período de expansión, entre el día 45 y los tres meses (Sun & Flickinger 1979). El análisis histológico del epidídimo en las distintas fases del desarrollo estudiadas en este capítulo (**Fig. 1**) mostró un progresivo aumento del diámetro de los túbulos o conductos epididimales, con la concomitante disminución en la proporción ocupada por el intersticio. La luz de los conductos estaba formándose en P21, el tiempo más temprano estudiado. En P30, ya había células principales distinguibles. El lumen de los túbulos estuvo abierto y desprovisto de células los días 30 y 37, hasta el día postnatal 45. En este preciso momento, se observó en la luz de muchos túbulos epididimales una población de células que según se cree son las primeras espermátidas producidas en los testículos, a las cuales se les atribuye el rol de estimular la maduración final de las células epiteliales del epidídimo. Los espermatozoides comienzan a aparecer progresivamente después de este evento, observándose su presencia en P45 en el segmento inicial, en P48 en el segmento inicial y el corpus, y en P51 en las tres regiones (Sun & Flickinger 1979), lo que concuerda con nuestra observación de que una buena parte de los conductos los contenían en P55 (Fig. 1). Según estos autores, el desarrollo de las características ultraestructurales de las células epiteliales propias del epidídimo adulto *precede* a la aparición de espermatozoides en el lumen. Es por ello que en este capítulo se eligió un día intermedio entre P45 y P55, el P49, sobre la base de que en este momento el epidídimo ha alcanzado su máximo grado de diferenciación aunque aún contiene una escasa cantidad de espermatozoides. En P55 los espermatozoides poblaban la mayoría de los túbulos epididimales, aunque se observaban muchos túbulos aún



patentes (Fig. 1). En cambio en el animal adulto, la gran mayoría de ellos contenían espermatozoides.

Los cambios histológicos descritos se produjeron concomitantemente con el aumento en el peso del epidídimo, en el contenido de fósforo lipídico y en el contenido de proteína por epidídimo (**Fig. 2**).

Fue interesante encontrar que el peso del epidídimo creció en forma lineal entre P21 y P55, con un quiebre a partir de ese momento hasta P120 dando otra línea que tenía una pendiente mayor (atribuible a la repleción de los conductos con las gametas). Uniendo los cuatro puntos iniciales de la Fig 2, se obtuvo una recta cuya ecuación fue  $y = 0.043X - 0.0499$ , con un valor de  $r = 0.9997$ . Dado que el epidídimo una vez diferenciado no crece en número de células, sino que las existentes disminuyen su altura con la edad para agrandar el lumen donde acomodar a los espermatozoides, esta recta nos permite *estimar* que el peso del epidídimo sin espermatozoides a los 120 días debiera estar en alrededor de 0.466 g. La diferencia con los 0.705 g observados en su mayor parte podría adjudicarse a los espermatozoides, es decir que éstos serían responsables de alrededor de un 30% del peso del epidídimo adulto.

La cantidad de fósforo lipídico y la cantidad de proteína por epidídimo también aumentaron con el desarrollo en este órgano, aunque no en forma lineal entre P21 y P55 como lo hizo el peso, sino con tendencia sigmoidea e hiperbólica respectivamente. Esto explica por qué expresar el contenido de P lipídico (o de proteína) por gramo de tejido se observaran curvas con un máximo en P21, y un mínimo en P30, seguida luego de valores más altos (Fig 2). El máximo de ambos en P21 es lógico si se piensa que en 1 gramo de tejido hay muchas más **células** que en P30, donde en un gramo de tejido hay más túbulos abiertos llenos de fluido y sin células que aporten proteína y lípido. El aumento de la cantidad de fósforo lipídico en P49 (ligeramente mayor al esperado si el aumento de P hubiera sido lineal), y mayor al de proteína, puede atribuirse a que es posible que aún hubiera, en el lumen de segmentos más distales del epidídimo, **células** como las que había en P45 (Fig. 1) mientras en los segmentos proximales, incluyendo tal vez el corpus, comenzaba a haber espermatozoides. La expresión de los resultados de fósforo lipídico por mg de proteína (Fig. 2) también dio máximos y mínimos a distintos tiempos del desarrollo, por lo que se decidió por simplicidad expresar los resultados cuantitativos de esta sección del capítulo en cantidad por epidídimo y expresar su concentración por gramo de tejido.

## 1.2. Clases y subclases de fosfolípidos

Para el estudio de los lípidos, elegimos los días postnatales 30, 49, 55 y 120. Con el desarrollo, la composición en clases de fosfolípidos del epidídimo (%) se mantuvo sin cambios significativos entre P30 y P49, con un aumento en el porcentaje de los CGP alrededor de P55 (**Fig. 3**). Si bien este aumento fue pequeño, resultó en una diferencia significativa con el porcentaje de CGP del adulto (P120), el cual fue menor que en todos los períodos previos. Dicho menor valor fue compensado por un mayor porcentaje de SM (Fig. 3). Este cambio composicional puede atribuirse a la abundancia de espermatozoides, que contienen un porcentaje relativamente alto de este fosfo-esfingolípido, como se muestra en el Capítulo 3.

Con respecto a las subclases de CGP y EGP, el desarrollo y la maduración del epidídimo se acompañaron del esperable incremento en el contenido por epidídimo de las tres subclases en estudio en el período considerado (**Fig. 4**).

Considerando primero el aspecto cualitativo, nos encontramos con una gran diferencia entre las *proporciones* de las subclases fosfatidil-, plasmanil- y plasmenil- entre los CGP y los EGP. En el primer caso, la fosfatidilcolina (PC) fue varias veces superior en porcentaje a sus dos subclases con uniones éteres, mientras que en el caso de los EGP, sólo la plasmaniletanolamina fue minoritaria. Nos sorprendió hallar a la plasmeniletanolamina en un elevado porcentaje en todo el período en estudio, superando en algunos momentos del desarrollo (P30, P55) a la fosfatidiletanolamina.

El incremento con la edad postnatal de las distintas subclases de CGP y EGP (Fig 4) mostró que en el caso de los CGP, éste fue *relativamente* mayor para las dos subclases con uniones éteres que para la PC. Así, entre P30 y en el adulto la subclase plasmenilcolina pasó de 6% a 12% y la plasmanilcolina de 2% a 7% de los CGP, mientras la PC disminuyó su porcentaje del 92 al 81% en el mismo período. En el caso de los EGP, la plasmeniletanolamina varió entre el 53% en P30 y el 41% en P120, mientras la fosfatidiletanolamina pasó de un 38% a un 49%. Por su parte, la plasmaniletanolamina sólo varió entre el 9 y el 10% del total de los EGP durante todo el desarrollo epididimal.

Al tomar en cuenta las concentraciones por gramo de tejido de las subclases, la comparación permitió ver que la PC fue holgadamente la mayoritaria, seguida de la PE y la plasmeniletanolamina. Por su parte, la plasmaniletanolamina y la plasmanilcolina tendieron a incrementar gradualmente su concentración con el desarrollo, y de las seis subclases en estudio, la que aumentó el mayor número de veces entre P30 y P120, en forma gradual pero continua, fue la plasmenilcolina. Este resultado es consistente con

el enriquecimiento paulatino que experimentó el epidídimo en espermatozoides, de los cuales la plasmenilcolina es un lípido importante (Capítulo 3).

### 1.3. Ácidos grasos de subclases de glicerofosfolípidos

Los CGP y EGP del tejido epididimal del adulto fueron muy ricos en PUFA de las series n-6 y n-9. Si bien *todos* los ácidos grasos aumentaron su cantidad con el desarrollo al incrementarse la de los GPL que los contienen, en cada subclase lo hicieron a un ritmo diferente, como lo muestran las variaciones de sus porcentajes (Fig. 5).

En P30, los PUFA de la serie n-6 más abundantes eran 18:2n-6 y 20:4 en las seis subclases, pero gradualmente su porcentaje tendió a disminuir, incrementándose el de 22:5n-6 con el desarrollo. Este incremento alcanzó su pendiente más acusada entre P55 y P120, momento este último en el cual este PUFA alcanzó porcentajes mayores en las tres subclases de EGP que en las correspondientes de colina.

Algo similar podemos decir de los ácidos grasos de la serie n-9. En las seis subclases el 18:1n-9 fue un ácido graso importante durante todo el período. Predominó ampliamente en P30, y disminuyó su porcentaje con el desarrollo a medida que los de 22:3n-9 y de 22:4n-9 se incrementaban, con una pendiente mayor entre P55 y P120, momento este último en el cual los dos PUFA, pero en especial el 22:4n-9, alcanzaron porcentajes mayores en las tres subclases de CGP que en las correspondientes de etanolamina (Fig. 5).

Observando el período P30-P55, el epidídimo inmaduro presentó porcentajes importantes de 20:4n-6, precursor del 22:5n-6, en lípidos como los dos plasmalógenos y la plasmanilcolina. Por otra parte, el epidídimo inmaduro presentó en general bajos porcentajes de 20:3n-9, precursor del 22:3n-9 y del 22:4n-9. Esto sugiere que las enzimas necesarias para sintetizar a los dos PUFA de 22 carbonos “finales” de la vía biosintética se expresan más tardíamente durante el desarrollo epididimal, apareciendo sólo cuando los espermatozoides están próximos a aparecer o ya están presentes. El hecho de que los PUFA n-9 estén ausentes del tejido testicular, así como el bajo porcentaje en el epidídimo inmaduro, indican que la maduración del epitelio epididimal favorece, en éste último, la síntesis de dichos PUFA.

En la Fig. 6 se presenta un dibujo con barras, cada una de las cuales muestra los porcentajes de los distintos *grupos* de ácidos grasos, esto es, saturados, monoenoicos, dienoicos y PUFA, obtenidos sumando los porcentajes individuales de la Fig. 5. Los cambios más notables por grupo de ácidos grasos en relación a la presencia de espermatozoides fueron, por una parte, el gran incremento de PUFA n-6

que ocurrió en la plasmaniletanolamina, y por otra, el gran incremento en PUFA n-9 que ocurrió en la plasmenilcolina.

Una comparación entre la composición de ácidos grasos del epidídimo entero de la rata adulta y la de los correspondientes espermatozoides maduros (Capítulo 3, Fig. 1) muestra que en la plasmeniletanolamina y plasmenilcolina espermáticas es aún mayor el porcentaje de 22:5n-6, y de 22:4n-9, respectivamente, que en tejido epididimal en el cual ambos lípidos se forman.

En la **Fig.7** se presentan los cambios cuantitativos, expresados en  $\mu\text{g}$  / gramo de tejido, de los ácidos grasos cuyos porcentajes se mostraron en la Fig.5. Se puede apreciar que en etapas tempranas del desarrollo el 20:4n-6 fue el PUFA n-6 cuantitativamente más importante en todas ellas, y que en etapas más avanzadas el 22:5n-6 aumentó varias veces su concentración en las seis subclases. En cambio, el 22:3 y el 22:4n-9 ya se hallaban presentes en el epidídimo a una edad tan temprana como P30 en los EGP, en especial en la plasmeniletanolamina. El contenido de estos PUFA n-9 en las tres subclases de EGP tendió a mantenerse dentro de ciertos márgenes, al mismo tiempo que aumentaba con el desarrollo en las tres subclases de los CGP, tempranamente en PC y tardíamente (después de P55) en plasmanilcolina y plasmenilcolina.

#### 1.4. Triglicéridos con una unión éter y sus subclases

Las características peculiares de los TUE de los túbulos seminíferos testiculares vistas en el Capítulo 1, y el hecho de que sus niveles en ellos se incrementaron con la maduración sexual, motivaron nuestro interés en indagar sobre la posible presencia y características de estos peculiares lípidos en el epidídimo. Nuestras primeras observaciones en la rata adulta revelaron que no sólo había una cantidad llamativamente importante de TUE, sino que éstos se presentaban en dos subclases. Cuando los estudiamos en los distintos tiempos del desarrollo en los que habíamos estudiado los fosfolípidos, observamos que tanto su contenido por epidídimo como su concentración por gramo de tejido se incrementaron gradualmente con la adquisición de la madurez sexual (**Fig. 8**). El nivel de TUE se incrementó entre P30 y P49, con una disminución en P55, y a partir de allí volvió a incrementarse hasta P120, en coincidencia con la presencia de espermatozoides en los conductos epididimarios.

Fue interesante observar que el incremento de la concentración de TUE en P49 coincidió con un aumento, también temporario, en la concentración de fósforo lipídico (Fig. 2) y de las subclases de CGP y EGP (Fig. 3). Este incremento se asoció con el hecho de que el tejido epididimal en P45 había recibido una oleada de células

provenientes del testículo (Fig. 1) que en P49 tal vez permanecieran, además de haber comenzado a recibir en sus segmentos iniciales los primeros espermatozoides.

El significativo aumento en la cantidad de TUE que ocurrió entre P55 y P120, coincidió con el incremento en la cantidad de espermatozoides en el lumen epididimal propio de la madurez sexual. La concentración por gramo de tejido aumentó menos, en forma poco significativa, debido a que tanto los  $\mu\text{g}$  de TUE como los gramos de tejido aumentaron casi paralelamente durante el desarrollo.

Cuando los TUE se separaron en las subclases conteniendo una unión alquilo (alquil-DAG) de los que contenían una unión alquenoil (alquenoil-DAG), la subclase alquil-DAG fue significativamente mayor que la alquenoil-DAG en todos los días del desarrollo postnatal analizados, así como en el adulto (Fig.8), ya que con pequeñas variaciones sus proporciones rondaron el 70% y el 30% del total de los TUE, respectivamente.

Es interesante destacar aquí que hubo una gran diferencia entre los TUE epididimales y los testiculares. Los epididimales fueron muy superiores en cantidad (cerca de 700 versus 100  $\mu\text{g}$  por gramo de tejido) y en ellos hubo una mayor proporción de alquenoil-DAG que en los testiculares (30% versus 15% de los TUE). Por este motivo, no se cuantificaron por separado en el primer Capítulo en el caso de los testículos prepúberes pues dada la pequeñez de los órganos eso hubiera obligado a aumentar excesivamente el número de animales por muestra. Aún en el testículo del animal adulto, además de que la mayor parte de los TUE son alquil-DAG, los TUE totales sólo constituyen alrededor de un 1% en peso del total de los lípidos.

### 1.5. Ácidos grasos de subclases de TUE

El perfil de ácidos grasos, tanto de TUE totales como de las subclases, evidenció una sorprendentemente alta concentración de PUFA de la serie n-9 en ellos (**Fig. 9**). Como en el caso de los GPL, los PUFA n-9 mayoritarios de los TUE epididimales fueron el 22:4n-9 y el 22:3n-9, y el PUFA n-6 más representativo fue el 22:5n-6 (Fig. 9 y **Tabla 1**). Los TUE de P30, como los fosfolípidos (Fig. 5) ya contenían una proporción detectable de estos ácidos grasos, en aumento hacia P49, indicando que son endógenos del epidídimo y no son aportados por, o sintetizados en, los espermatozoides.

A partir de P30, a expensas del porcentaje decreciente de 18:1n-9, los n-9 PUFA de los alquil-DAG y alquenoil-DAG sólo tendieron a incrementar sus porcentajes con el desarrollo, y por lo tanto su cantidad, dado que ambos TUE aumentaron. Por su parte, la proporción de n-6 PUFA en ellos también tendió a aumentar con el desarrollo a

expensas de cada vez menos 18:2n-6, aunque en todos los tiempos estudiados se mantuvo en menor proporción que la de n-9 PUFA en ambas subclases (Fig. 9).

Al comparar la evolución de los cambios de los ácidos grasos de los dos TUE epididimales con el desarrollo (**Fig. 10**), llamó mucho nuestra atención que en P49 los alquil-DAG, y no así los alquenil-DAG, mostraran un gran incremento en la concentración de todos sus ácidos grasos, pero en especial los monoenoicos y los PUFA n-9. Los alquil-DAG con 18:1n-9 decrecieron luego en forma continua entre P49, P55 y P120, mientras los que contenían PUFA n-9 decrecieron entre P49 y P55, para volver a aumentar en P120. En los alquenil-DAG no se observó ese patrón: sólo se produjeron incrementos continuos en las cantidades de PUFA, tanto n-6 como n-9.

La **Tabla 1** proporciona los datos de composición de los TUE epididimales totales del adulto, incluyendo algunos componentes no incluidos en la Fig. 5, como el 18:3 n-6 y los PUFA tentativamente identificados como de 24 carbonos. La proporción de 24:4n-9 fue mayor en los alquil-DAG que en los alquenil-DAG.

En la **Fig. 11** se comparan, sobre las mismas bases, los cambios con el desarrollo de GPL y de triglicéridos con uniones alquilo y alquenilo epididimales. El contenido y la concentración de alquenil-DAG fueron considerablemente inferiores a los de plasménicolina y ambos inferiores a los de plasméniletanolamina. Para nuestra sorpresa, tanto el contenido como la concentración de alquil-DAG superaron ampliamente a las de la plasmánicolina y la plasmániletanolamina durante todo el desarrollo. La plasméniletanolamina se incrementó entre P49 y P55 como el alquenil-DAG. El alquil-DAG fue el único de las seis subclases en aumentar varias veces su concentración en P49.

## 2- LÍPIDOS CON UNIONES ÉTERES EN REGIONES DEL EPIDIDIMO

Los resultados hasta aquí obtenidos motivaron nuestro interés en estudiar, en animales sexualmente maduros, los lípidos con uniones éteres en cada una de las regiones en que se divide clásicamente el epidídimo, *caput*, (cabeza) *corpus*, (cuerpo) y *cauda*, (cola) con el objetivo de hallar posibles diferencias en su contenido y/o composición que pudieran proporcionar claves acerca de cómo y dónde su biosíntesis es más activa.

La **Fig. 12** muestra la histología de las tres regiones a distinto aumento. En las tres se distingue el epitelio seudoestratificado, compuesto en su mayor parte por las células denominadas *principales*, que se caracterizan por contener en su parte apical largas prolongaciones de citoplasma cubierto por membrana, conocidas como estereocilias. La región que en este trabajo denominamos *caput* está de hecho

compuesta por dos regiones, el segmento inicial y el *caput* propiamente dicho, cuyas diferencias histológicas se aprecian en la toma de menor aumento (10X) en la Fig. 12. El alto epitelio del segmento inicial está involucrado en la absorción de los fluidos que acompañan a los espermatozoides que entran al epidídimo. Las tres regiones contienen un abundante intersticio, y en el lumen de las tres se aprecian abundantes espermatozoides, que parecen diferir en su formato. En la toma a mayor aumento del *caput* (40X, Fig. 12) se aprecia una célula conocida como célula *narrow*, cuya característica es precisamente ser más angosta que las principales y destacarse por su coloración más oscura.

Para cada región epididimal, el peso en gramos, el contenido de proteína total, y el de fósforo lipídico total, expresados por segmento, se muestran en la Fig. 13. La cabeza y la cola, ambas de tamaño y peso similares en el adulto, contuvieron cantidades equivalentes de proteína y de fósforo lipídico, mientras que el cuerpo, al ser el menor de los segmentos, presentó como era esperable un contenido menor de ambos componentes. Dadas estas relaciones, al expresar las cantidades de fósforo y de proteína con respecto al peso de cada segmento epididimal, ambas fueron significativamente más altas en el *corpus* que en las otras dos regiones (Fig. 13).

### 2.1. Clases y subclases de fosfolípidos

Los CGP, seguidos por los EGP, fueron los fosfolípidos mayoritarios en los tres segmentos del epidídimo (Fig. 14 A). Los CGP prácticamente no cambiaron su porcentaje, mientras que la proporción de los EGP fue ligeramente mayor en la cola (28%) que en la cabeza y el cuerpo (25%) epididimales. Lo opuesto ocurrió con la esfingomielina (SM), que fue el tercer fosfolípido en importancia en *corpus* y en *cauda*. La proporción de PS, PI y CL fue relativamente baja en las tres regiones, aunque algo menor en la *cauda* que en el *corpus*. La liso-PC mostró una proporción mayor en *caput* que en las otras dos regiones, sugiriendo que en la primera región normalmente hay una mayor actividad hidrolítica sobre los CGP.

En los tres segmentos, la PC fue la subclase mayoritaria de los CGP, representado un 88%, un 83% y un 74% de los mismos en la cabeza, el cuerpo y la cola, respectivamente. La disminución porcentual de PC en el sentido cabeza→cuerpo→cola no se debió a disminución de su cantidad sino que reflejó los aumentos proporcionalmente mayores, en ese mismo orden, en los porcentajes de las dos subclases con uniones éteres: plasmanilcolina (5%, 7% y 12%) y plasmencilcolina (7%, 10% y 14%), respectivamente (Fig. 14 A).

En el caso de los EGP, la PE fue la subclase mayoritaria sólo en la cabeza (49%), siendo significativamente menor en el cuerpo (34%), e intermedia en la cola (42%). La plasmaniletanolamina mostró diferencias pequeñas entre cabeza, cuerpo y cola (8%, 8% y 10% de los EGP, respectivamente). Para nuestra sorpresa, la plasmeniletanolamina fue la subclase más abundante de los EGP en el cuerpo epididimal (48%, 58% y 48% de los EGP de cabeza, cuerpo y cola, respectivamente) (Fig. 14 A).

Al expresar la concentración de las seis subclases mencionadas por gramo de tejido, el *corpus* se destacó por ser la región más rica en fosfatidilcolina y en plasmeniletanolamina (**Fig. 14 B**). Además, los niveles de plasmeniletanolamina superaron a los de plasmenilcolina en las tres regiones epididimales. Esto nos intrigó bastante, porque esperábamos que la *cauda* fuera una región rica en plasmenilcolina, al ser ésta un componente importante de los espermatozoides.

La observación de que la concentración de plasmeniletanolamina y aunque algo menos, también la de plasmenilcolina, fuera mayor en el cuerpo que en las otras dos regiones sugiere que esta zona del epidídimo debe contener una actividad mayor de las enzimas necesarias para sintetizar plasmalógenos.

## 2.2. Ácidos grasos de glicerofosfolípidos y sus subclases

Los GPL totales extraídos del *caput*, y la *cauda* epididimales mostraron composiciones de ácidos grasos similares, con ácidos grasos saturados, seguidos de monoinsaturados, éstos a su vez seguidos de PUFA n-6 y en cuarto lugar de PUFA n-9 (**Fig. 15**). Por su parte, los GPL totales del *corpus* fueron relativamente más pobres en PUFA n-6 (20:4n-6, 22:5n-6), y en cambio más ricos en ácidos grasos monoinsaturados (predominantemente 18:1n-9) y en PUFA n-9 (principalmente 22:3n-9 y 22:4n-9) que los de las otras dos regiones.

El perfil de ácidos grasos de los CGP y EGP totales de las tres regiones (no mostrados) reflejó en general una abundancia relativa de los principales ácidos grasos similar a la recién descrita en los GPL totales. Sin embargo, al estudiar las tres subclases de CGP y EGP por separado, la composición de ácidos grasos mostró interesantes diferencias entre las tres regiones (**Fig. 16**).

La PC y la PE tuvieron perfiles similares a los recién descritos para los GPL totales. Tuvieron en común 1) que tanto en la cabeza como en la cola epididimal contenían ácidos grasos saturados (16:0, 18:0) y monoenoicos (16:1, 18:1), seguidos de PUFA n-6 (20:4, 22:5), con relativamente escasos niveles de n-9 PUFA (22:3, 22:4)



y 2) que en el *corpus*, ambas fueron significativamente más ricas en 18:1n-9 y en PUFA n-9, y más pobres en PUFA n-6, que en las otras dos regiones,

La plasmanilcolina y la plasmaniletanolamina tuvieron en común 1) el ser ambas muy ricas en ácidos grasos saturados (16:0, 18:0), seguidos de monoenoicos, en la cabeza epididimal, y 2) el tener cada vez menos de estos y más de otros ácidos grasos en el cuerpo y en la cola.

La plasmenilcolina y la plasmeniletanolamina de la cabeza y de la cola, tuvieron en común 1) el ser las más pobres de las subclases en ácidos grasos saturados y 2) el ser las dos subclases más ricas en PUFA, tanto n-6 (20:4n-6, 22:5n-6) como n-9 (22:3n-9, 22:4n-9). Las mismas dos subclases del *corpus*, tuvieron en común 1) el ser más ricas en 18:1n-9, y en PUFA n-9 (22:3n-9, 22:4n-9), que sus pares de *caput* y *cauda*, el primero predominando en plasmenilcolina y los segundos en plasmeniletanolamina. Fue especialmente llamativo que en la plasmeniletanolamina del *corpus* el 22:4n-9 fuera el ácido graso mayoritario (**Fig. 16 A**).

La **Fig. 16 B** proporciona datos cuantitativos sobre las cantidades, en  $\mu\text{g}$  / mg de proteína, utilizando las mismas escalas para facilitar las comparaciones, de las sumas de los PUFA de cada serie presentes en cada subclase. Debido a su importancia cuantitativa, la fosfatidilcolina, seguida de la plasmenilcolina, fueron las que aportaron más n-6 PUFA en *caput* y *cauda*, y la plasmeniletanolamina fue la que aportó más PUFA n-9 en el *corpus*.

Comparando ahora las concentraciones de tres ácidos grasos individuales importantes de las seis subclases en  $\mu\text{g}$  / g de tejido (**Fig. 17**), se destacó el *corpus*, pues cada una de sus subclases se enriqueció con respecto a su contraparte del *caput* en 18:1, en 22:4n-9, o en ambos. Además, la plasmeniletanolamina con 22:4n-9 superó ampliamente en cantidad a la plasmenilcolina con 22:4n-9 en esa región.

La fosfatidilcolina, rica en 22:5n-6 en la cabeza, fue empobreciéndose en ese ácido graso en la dirección cabeza→ cuerpo→ cola. En esa misma dirección por el contrario, las pequeñas plasmaniletanolamina y plasmanilcolina, se destacaron por enriquecerse en 22:5n-6 (Fig. 17).

### 2.3. Lípidos neutros de las tres regiones epididimales

Los triacilgliceroles (TAG) fueron los lípidos neutros absolutamente mayoritarios del epidídimo, en las tres regiones. Sus niveles fueron tan altos que dificultaron su análisis, por lo que sólo se presenta su composición de ácidos grasos en la **Fig. 18**. Su cuantificación fue problemática por la gran variabilidad entre las muestras de una misma región, lo cual se explica porque los TAG sobreabundaron en las tres regiones.

Por otra parte, los TAG son el principal componente del tejido adiposo extraepididimal. Pese a que en el presente estudio lo separamos cuidadosamente antes de preparar nuestras muestras, la más mínima contaminación con este tejido impacta mucho, y prácticamente en forma exclusiva, sobre la cantidad de TAG. La composición de AG de los TAG extraepididimarios mostró que eran muy ricos en 18:2n-6 y 18:1n-9, pero virtualmente carecieron de los PUFA que se observan en los TAG de la Fig. 18.

En los TAG de las tres regiones epididimales predominaron los ácidos grasos monoenoicos sobre otros ácidos grasos, pero estos lípidos neutros difirieron en composición de ácidos grasos por segmento (Fig. 18). Así, los TAG del *caput* se caracterizaron por su mayor riqueza en 18:1 y 18:2, disminuyendo el porcentaje de éstos y aumentando los de PUFA más largos y más insaturados en los TAG del cuerpo y de la cola. Los ácidos grasos de los TAG siguieron un patrón parecido al de los GPL (Fig. 15, Fig 16), con mayores niveles de ácidos grasos monoenoicos y PUFA n-9 en el *corpus* que en las otras dos regiones y, por el contrario, con mayor proporción de PUFA n-6 en cabeza y cola que en el cuerpo.

Los TUE de las tres regiones, a diferencia de los TAG, demostraron ser extremadamente ricos en PUFA de 20 a 22 carbonos (65-70%, del total de ácidos grasos). Éstos se distribuyeron entre PUFA n-6 y PUFA n-9, con preponderancia de estos últimos (22:3n-9 y 22:4n-9) en las tres regiones. A éstos siguieron en orden de importancia los ácidos grasos monoenoicos (16:1 y 18:1, con predominio de éste último).

Los EC se encontraron en bajas concentraciones en el epidídimo, unos 5 a 3 mg de lípido por mg de proteína, y no mostraron diferencias cuantitativas entre las regiones. Sin embargo, exhibieron grandes diferencias en su composición en ácidos grasos entre la cabeza y las otras dos regiones. Al contrario de los TAG, los EC de la cabeza fueron notoriamente ricos en PUFA (75% del total de ácidos grasos). Los dos principales ácidos grasos en estos EC fueron el 22:5n-6 (26%) y el 22:4n-9 (24%), seguidos del 18:1n-9 (sólo un 10%). Por el contrario, los EC del cuerpo y de la cola fueron ricos en ácidos grasos monoenoicos (40%), principalmente 18:1, con proporciones de PUFA que, aún sumadas, no alcanzaron al 40% de los ácidos grasos. En los EC del cuerpo y de la cola (en ese orden), el 18:1n-9 fue el ácido graso mayoritario (32% y 34%), seguido del 22:4n-9 (10% y 5%) y éste del 22:5n-6 (5% y 3%). Los EC de la cola por lo tanto resultaron ser los EC más pobres en PUFA de las tres regiones.

La tinción con Rojo Nilo de criocortes de tejido epididimal (**Fig. 19**) reveló la presencia de abundantes gotas lipídicas en las tres regiones, las cuales obviamente deben contener los lípidos neutros descritos, dominados cuantitativamente por los TAG. Esta tinción nos permitió comprobar 1) que la mayor parte de los lípidos neutros que estudiamos pertenecen a *epitelio* epididimal y no a elementos extratubulares y 2) que las gotas lipídicas difirieron entre las regiones en cuanto a su tamaño y a su distribución en el espesor del epitelio. Así, tanto la cabeza como la cola epididimal contuvieron gotas lipídicas grandes de localización basal en el epitelio, con un patrón de distribución aparentemente aleatorio entre sus células. Llamativamente, el cuerpo no sólo mostró la mayor concentración de gotas lipídicas del epidídimo sino que reveló la coexistencia de dos poblaciones de gotas lipídicas: unas más grandes localizadas en la región basal y una cantidad importante de gotas pequeñas, distribuidas por el citoplasma de prácticamente todas las células epiteliales. Especulamos que las gotas pequeñas podrían representar gotas en reciente formación, antes de coalescer para formar las gotas más grandes, las cuales podrían representar gotas más maduras de almacenamiento de lípidos neutros, conteniendo, entre otros lípidos neutros, a los TAG, TUE y EC.

#### 2.4. Subclases de triglicéridos con una unión éter

En el epidídimo total habíamos observado al separar los TUE que los alquil-DAG predominaban sobre los alquenil-DAG. Esto se reprodujo en cada uno de los tres segmentos epididimales (**Fig. 20**), aunque variaron significativamente por región tanto las proporciones entre estas dos subclases como sus concentraciones. De los datos de la Fig. 20 surge que las relaciones entre alquil-DAG y alquenil DAG fueron 78:22, 88:12, y 65:35, en *caput*, *corpus* y *cauda*, respectivamente. Llamativamente, en el *corpus* fue donde se observó la mayor concentración de los alquil-DAG por mg de proteína (Fig, 20) y por gramo de tejido (Fig. 22), mientras la cabeza y la cola fueron cuantitativamente más pobres en ellos. Por su parte, los alquenil-DAG prácticamente no variaron su concentración entre regiones.

En cuanto a composición de ácidos grasos, las dos subclases de TUE de las tres regiones, con diferencias en porcentajes, tuvieron en común 1) el hecho de ser extremadamente ricos en PUFA de 22 carbonos (**Fig. 21 A**), los cuales al ser sumados sobrepasaron el 65% de los AG de los alquil-DAG y el 75 % de los alquenil-DAG; 2) que en ambas subclases predominaron los PUFA de la serie n-9 sobre los PUFA de la serie n-6 y éstos a su vez sobre los muy minoritarios n-3; 3) que el 18:1n-9 estuvo presente en ambas subclases, contribuyendo a un 18% de los alquil-DAG y a un 10%

de los alquenil-DAG; y 4) que estos últimos mostraron un porcentaje mayor de 22:5n-6 de 22:4n-9, y algo menor de 22:3n-9, que los alquil-DAG.

Al comparar sobre la misma base,  $\mu\text{g} / \text{mg}$  de proteína, las cantidades de especies con los distintos PUFA sumados, los alquil-DAG del *corpus* concentraron la mayor cantidad de PUFA n-9, varias veces superior en el cuerpo que en la cabeza y la cola epididimales y varias veces superior a la presente en los alquenil-DAG (**Fig. 21 B**). Aunque en menor medida, la alta concentración de los alquil-DAG en el *corpus* se tradujo en una mayor concentración de ácidos grasos saturados, monoenoicos y dienoicos en este lípido con respecto al recuperado de las otras regiones epididimales (Fig. 21 B).

Como resumen de esta sección, en la **Fig. 22** se presentan sobre la misma base ( $\mu\text{g} / \text{g}$  de tejido) los niveles de los GPL con uniones éteres en comparación con los de TG con uniones éteres de los tres segmentos epididimales. Se destaca 1) que la plasmeniletanolamina predomina ampliamente en el *corpus* con respecto a las otras dos regiones y 2) que los alquil-DAG en el *corpus* superan en cantidad a la plasmanilcolina y a la plasmaniletanolamina, aún sumadas

### 3. EFECTOS DE LA EXPOSICIÓN A LA HIPERTERMIA SOBRE LOS LÍPIDOS DEL EPIDÍDIMO

Como mostramos en el capítulo anterior, la exposición intermitente del testículo a episodios de hipertermia moderada produjo la muerte selectiva de células de la línea germinal, con la consecuente interrupción de la espermatogénesis. El efecto lesivo de la hipertermia fue transitorio, pues seis semanas después (día 42) había recommenzado la espermatogénesis. Dada la estrecha interdependencia entre testículo y epidídimo, nuestro objetivo en esta sección fue estudiar las consecuencias de la misma exposición al estrés térmico sobre cada una de las regiones epididimales.

#### 3.1. Histología

Las **figuras 23, 24 y 25** muestran microfotografías de las regiones *caput*, *corpus* y *cauda* epididimales, respectivamente, de animales control en comparación con animales que habían sido sujetos durante 5 días a una exposición por día de 15 minutos a la hipertermia, obtenidas 1, 2 y 6 semanas después de la última de dichas exposiciones.

En la primera semana post-hipertermia, el lumen epididimal en las tres regiones (Fig. 23-25) contenía espermatozoides y claramente también más células entre ellos que el de los controles. Los espermatozoides pueden atribuirse en parte a los que

estaban presentes en las distintas regiones al exponer el epidídimo a los episodios de hipertermia y en parte (sobre todo en el *caput*) a los últimos espermatozoides que pudieron haber llegado durante esa semana desde el testículo (recordando que en éste las espermátidas tardías habían continuado su diferenciación a espermatozoides durante la primera semana post-hipertermia). Las células del lumen pueden atribuirse en parte a células dañadas desprendidas desde el propio epitelio epididimal y en parte (sobre todo en el *caput*) a células también dañadas provenientes del testículo afectado (recordando que células germinales termosensibles se desprendían desde su sitio en el epitelio seminífero, en algunos casos en forma de simplastos).

Llamativamente, el *caput* (**Fig. 23**) mostró una rápida reacción en su epitelio, como lo sugiere el aumento de su espesor y el incremento de vacuolas en sus células a la semana 1. El *caput* mostró otro cambio interesante a la semana 2, que persistía a la semana 6: un aumento importante en el número de células *narrow*. En función de las semanas la altura del epitelio de esta región inicial del epidídimo se incrementó notablemente, y sus células contenían abundantes vacuolas. En el lumen del *caput*, a la semana 2 ya había comenzado a disminuir la densidad de células, y a la semana 6 prácticamente no había espermatozoides ni células, habiendo sido casi totalmente reemplazados por una sustancia amorfa acelular, posiblemente detritos celulares (proteínas desnaturalizadas, ácidos nucleicos, y otros materiales) en vías de degradación.

El *corpus* (**Fig. 24**) sufrió cambios en el mismo sentido que el *caput* aumentando la altura y la celularidad de su epitelio la primera semana. Su lumen mostraba tendencia a disminuir la densidad celular a la semana 2 y contenía, a la semana 6, un aspecto despejado de células similar al del *caput*.

La *cauda* (**Fig. 25**) pasó de contener espermatozoides y células grandes (o espermatozoides unidos por sus cabezas formando rosetas) a la semana 1, a contener células más escasas y pequeñas a la semana 2, y a tener muchos de sus conductos patentes (abiertos) a la semana 6. En esta región esto pudo haber sido facilitado por la salida de los espermatozoides hacia los conductos eferentes o a su reabsorción.

Interpretamos de estas figuras que a la semana 6 post-hipertermia las tres regiones estaban casi libres de espermatozoides, aunque (contrario a nuestras expectativas), el epitelio correspondiente a cada una aparentemente aún no había recuperado la morfología típica de los animales no tratados, además de que el lumen no estaba vacío como se veía durante las fases tempranas del desarrollo. La morfología de aspecto normal se recuperó varias semanas después, como lo

mostraron algunas observaciones histológicas (no mostradas) que hicimos posteriormente.

### 3.2. Peso, proteínas y fósforo lipídico

Durante el período que transcurrió desde la primera hasta la sexta semana post-tratamiento, el peso epididimal se redujo en un 30% (**Fig. 26**). Si bien las tres regiones del epidídimo disminuyeron de peso en ese período, la cola fue la región que mostró el descenso más pronunciado, siendo por lo tanto la región que más contribuyó a la disminución del peso total del epidídimo

Notablemente, durante la primera semana post-tratamiento hubo un aumento significativo en el contenido de proteína y de fósforo lipídico en el epidídimo. En el caso de la proteína, el aumento se produjo en los tres segmentos del epidídimo (Fig. 26), mientras que en el caso del fósforo lipídico el aumento de la semana 1 fue mayor en el *caput* que en el *corpus* y muy atenuado en la *cauda*. En el período subsiguiente a la primera semana, ambos componentes comenzaron a disminuir, las proteínas, gradualmente hasta la semana 6, pero los fosfolípidos sólo disminuyeron significativamente a la semana 6 en el cauda.

### 3.3. Composición en fosfolípidos y subclases de CGP y EGP

La composición en clases de los fosfolípidos de los tres segmentos sólo sufrió cambios sutiles durante el período entre 1 y 6 semanas post-hipertermia estudiado (**Fig. 27**). En el *caput*, la proporción de los mayoritarios CGP y EGP no se modificó, mientras el PI y la minoritaria SM mostraron una tendencia a aumentar hacia la sexta semana luego del tratamiento. En el *corpus*, las proporciones de CGP y de EGP sufrieron aumentos pequeños pero significativos a la semana 1, para luego regresar a los valores previos. El PI aumentó su proporción durante las primeras dos semanas, pasando de un 4% en los controles a un 8 % en la primera y segunda semanas, para volver al valor inicial a la sexta. Esto se reflejó en que los porcentajes de SM y de CL disminuyeron a la mitad en la primera semana para luego recuperar su proporción inicial. En la *cauda*, la proporción de los CGP tendió a disminuir entre las semanas 1 y 6, mientras los EGP nos mostraron cambio. En esta región epididimal la disminución de CGP se compensó con pequeños aunque significativos aumentos de los porcentajes de PI y de SM.

Llamativamente, un cambio que compartieron las tres regiones fue una disminución gradual de la proporción de lisoPC, que pasó de representar, respectivamente, un 7%, 4% y 5% de los fosfolípidos de *caput*, *corpus* y *cauda* en los

controles a un 3%, 2%, 2.5% de los mismos 6 semanas después de las exposiciones a la hipertermia.

En la región del *caput*, las proporciones (%) entre las tres subclases de los CGP entre las semanas 0 y 6 post-tratamiento sufrieron poco cambio, porque las tres subclases sufrieron cambios en el mismo sentido en la primera semana y subsiguientes. Lo mismo ocurrió con los EGP durante las semanas 1 y 2, pero a la semana 6 se produjo una inversión entre sus subclases mayoritarias, pues aumentó el nivel de plasmeniletanolamina en presencia de una PE cuya cantidad estaba descendiendo (**Fig. 28**).

En el *corpus*, la PC aumentó a la semana 1 para bajar a la semana 2 y volver a subir a la semana 6 a niveles similares a los controles, mientras la plasmencilolina estuvo presente hasta la semana 2, para bajar entre esta última y la semana 6. La plasmeniletanolamina y la PE sufrieron cambios en el mismo sentido que la PC.

En la *cauda*, la PC subió, aunque menos que en el *caput*, a la semana 1, y después bajó hasta alcanzar niveles similares a los controles a la semana 6. La PE y la plasmeniletanolamina se comportaron similarmente a la PC. En cambio, en esta región solamente, descendieron en forma continua los niveles de plasmencilolina, así como los de plasmencilolina y plasmeniletanolamina entre 0 y 6 semanas.

Los resultados descritos (Fig. 28) mostraron que la composición en subclases de los fosfolípidos principales no se había normalizado a la semana 6 post-tratamiento.

### **3.4. Ácidos grasos de GPL y sus subclases en regiones epididimales**

#### **3.4.1. Glicerofosfolípidos totales**

Durante el período en estudio, los GPL totales de las regiones epididimales tuvieron en común que se empobrecieron progresivamente en PUFA de la serie n-6, aunque difirieron en cuanto a los cambios en los PUFA n-9 como consecuencia de las exposiciones a la hipertermia (**Fig. 29**).

En el *caput* epididimal, el porcentaje de ácidos grasos monoenoicos tendió a aumentar progresivamente en función del tiempo hasta la semana 6, así como el de los PUFA n-9. En el *corpus*, el porcentaje de ácidos grasos monoenoicos subió significativamente en la semana 1, para disminuir a las semanas 2 y 6, en una proporción equivalente a lo que se incrementaron los PUFA n-9. En la *cauda*, aumentaron significativamente los porcentajes de ácidos grasos saturados y monoenoicos disminuyendo todos los demás.

### 3.4.2. Subclases de CGP

La fosfatidilcolina de las tres regiones del epidídimo presentó como cambios más importantes al comparar las semanas 0 y 6 una consistente disminución de su porcentaje de 22:5n-6 y una disminución menor o un aumento relativo del de 20:4n-6 (**Fig. 30**). En contraste, el porcentaje de sus PUFA n-9 aumentó en el mismo período con respecto a los animales no tratados, sobre todo en el *corpus*, quedando alto a la semana 6 en *caput* y *corpus* y tendiendo a volver al valor control en la *cauda*.

La plasménicolina mostró cambios similares a la PC en cuanto a sus PUFA n-6 en las tres regiones. En cambio, sus PUFA n-9 aumentaron en *caput*, hasta la semana 6, en el *corpus* se mantuvieron una semana para disminuir luego, y en la *cauda* disminuyeron muchas veces su porcentaje.

Mientras la proporción de 18:1 de la PC tendía a bajar a la semana 6 en el *corpus*, el de la plasménicolina se mantenía alto en las tres regiones.

### 3.4.3. Subclases de EGP

La fosfatidiletanolamina de las tres regiones presentó cambios similares a la PC en cuanto a que disminuyó en el período estudiado su porcentaje de 22:5n-6, aunque en este caso lo hizo casi simultáneamente su porcentaje de 20:4n-6 (**Fig. 31**). Como en el caso de la PC, en la PE aumentó en el mismo período la proporción de sus PUFA n-9, sobre todo en la PE del *corpus*.

La plasméniletanolamina mostró un perfil de cambios en general similar al de la PE en cuanto a sus PUFA n-6, y también en cuanto a sus PUFA n-9, destacándose que en el *corpus* el porcentaje de 22:4n-9 en la plasménicolina se mantuvo alto a la semana 6, por encima del valor tomado como control.

La proporción de 18:1 aumentó hasta las semanas 1 o 2 en las dos subclases, y se mantenía alta a la semana 6 post-tratamiento. Sólo en el *corpus* había descendido su porcentaje, aunque es necesario recordar que a la semana 6 la cantidad de este lípido estaba aumentando (Fig. 28).

## 3.5. Triglicéridos con uniones éteres en regiones epididimales

Como los GPL, los TUE totales del epidídimo aumentaron significativamente durante la primera semana, para disminuir durante la segunda y llegar a valores cercanos a los controles en el período que va entre la segunda y la sexta semana post-tratamiento de hipertermia (**Fig. 32, Fig. 34**). Cada una de las tres regiones epididimales contribuyó de forma diferencial a este cambio.



En el *caput*, la concentración de TUE por mg de proteína sufrió dos incrementos, uno en la primera y otro en la sexta semana. Tanto los alquil-DAG como los alquenil-DAG contribuyeron a ese cambio, ya que ambos cambiaron su concentración en esta forma bifásica.

En el *corpus*, que fue el segmento que inicialmente mayor concentración de TUE totales contenía, éstos aumentaron levemente la primera semana pero tendieron a disminuir en las subsiguientes. El incremento observado en la primera semana pudo atribuirse más a los alquenil-DAG que a los alquil-DAG, ya que los primeros aumentaron mientras los segundos disminuyeron, tanto en esa primera semana como en las subsiguientes. Las condiciones iniciales no habían vuelto a restablecerse a la semana 6 post-hipertermia, como lo indicó el hecho de que la relación alquil-DAG/alquenil-DAG, que inicialmente era de  $88/12 = 7$ , a la semana sexta estaba en  $60/40 = 1.5$ .

Por último, en la *cauda*, los niveles de TUE se incrementaron hasta la segunda semana, tendiendo a bajar entre ésta y la sexta. Las dos subclases de TUE aumentaron su concentración prácticamente en paralelo en las primeras dos semanas post-tratamiento, mientras que en el período siguiente la subclase alquil-DAG disminuyó más que la alquenil-DAG (**Fig. 32**). La relación alquil-DAG/alquenil-DAG, de 2.5 en los controles, a la sexta semana era de 1.5.

### 3.5.1. Ácidos grasos de los TUE

La composición de ácidos grasos de las subclases alquil-DAG y alquenil-DAG fue afectada en magnitud diferente en cada región como consecuencia de la hipertermia (**Fig. 33**).

En los *alquil-DAG*, se incrementó notoriamente su proporción de 22:5n-6 con respecto a sus controles en las tres regiones durante la primera semana, para disminuir a partir de ahí hasta valores cercanos a los iniciales a la sexta semana. Los *alquil-DAG* del *caput* incrementaron su 22:5n-6 en una mayor proporción que los de *corpus* y *cauda*: así, de alrededor de un 2% inicial estos lípidos llegaron a contener un 16%, un 6% y un 8% de 22:5n-6, respectivamente. Los *alquil-DAG* del *caput* retornaron a sus bajos porcentajes de 22:5n-6 a la semana 6, los del *corpus* estaban cerca, y los de la *cauda* se encontraban aún lejos de lograrlo (Fig. 33)

Para nuestra sorpresa, el porcentaje del inicialmente mayoritario 22:4n-9 de los *alquil-DAG* apenas se modificó en todo el período post-hipertermia, más bien mostró una tendencia a aumentar, especialmente en el *corpus*. Paralelamente a esto el porcentaje de otros ácidos grasos disminuyó, entre ellos 18:1 y 22:3n-9.

En los *alquenil*-DAG observamos cambios similares a los vistos en los alquil-DAG, aunque finalmente sólo hubo disminución del porcentaje de 22:5n-6 entre los controles y la semana 6 post-hipertermia, sin tendencia a incrementarse lo suficiente como para recuperar los valores iniciales (Fig. 33).

También se observó en el los alquenil-DAG un notable aumento en la proporción de su inicialmente mayoritario 22:4n-9 en las tres regiones, especialmente en el *corpus*, ácido graso cuyo porcentaje permanecía más alto que en los controles en las tres regiones a la semana 6.

### 3.6. Comparación entre cantidades de GPL con uniones éteres y TUE

Comparando las cantidades por segmento epididimal de GPL con una unión alquilo por una parte (plasma $\underline{m}$ anilcolina y plasma $\underline{m}$ aniletanolamina *sumadas*) y GPL con una unión alquenilo por otra (plasma $\underline{m}$ enilcolina y plasma $\underline{m}$ eniletanolamina *sumadas*), con las correspondientes cantidades de alquil-DAG y alquenil-DAG (**Fig. 34**), llamaron la atención las siguientes observaciones:

- 1) mientras los perfiles de cambio en función del tiempo post-hipertermia de los alquil-DAG y alquenil-DAG en cada región se parecieron entre sí, los de alquil-GPL y alquenil-GPL difirieron marcadamente;
- 2) llamativamente, los alquil-DAG producidos en el *caput* y la *cauda* epididimal durante la primera semana post-hipertermia superaron en cantidad a los alquil-GPL existentes *sumados*, cuyas cantidades no cambiaron demasiado en el período estudiado;
- 3) en cambio, los alquenil-DAG producidos en el *caput* y la *cauda* epididimal aumentaron durante la primera semana al mismo tiempo y en el mismo sentido en que aumentaron los alquenil-GPL;
- 4) sólo en la *cauda* parecería existir una relación entre la disminución de alquil- o alquenil-GPL y el aumento de los correspondientes TUE, alquil- o alquenil-DAG.

Esto permitiría especular que los alquil-DAG y alquenil-DAG que se incrementaron en las presentes condiciones en el *caput* y en el *corpus*, no necesariamente se formaron a partir de los alquil-GPL y alquenil-GPL sino paralelamente a ellos.

### 3.7. Comparación entre cantidades de ácidos grasos de GPL con uniones éteres y TUE

Compendiando sobre la misma base ( $\mu\text{g}$  / gramo) los cambios experimentados por los 10 ácidos grasos de los 18 lípidos estudiados en las tres regiones epididimales en función del tiempo post-tratamiento de hipertermia, (**Fig. 35**), se hizo evidente que en el epidídimo la situación fue muy distinta a la reversibilidad que experimentaron los lípidos testiculares y sus ácidos grasos en el Capítulo 1 Los GPL con 18:1n-9 como

ácido graso mayoritario (PC, PE, y los correspondientes plasmalógenos) de las tres regiones, pero muy especialmente en el *caput* epididimal, no sólo aumentaron su concentración con respecto a los controles no tratados a la semana 1 sino que continuaron haciéndolo hasta la semana 6. La cantidad de PC y de plasmenilcolina con 20:4n-6 del *caput* también aumentó hasta la semana 6 en presencia de niveles en progresiva disminución de 22:5n-6. Este último fue el único ácido graso que tendió a disminuir entre las semanas 1 y 6 en los GPL de las tres regiones, lo que podría atribuirse a su  $\beta$ -oxidación peroxisomal. Por su parte, especies con 22:4n-9 de las cuatro subclases de las tres regiones solo aumentaron su cantidad, con la excepción de la plasmenilcolina de *corpus* y *cauda*, que disminuyó. Dado que éste es un componente importante de los espermatozoides caudales (Cap. 3), esta caída puede atribuirse a la pérdida de las gametas preexistentes y a la falta de reemplazo por otras nuevas en este período.

Todas las especies de TUE aumentaron su cantidad a la semana 1 post-hipertermia (Fig. 35) en todas las regiones, pero especialmente en *caput* y *corpus*, a la semana 1 tendiendo a volver a la semana 2 a sus niveles iniciales. A partir de allí, las especies con 22:5n-6 disminuyeron, mientras las que contenían 18:1 y PUFA n-9 se mantuvieron o aumentaron nuevamente en *caput* y *corpus*. Los aumentos de los TUE en la *cauda* se mantuvieron durante más tiempo que en las otras regiones, pero a la semana 6 estaban tendiendo a normalizarse.

#### **4. EFECTOS DE LA HIPERTERMIA TESTICULAR Y EPIDIDIMAL SOBRE LA EXPRESIÓN DE ALQUIL-GLICERONA FOSFATO SINTASA (AGPS)**

En los dos órganos en estudio en esta tesis, tanto en controles como en los sometidos a los episodios de hipertermia intermitente descritos, analizamos los niveles de mRNA de la AGPS, enzima peroxisomal que juega un rol clave en la biosíntesis de los lípidos con una unión éter, como explicamos en la sección Introducción.

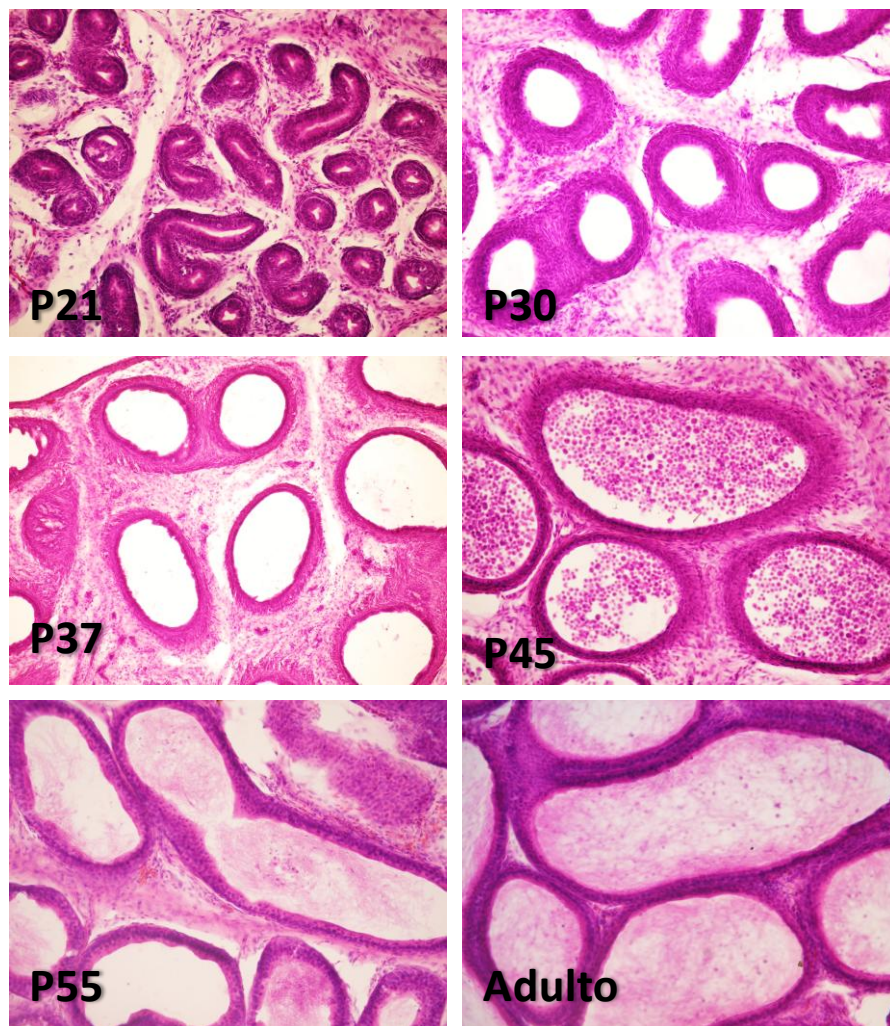
Al comparar testículo y epidídimo de ratas adultas en condiciones control, la expresión medida por los niveles de mRNA fue más de 2 veces *superior* en el epidídimo que en el testículo. Por otra parte, entre las tres regiones del epidídimo, la expresión fue más alta en el *corpus* que en el *caput*, y en éste mayor que en la *cauda* (Fig. 36).

En el caso del testículo, para esta medición incluimos una condición con la que no contamos en nuestros estudios sobre los lípidos, que fue obtener una muestra el mismo día, inmediatamente después de practicada la última de las 5 exposiciones a la hipertermia. Esto nos permitió observar que la expresión de la enzima disminuyó

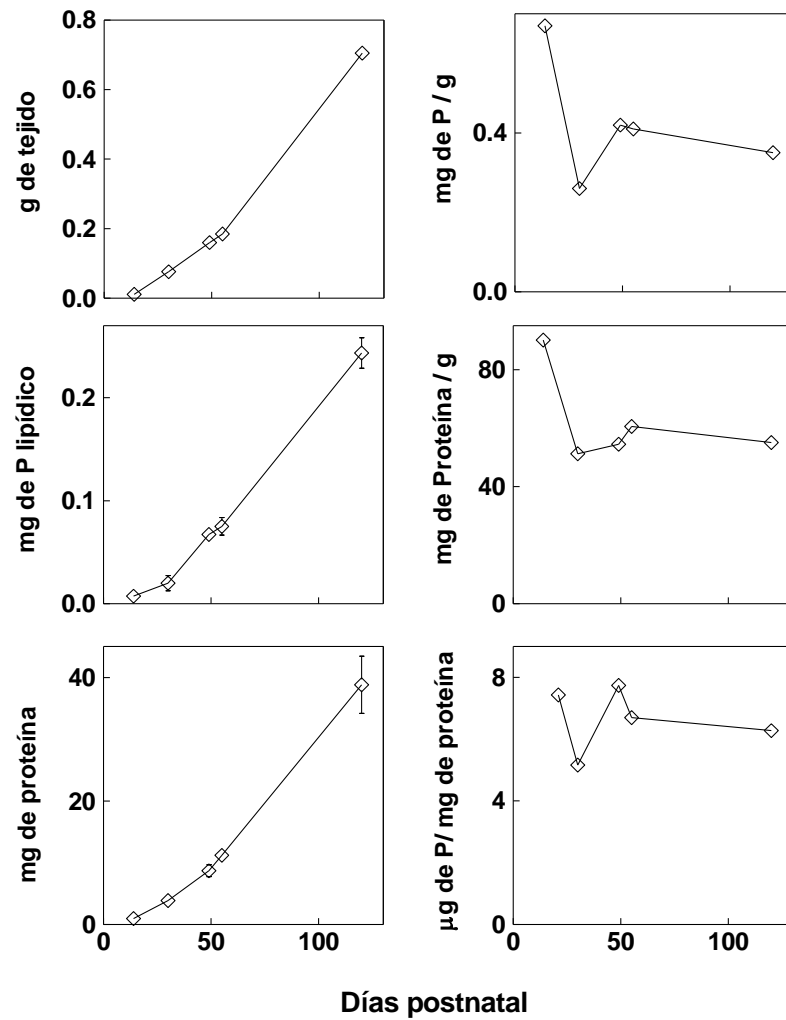
drásticamente. Dos semanas y 6 semanas después, el nivel de mRNA no difería del de los controles.

En el caso del epidídimo, en cambio, la expresión de la enzima no se afectó en forma inmediata, lo que indica que las células epididimarias no son tan sensibles a la temperatura como lo son las testiculares, en referencia a la expresión de esta enzima. En cambio en el epidídimo los niveles del rRNA disminuyeron dos semanas después de las exposiciones, lo que sugiere que en este tiempo post-hipertermia la síntesis de lípidos con uniones éteres habría perdido fuerza, la cual aún a la semana 6 no se había recuperado totalmente.

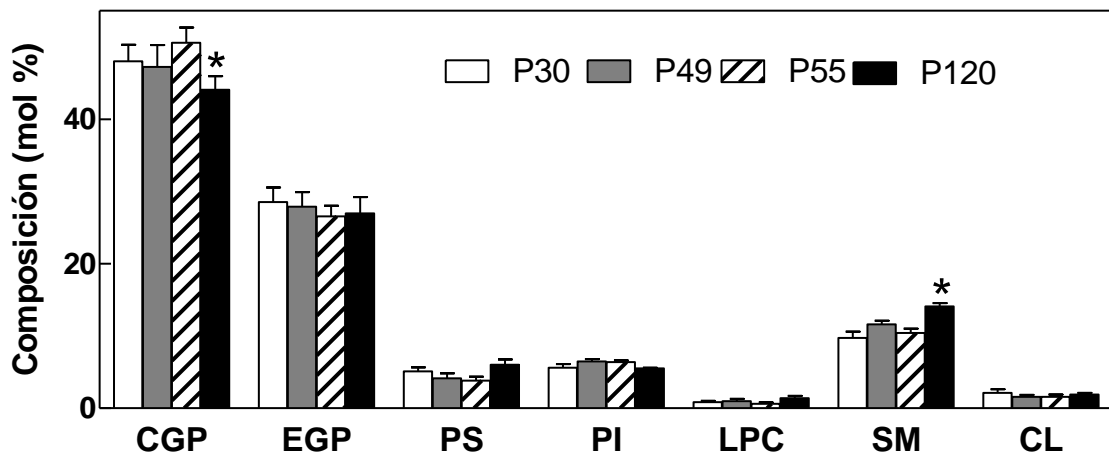
Al investigar las regiones epididimales a la semana 2 post-hipertermia, pudimos determinar que la cantidad de mRNA había disminuido más en el *caput* que en el *corpus*, y en ambas regiones más que en la *cauda*. Esto podría tener relación con el hecho de que a la semana 2 prácticamente no quedaban espermatozoides en la luz de los conductos de las primeras dos regiones, mientras que en la región caudal aún había gametas presentes. En ausencia de éstas, y en las presentes circunstancias, parece lógico que se reduzca en las células del epitelio epididimal la actividad biosintética de lípidos con una unión éter, posiblemente a favor de la actividad fagocítica y catabólica hacia los mismos, hasta lograr la reversión de los efectos dañinos de la hipertermia.



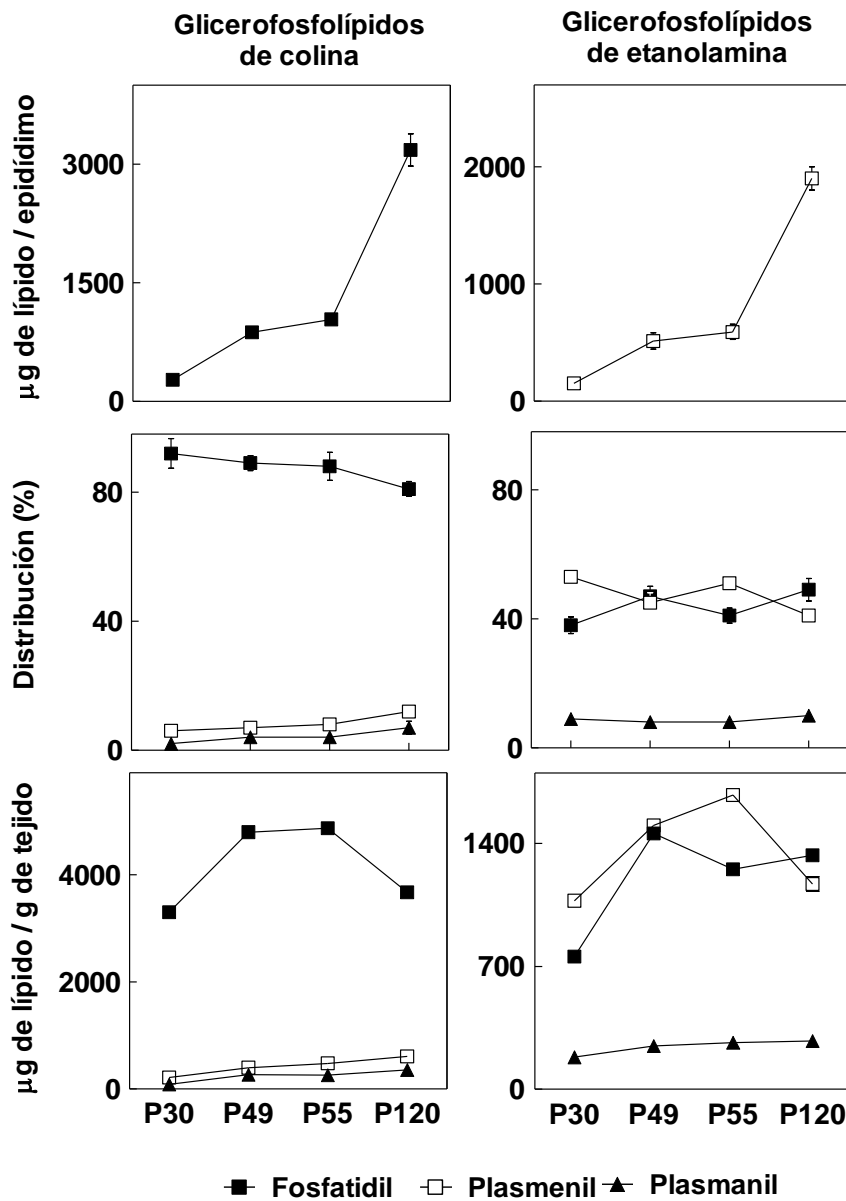
**Fig 1.** Cambios en la histología del epidídimo en función del desarrollo postnatal. Se observan fotomicrografías de secciones de epidídimo de rata, teñidas con hematoxilina-eosina (40x) a los períodos postnatales especificados. Nótese el aumento gradual del diámetro de los conductos epididimales y la aparición de espermatozoides en la luz de los conductos a partir del día 55. Al día postnatal 45 una población de células germinales provenientes del epitelio seminífero aparece en los conductos epididimales.



**Fig 2.** Aumentos en el peso y en la cantidad de fosfolípidos y de proteínas totales por epidídimo con el desarrollo postnatal. A la derecha se muestran las concentraciones de fósforo lipídico y de proteína por gramo de tejido, y de fósforo lipídico por mg de proteína.

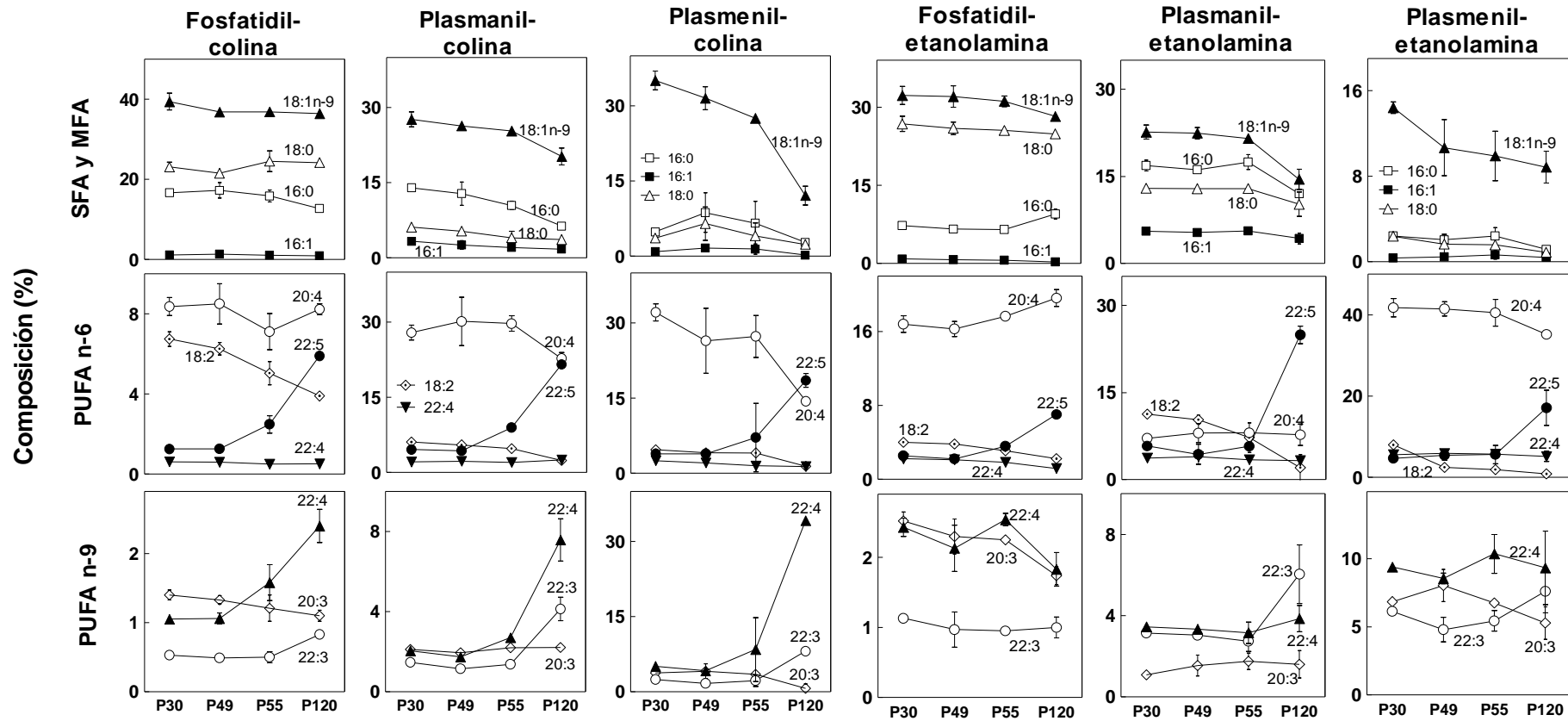


**Fig. 3.** Composición en fosfolípidos del epidídimo en distintos momentos del desarrollo postnatal. CGP y EGP, glicerofosfolípidos de colina y de etanolamina, respectivamente. PI, fosfatidilinositol; CL, cardiolipina; PS, fosfatidilserina; SM, esfingomielina. Los asteriscos (\*) denotan diferencias significativas con respecto a P30.

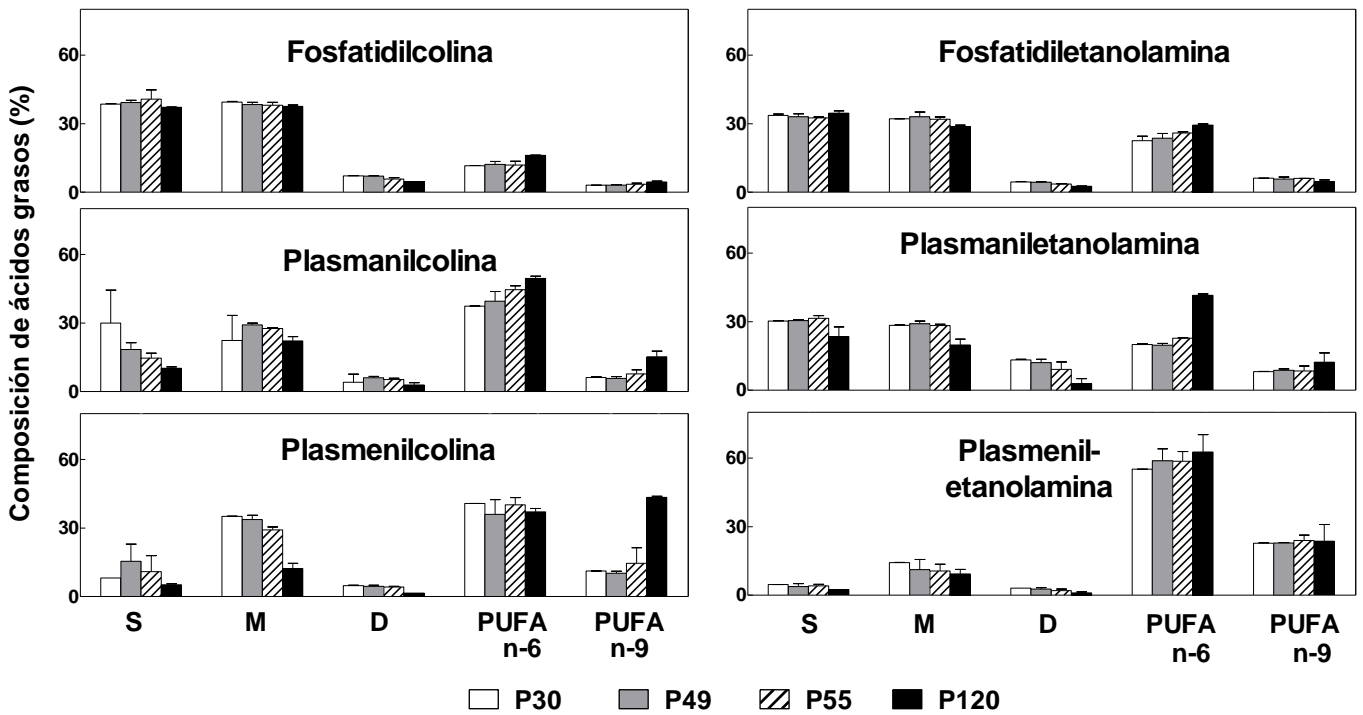


**Fig 4.** Cambios con el desarrollo postnatal en el contenido y composición de CGP, de EGP y de sus tres subclases en el epidídimo. En paneles superiores se muestra la cantidad de CGP y EGP por epidídimo, en los centrales los porcentajes entre las subclases y en los inferiores las correspondientes cantidades por gramo de tejido.

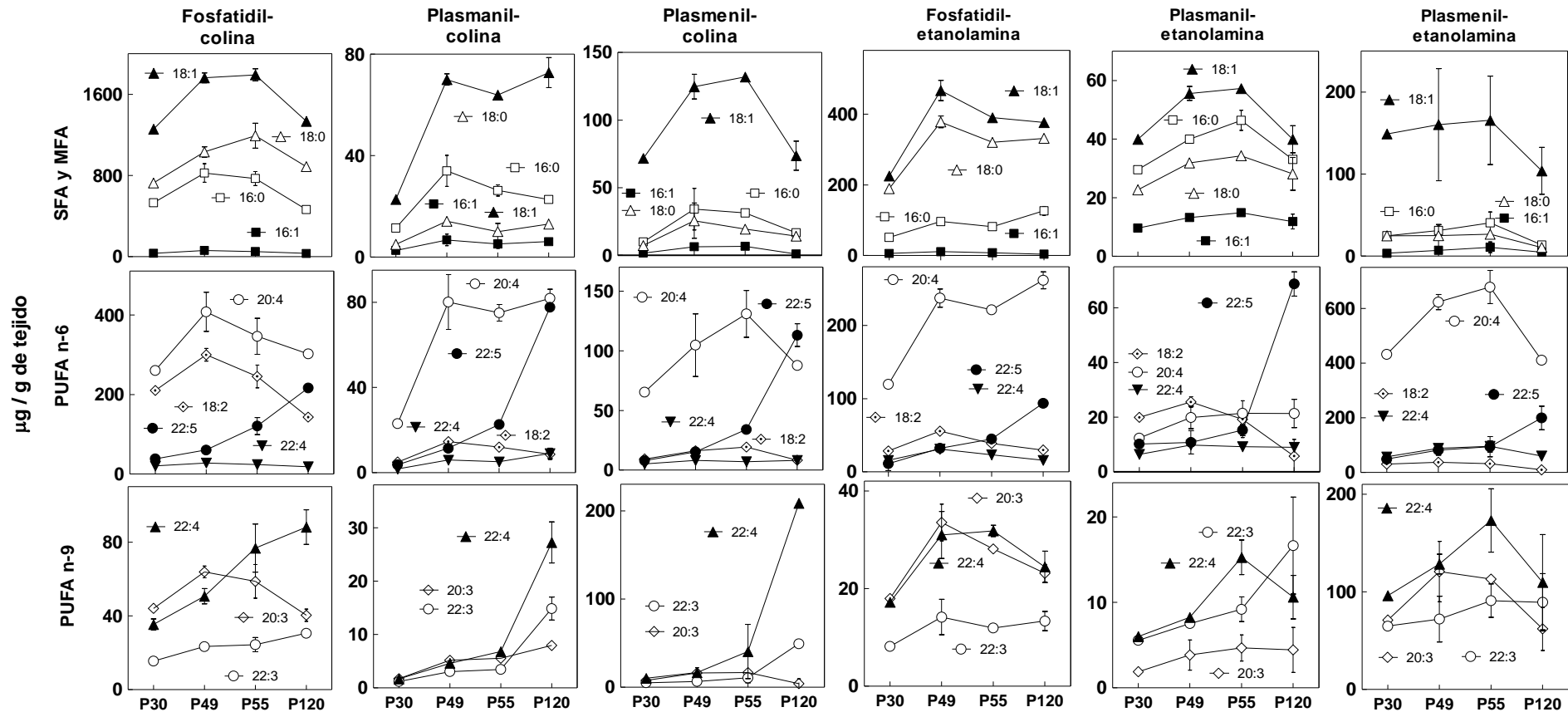




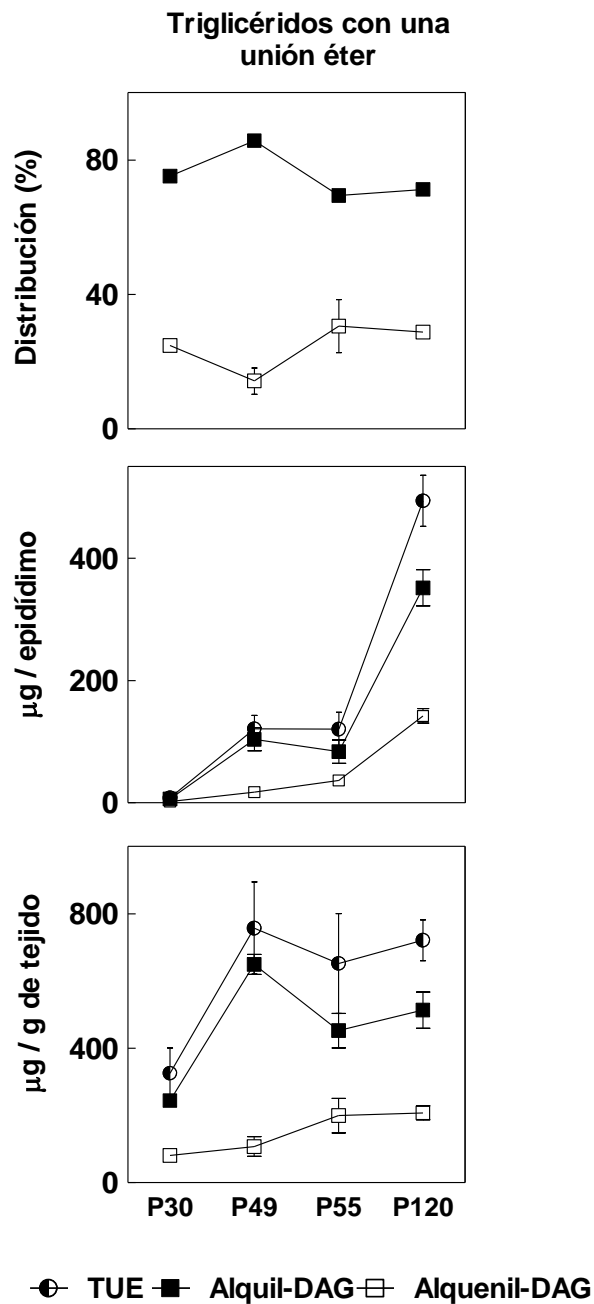
**Fig. 5.** Cambios en la composición de ácidos grasos (%) de subclases de CGP y de EGP epididimales con el desarrollo postnatal. Se destaca el notable incremento de la proporción de PUFA de la serie n-9, con disminución de la de 18:1 n-9, en los GPL de colina, especialmente importante en la plasmenilcolina del adulto. A diferencia de los CGP, en los tres subclases de EGP, en el epidídimo adulto predominaron los PUFA de la serie n-6 con respecto a los n-9.



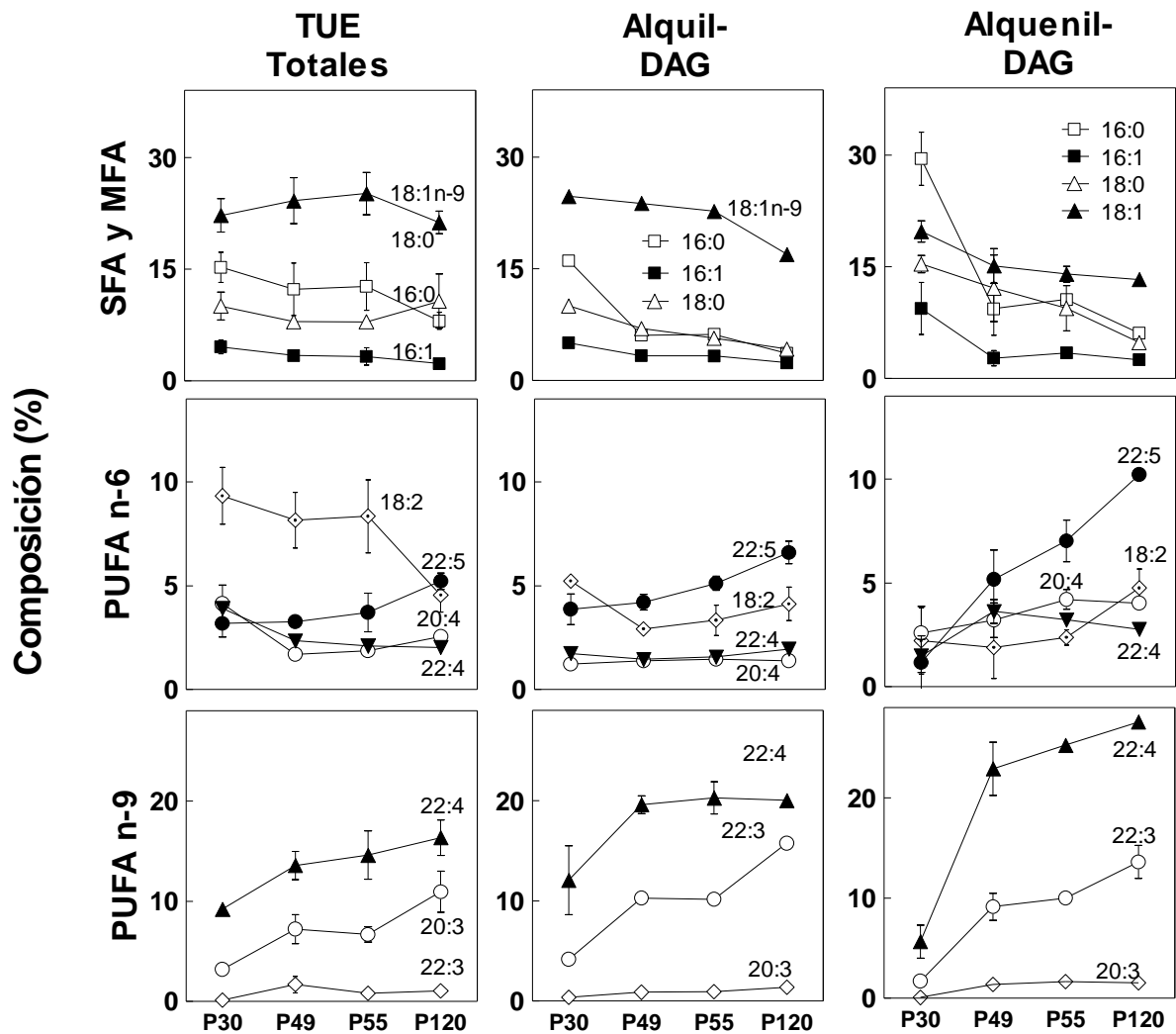
**Fig 6.** Proporciones entre los principales grupos de ácidos grasos en las tres subclases de CGP y de EGP epididimales. Las barras representan las sumas de los ácidos grasos mostrados en la Fig. 5 agrupados como sigue: S, saturados; M, monoenoicos; D, dienoicos; PUFA, poliinsaturados. Los PUFA se agruparon según las series a las que pertenecen, n-6, o n-9.



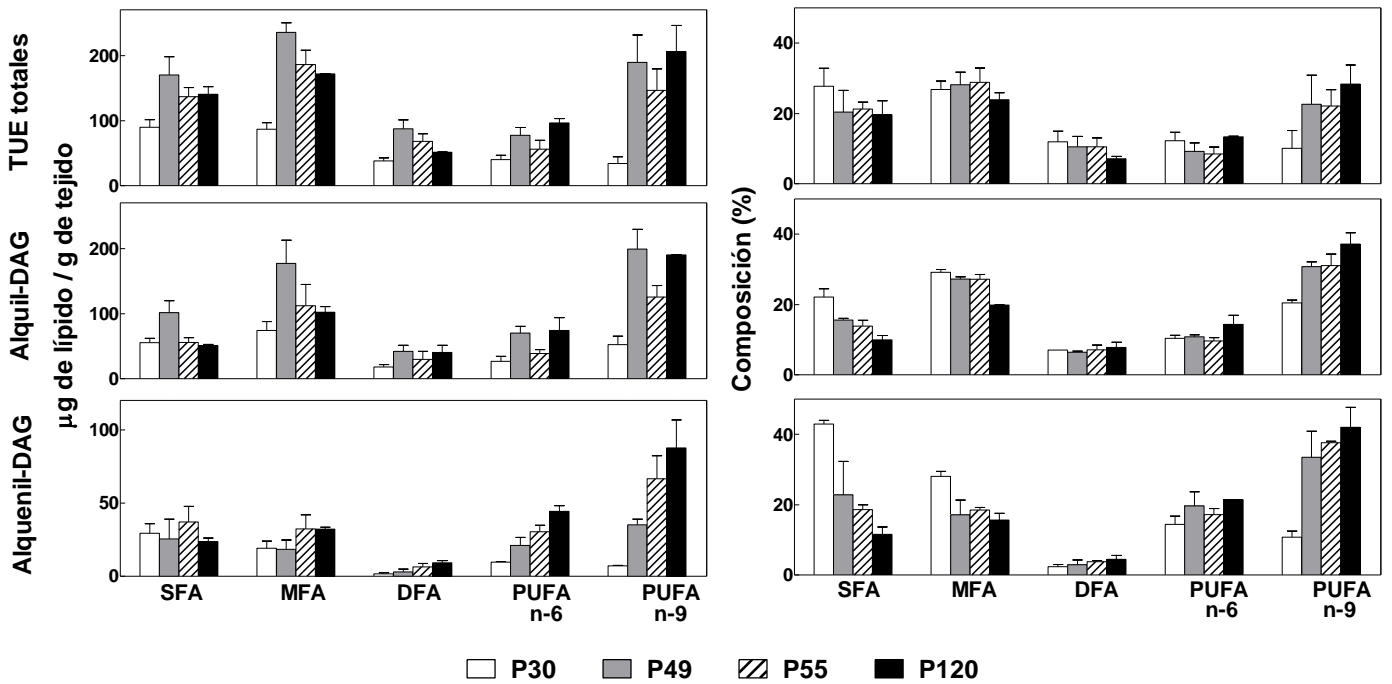
**Fig. 7.** Cambios cuantitativos en los ácidos grasos de las subclases de CGP y de EGP del epidídimo de rata con el desarrollo postnatal. Se aprecia la ganancia de 22:5n-6 en las seis subclases, y de 20:4n-6 en la PE y en la plasmanilcolina. En el adulto, las tres subclases de los CGP incorporaron más 22:4n-9 que las correspondientes subclases de los EGP.



**Fig 8.** Cambios en función del desarrollo postnatal en las proporciones, contenido y concentración de los triglicéridos con una unión éter (TUE) epididimales. En el panel superior se muestra la distribución porcentual, en el medio la cantidad absoluta, y en el inferior la concentración por gramo de las dos subclases de triglicéridos que tienen una unión éter, los 1-O-alkil-2,3-acil-*sn*-diacilgliceroles (alkil-DAG) y los 1-O-1'-enil 2,3-acil-*sn*-diacilgliceroles (alquenil-DAG), así como su suma (TUE).



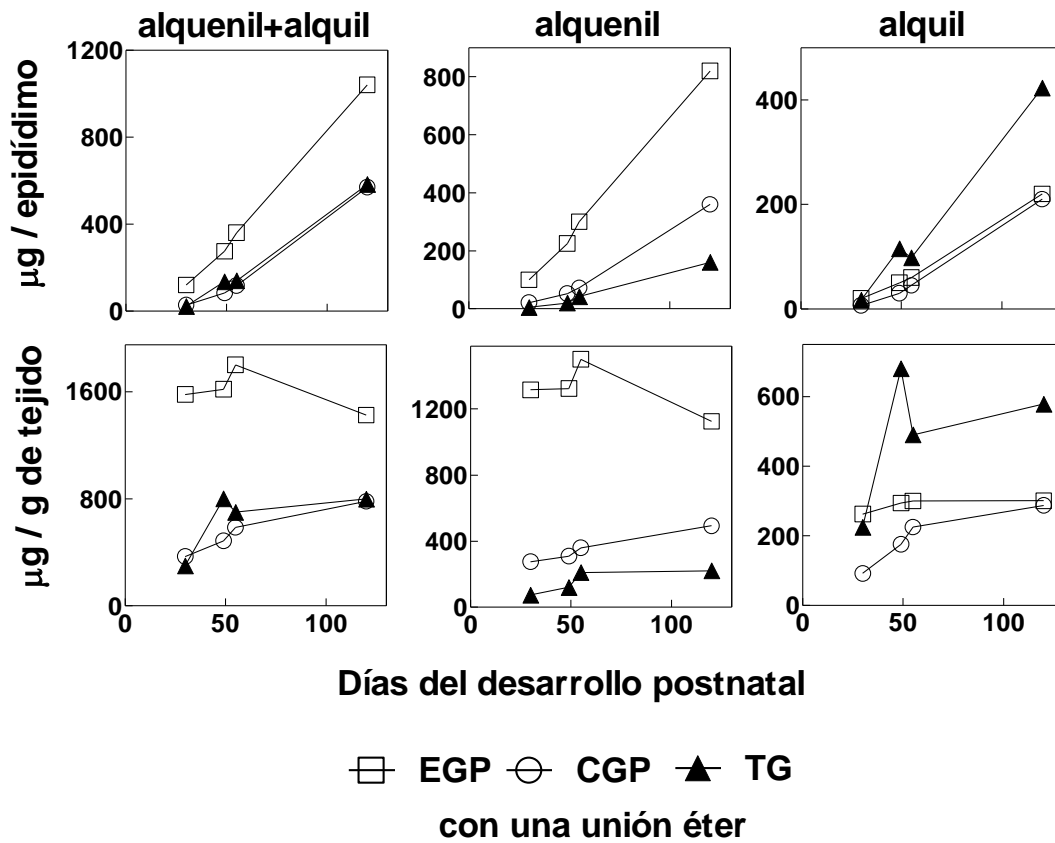
**Fig 9.** Cambios en función del desarrollo postnatal en la composición de ácidos grasos de los TUE epididimales. El cambio más llamativo por lo dominante fue el aumento en la proporción de 22:4n-9, así como de 22:3n-9, en las dos subclases, en especial en los alquenil-DAG.



**Fig 10.** Resumen de las variaciones con el desarrollo en las concentraciones (a la izquierda) y porcentajes (a la derecha) de los principales *grupos* de ácidos grasos de los TUE totales, alquil-DAG y alquenil-DAG epididimales. Un cambio llamativo en la *cantidad*, que no se notó en los %, fue el incremento de la concentración de TUE conteniendo MFA y PUFA n-9 al día postnatal 49.

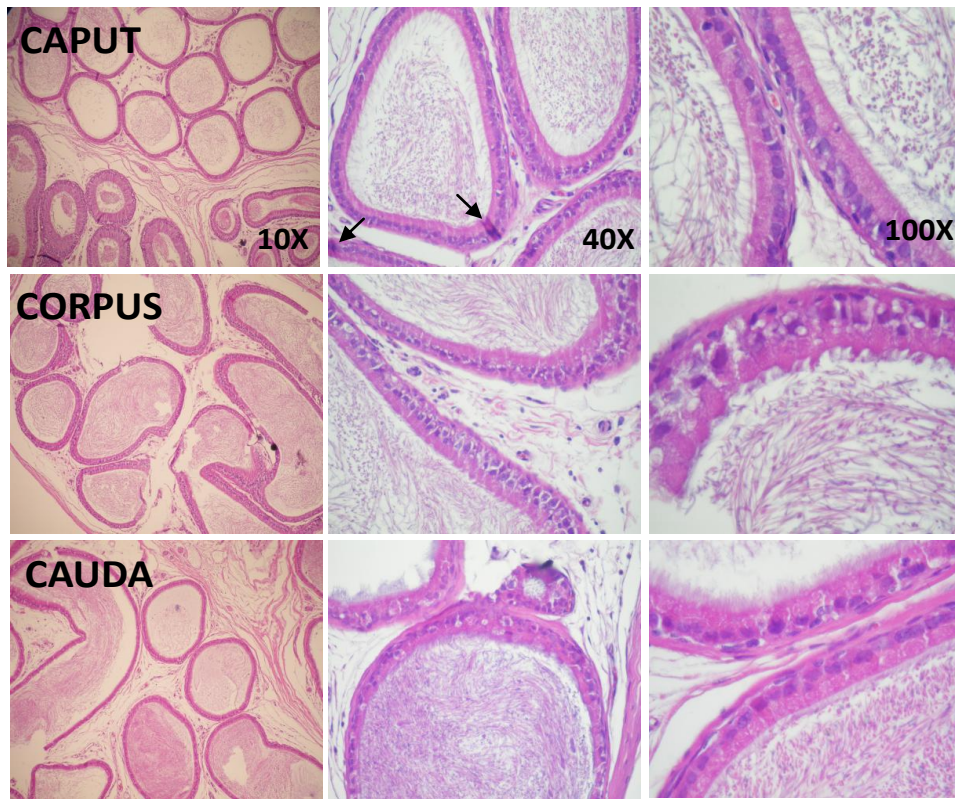
**Tabla 1**  
**Diferencias en la composición de ácidos grasos entre los dos triglicéridos con una unión éter de epidídimo de rata adulta**

	<b>TUE totales</b>	<b>Alquil-DAG</b>	<b>Alquenil-DAG</b>
<b>Ácido graso</b>	<b>% del total de ácidos grasos</b>		
<b>16:0</b>	8.07 ± 1.14	3.65 ± 0.69	6.67 ± 1.49
<b>16:1</b>	2.34 ± 0.40	2.40 ± 0.47	2.71 ± 0.63
<b>17:0</b>	0.86 ± 0.83	2.12 ± 1.67	0.20 ± 0.05
<b>17:1</b>	0.30 ± 0.07	0.49 ± 0.44	0.17 ± 0.03
<b>18:0</b>	10.72 ± 3.63	4.24 ± 0.21	4.69 ± 0.55
<b>18:1</b>	21.28 ± 1.52	16.95 ± 0.85	12.73 ± 1.29
<b>18:2</b>	4.56 ± 1.16	4.13 ± 1.39	3.03 ± 1.16
<b>18:3n-6</b>	0.46 ± 0.08	0.80 ± 0.47	0.32 ± 0.07
<b>20:2</b>	2.61 ± 0.50	3.72 ± 0.06	1.44 ± 0.06
<b>20:3n-9</b>	1.07 ± 0.01	1.41 ± 0.57	1.66 ± 0.02
<b>20:3n-6</b>	0.62 ± 0.29	0.69 ± 0.44	0.51 ± 0.02
<b>20:4n-6</b>	2.56 ± 0.36	1.40 ± 0.20	4.93 ± 1.11
<b>22:3n-6</b>	2.48 ± 0.46	2.88 ± 0.78	1.72 ± 0.38
<b>22:3n-9</b>	10.96 ± 2.91	15.76 ± 3.07	12.75 ± 2.22
<b>22:4n-9</b>	16.36 ± 2.50	20.04 ± 0.71	27.63 ± 3.40
<b>22:4n-6</b>	2.03 ± 0.09	1.96 ± 0.18	2.76 ± 0.32
<b>22:5n-6</b>	5.23 ± 0.56	6.61 ± 0.93	11.14 ± 1.28
<b>24:4n-9</b>	5.49 ± 1.46	7.20 ± 0.88	2.34 ± 0.01
<b>24:5n-6</b>	2.00 ± 0.46	3.56 ± 1.18	2.60 ± 0.56
<b>SFA</b>	19.65 ± 3.95	10.00 ± 1.20	11.20 ± 0.82
<b>MFA</b>	23.92 ± 1.99	19.85 ± 0.06	16.02 ± 0.40
<b>DFA</b>	7.17 ± 0.66	7.84 ± 1.45	6.06 ± 0.72
<b>PUFA</b>	49.26 ± 6.60	62.31 ± 0.32	66.72 ± 1.95

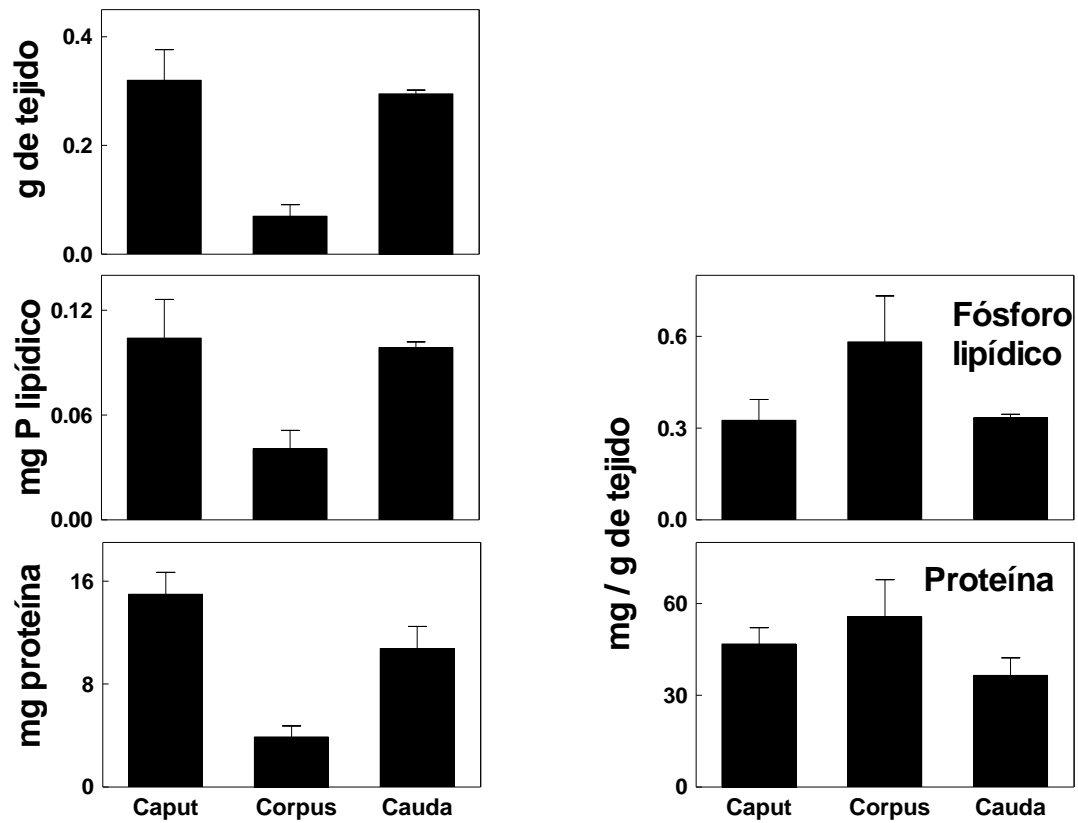


**Fig.11.** Resumen comparativo de los cambios que ocurren en la cantidad de lípidos con una unión éter en el epidídimo con el desarrollo. Los lípidos con una unión alqueniilo, en especial la plasmeniletanolamina, y los triglicéridos (TG) con una unión alqueniilo se incrementaron el día 55 postnatal. En cambio, los TG con una unión alquilo (alquil-DAG) presentaron un máximo en su nivel el día postnatal 49.



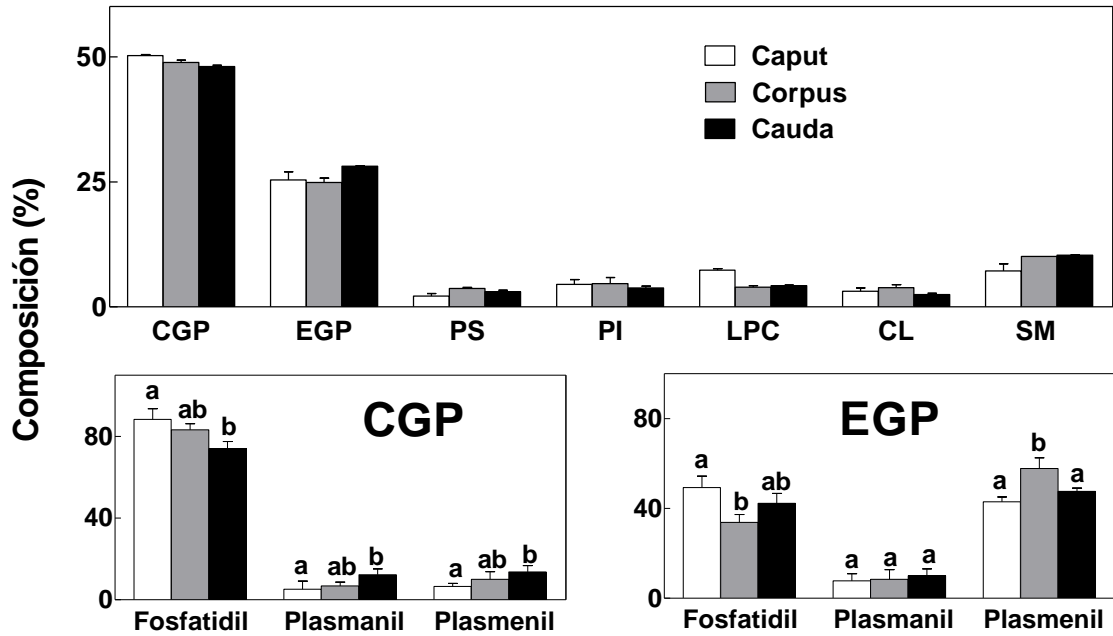


**Fig. 12.** Histología de los tres segmentos del epidídimo de rata adulta coloreada con hematoxilina-eosina (10,40 y 100x). Las flechas negras señalan las células narrow.

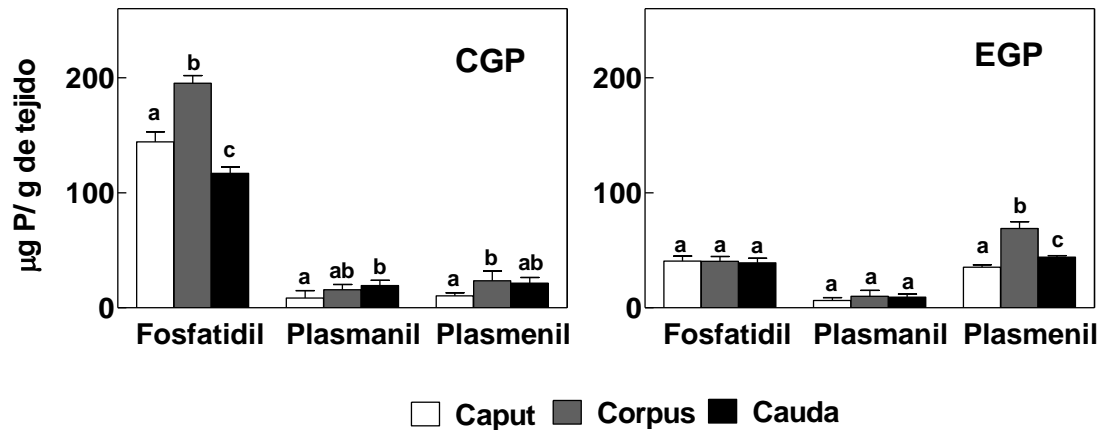


**Fig. 13.** Valores promedios del peso y del contenido de fósforo lipídico y de proteína total en las tres regiones epididimales. Es de destacar que la porción más pequeña, el cuerpo, presentó la mayor concentración de fosfolípidos, y también de proteína, por gramo.

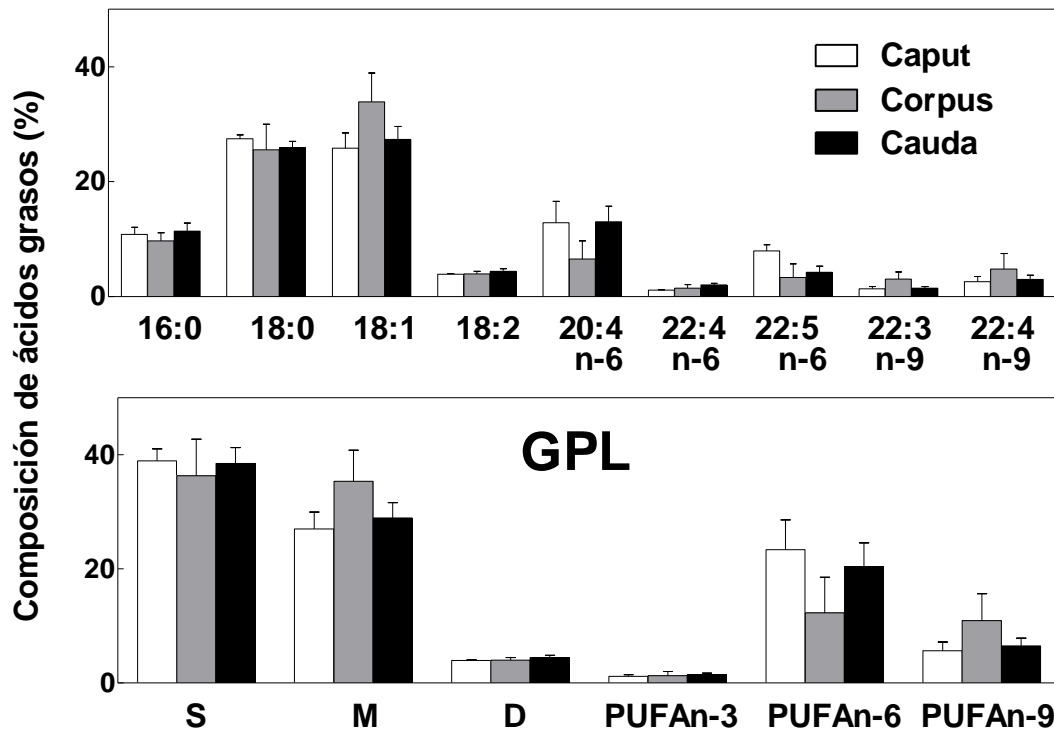
A



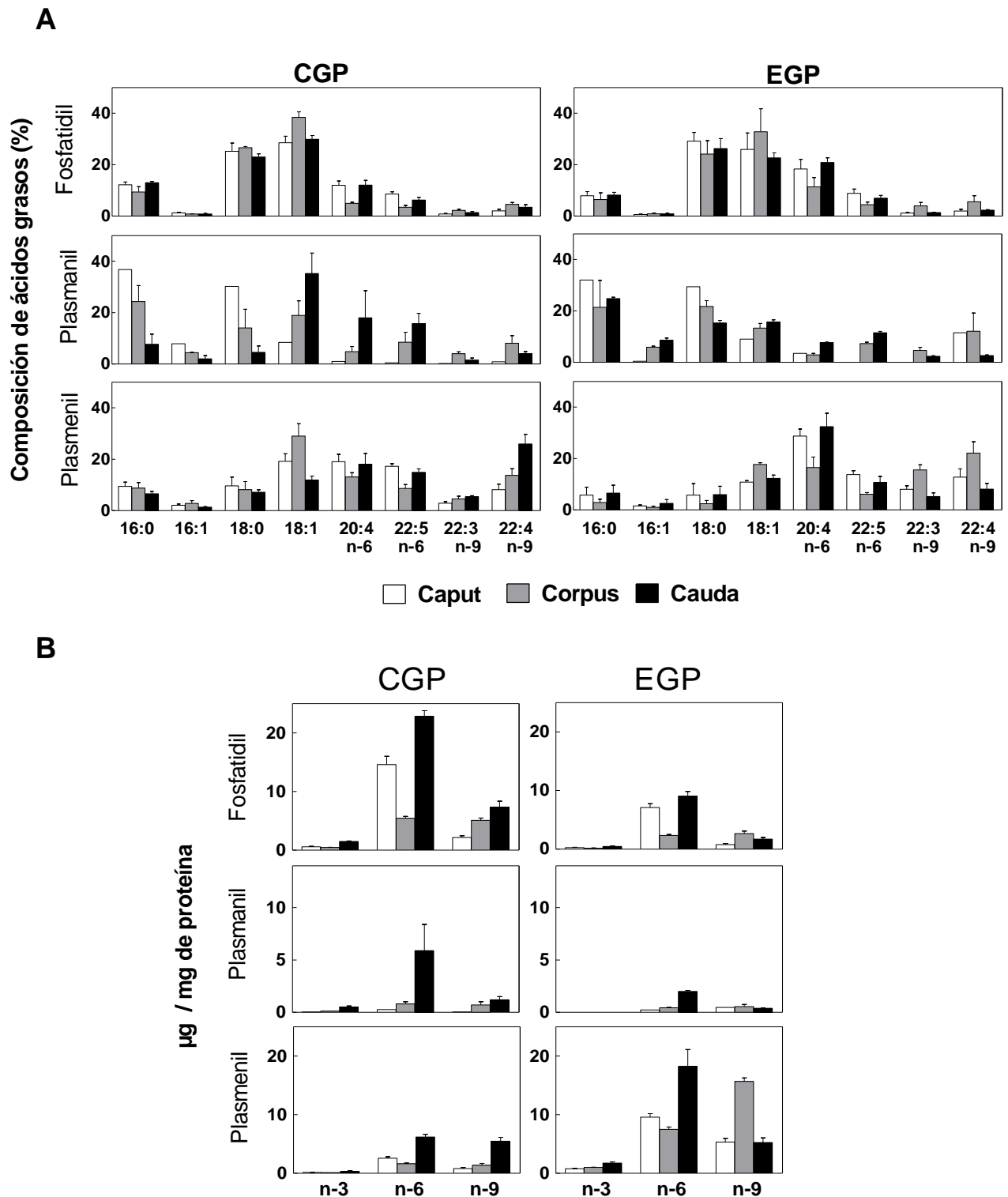
B



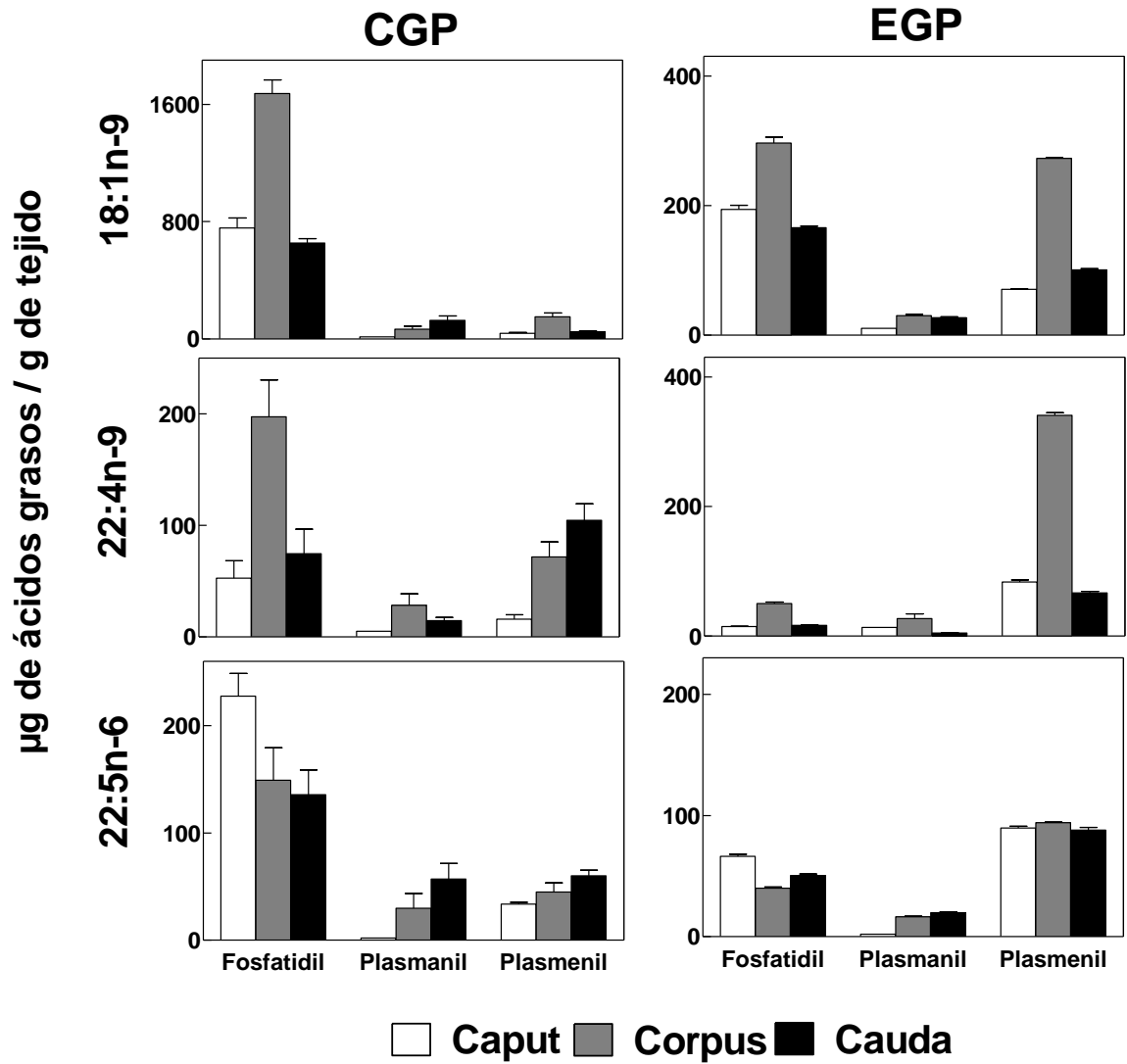
**Fig. 14.** Clases y subclases de fosfolípidos principales en las tres regiones del epidídimo de rata. A) Composición de fosfolípidos y porcentajes de las subclases de CGP y de EGP. B) Contenido por región epididimaria de las tres subclases de CGP y EGP. Las concentraciones de fosfatidilcolina y de plasmeniletanolamina fueron significativamente mayores en el *corpus* que en las otras dos regiones. Las diferentes letras de a-c denotan diferencias significativas entre las muestras con  $p < 0.05$ .



**Fig 15.** Ácidos grasos de los glicerofosfolípidos (GPL) totales en las tres regiones epididimales. En el panel superior se muestran ácidos grasos destacados de los GPL totales de las tres regiones epididimales, y en el inferior se muestran los principales grupos de ácidos grasos. S, saturados; M, monoenoicos; D, dienoicos; PUFA, poliinsaturados, agrupados según la serie. El ácido graso individual más abundante de los GPL totales del epidídimo fue el 18:1n-9, especialmente en el *corpus*. En esta región también hubo más PUFA n-9 que en las otras dos regiones

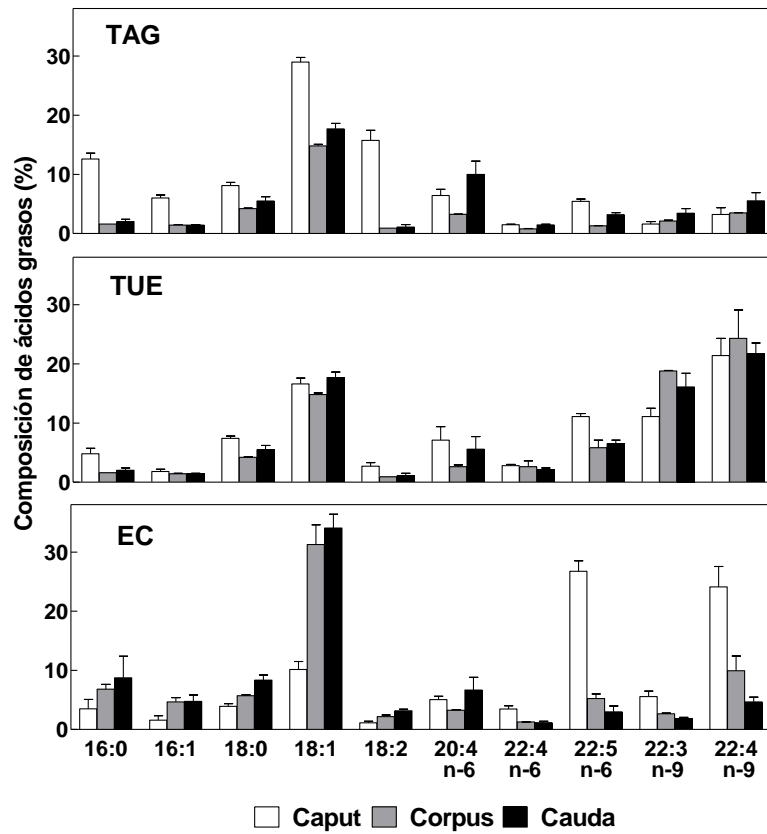


**Fig. 16.** Composición de ácidos grasos (A) y cantidades de los tres grupos principales de PUFA (B) en las tres subclases de los CGP y EGP de las tres regiones del epidídimo. La plasmeniletanolamina con PUFA n-9 (22:3, 22:4n-9) estuvo altamente concentrada en el corpus (barras grises), no sólo en proporción sino en cantidad absoluta (más de dos veces superior en el cuerpo que en las otras dos regiones).

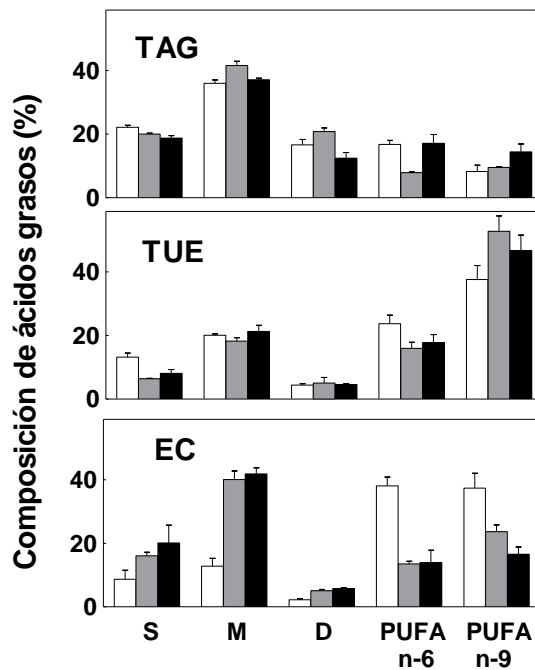


**Fig.17.** Concentración de tres ácidos grasos representativos en las tres subclases de CGP y EGP. En el *corpus*, la PC con 18:1n-9 y la plasmeniletanolamina con 22:4n-9 fueron las subclases mayoritarias.

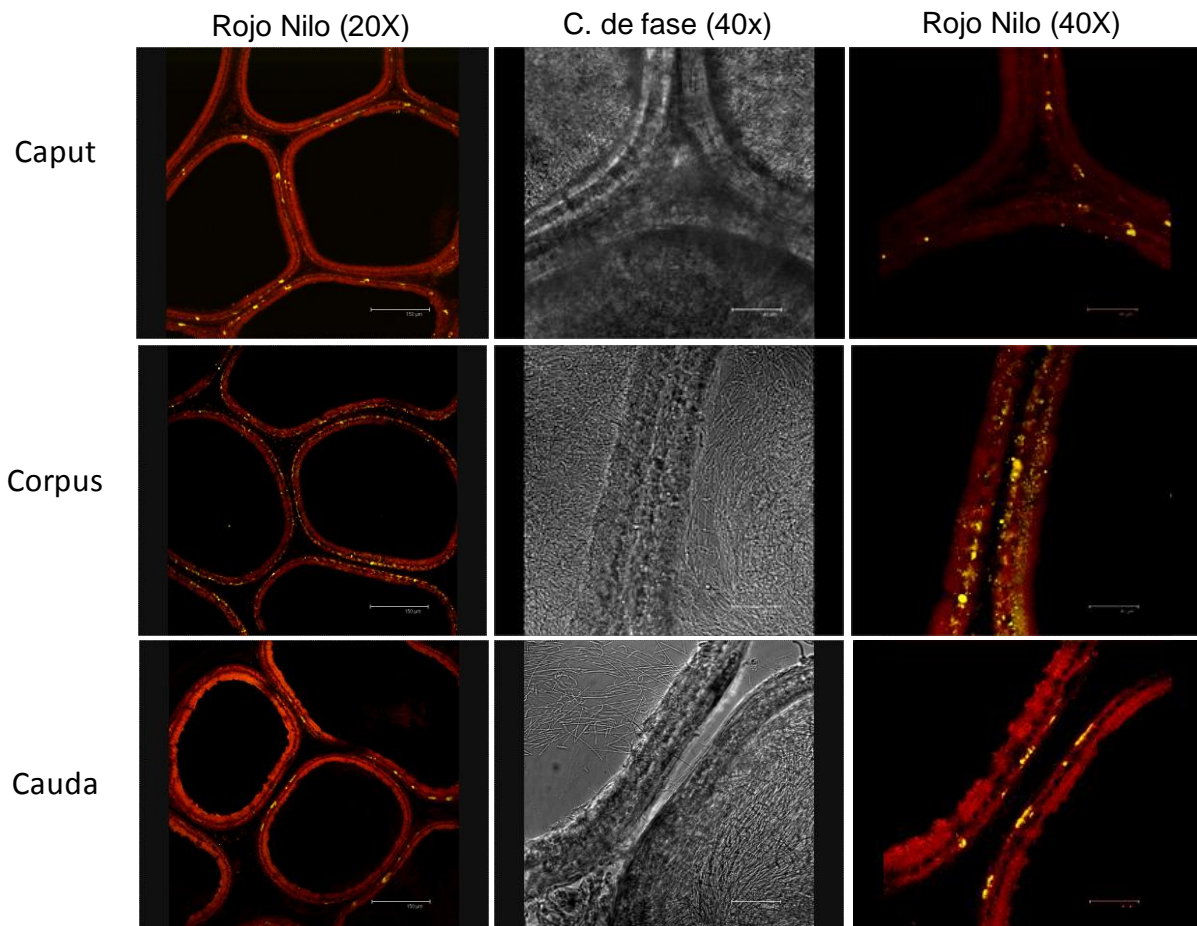
A



B

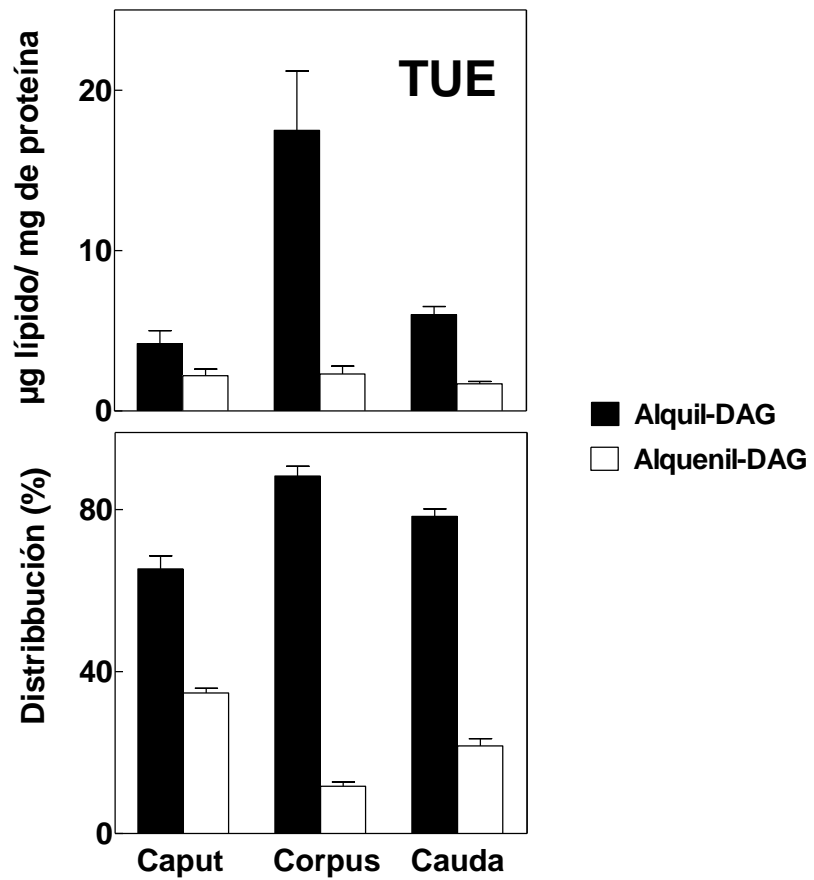


**Fig 18.** Composición de triacilgliceroles (TAG), triglicéridos con una unión éter (TUE) y ésteres de colesterol (EC) de las tres regiones epididimales. A) ácidos grasos individuales B) ácidos grasos agrupados en S, saturados; M, Monoenoicos; D, dienoicos, P, PUFA.

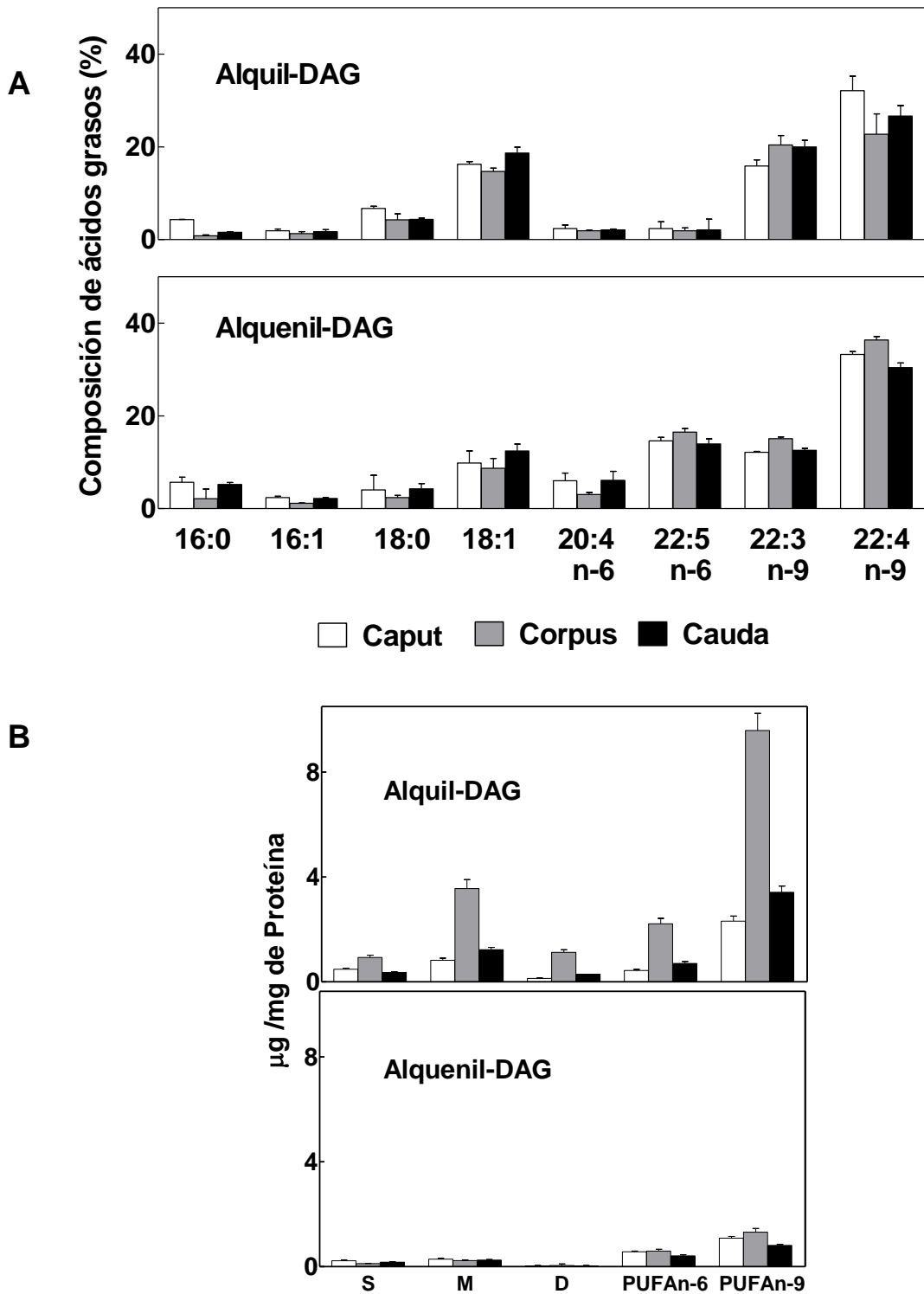


**Fig 19.** Presencia de gotas lipídicas en distintas regiones del epidídimo. Se muestran fotomicrográficas de criocortes de conductos epididimales de las tres regiones, observadas con contraste (C.) de fase y teñidas con Rojo Nilo para poner en evidencia gotas lipídicas. Nótese que mientras en la cabeza y la cola hay gotas lipídicas grandes cercanas a la parte basal, en el cuerpo coexisten gotas grandes con gotas más pequeñas distribuidas por todo el citoplasma de las células epiteliales.

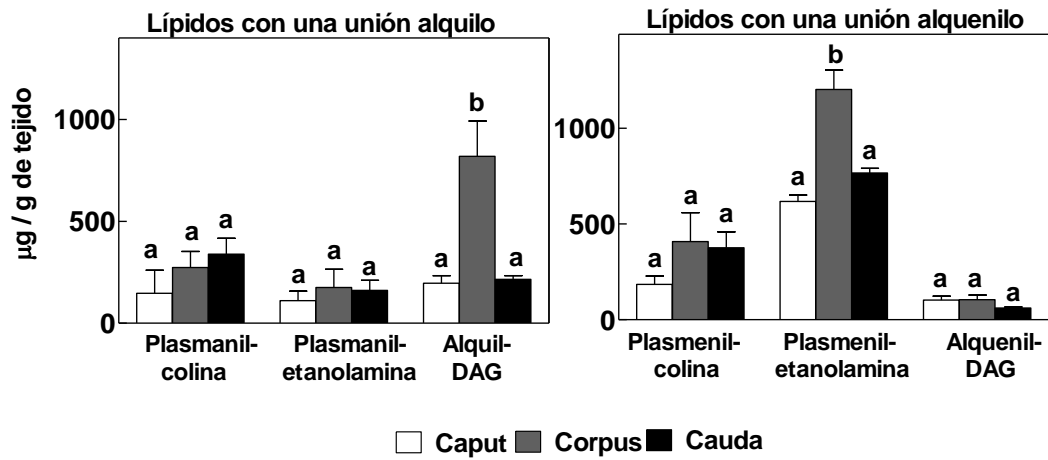




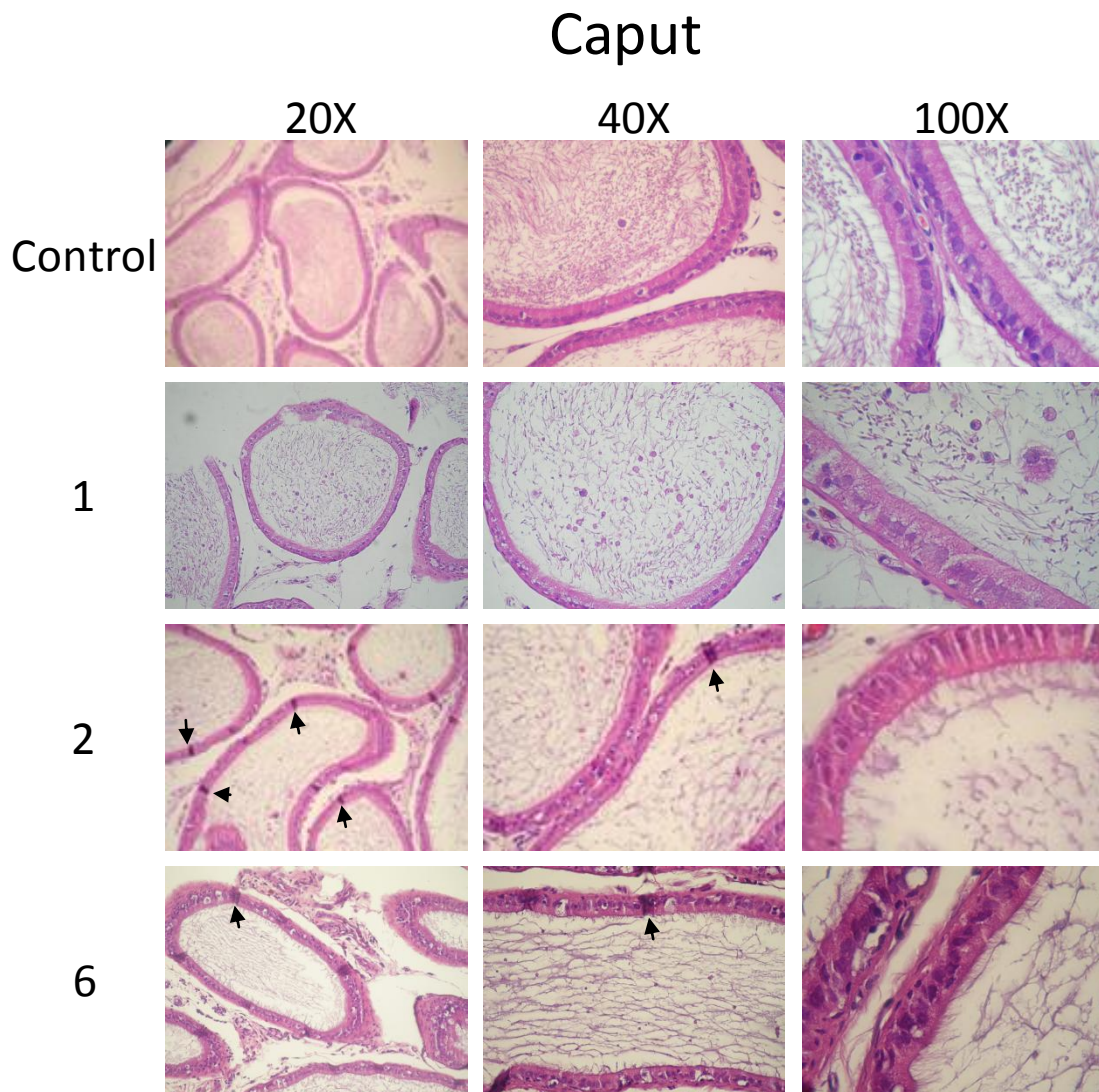
**Fig 20.** Concentración de, y proporciones entre, las dos subclases de triglicéridos con una unión éter (TUE) en las regiones epididimales. Se destaca la abundancia de TUE en el corpus, y que ésta fue principalmente contribuida por los alquil-DAG en esta región, pues los niveles de alquenil-DAG fueron similares en las tres regiones.



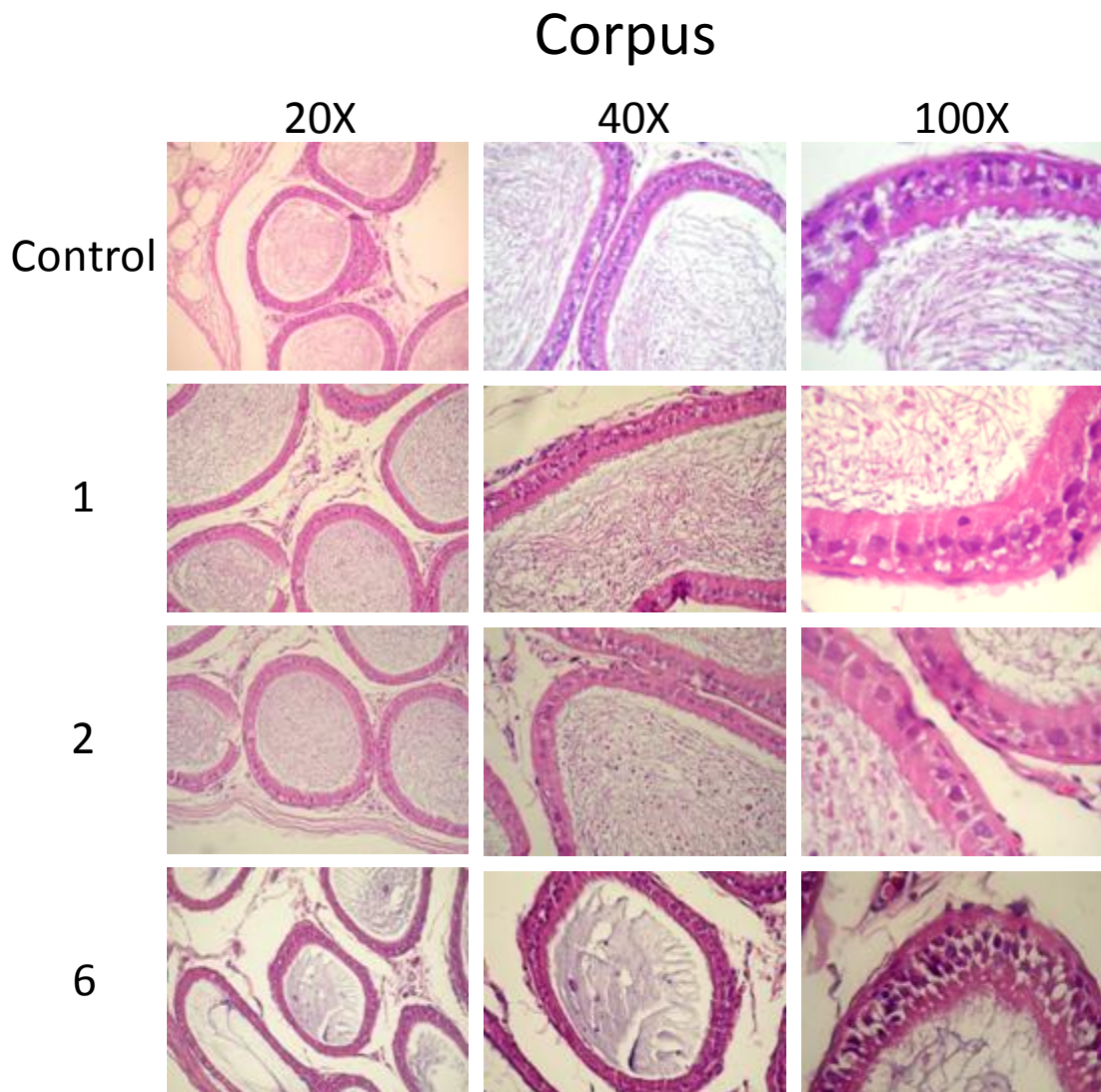
**Fig. 21.** Ácidos grasos principales en las dos subclases de triglicéridos con una unión éter en las tres regiones del epidídimo. En A) se observa que el 22:4n-9 fue el PUFA predominante en ambas subclases. En B) se presentan las concentraciones, representadas sobre la misma base para facilitar la comparación entre ácidos grasos agrupados en S, saturados,; M, Monoenoicos; D, dienoicos, PUFA n-6 y n-9.



**Fig. 22.** Comparación entre los niveles de lípidos neutros y polares con uniones éteres en el epidídimo. Se comparan en las tres regiones indicadas los niveles de CGP, EGP y TG con una unión alquilo y con una unión alqueniilo, expresados sobre la misma base (contenido de ácidos grasos por gramo de tejido). Se destaca la importancia de los alquil-DAG en el corpus, superior a las demás subclases, a excepción de la plasmeniletanolamina. Las diferentes letras de a-b denotan diferencias significativas entre las muestras con  $p < 0.05$ .

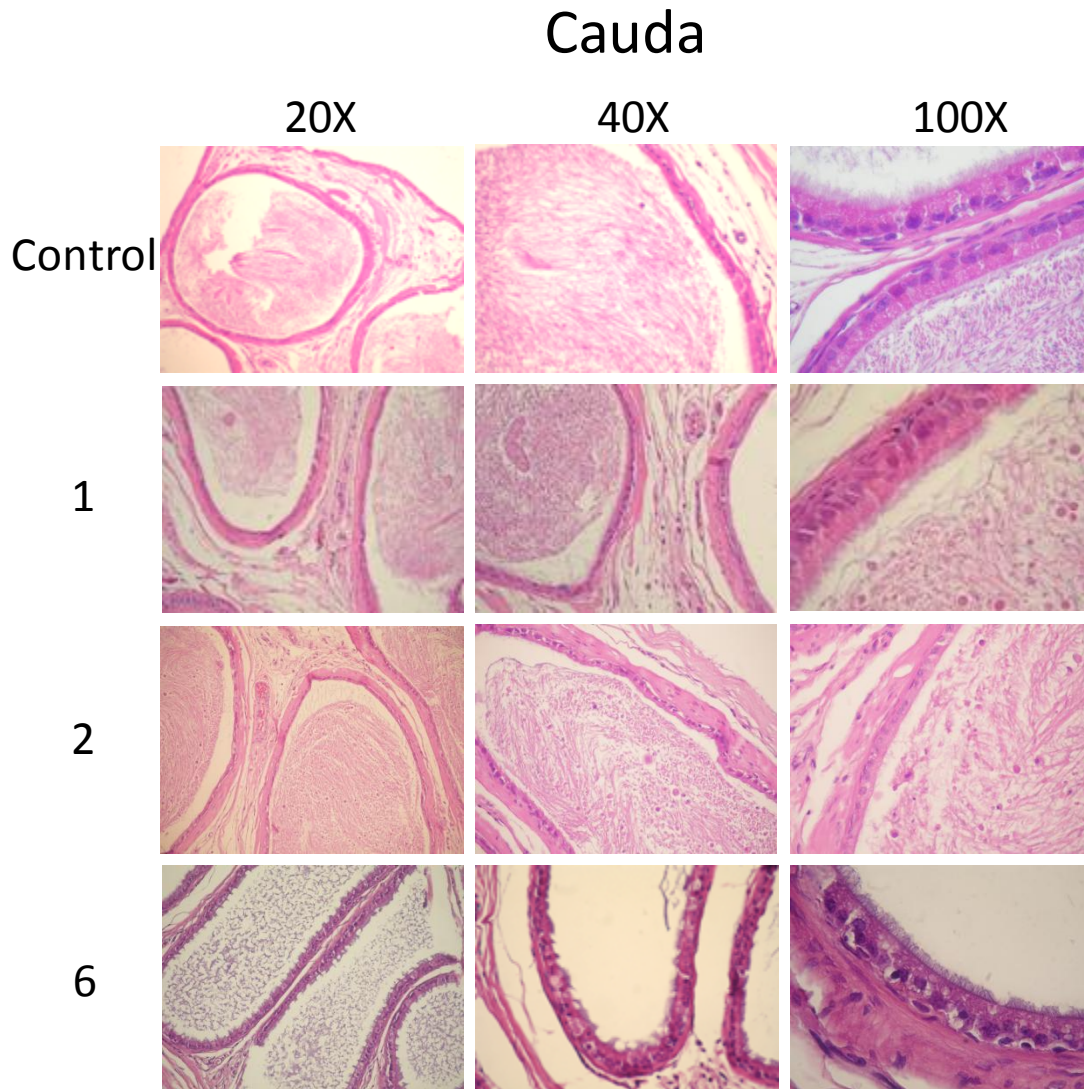


**Fig. 23.** Cambios en la histología de la cabeza epididimal semanas después de la hipertermia. Se muestran fotomicrografías de secciones de la región de la cabeza (caput) del epidídimo coloreadas con hematoxilina-eosina a diferentes tiempos (los números 1, 2 y 6 indican las semanas) después de 5 días seguidos de exposiciones de 15 minutos de duración (una por día) a 43°C. Nótese la presencia de células y espermatozoides dañados en la luz de los conductos, en la primera semana y la disminución gradual de los mismos y su reemplazo por una sustancia amorfa en el interior de los conductos, a partir de la semana 2. Note el incremento a la semana 2 en la presencia de células narrow (flechas negras).

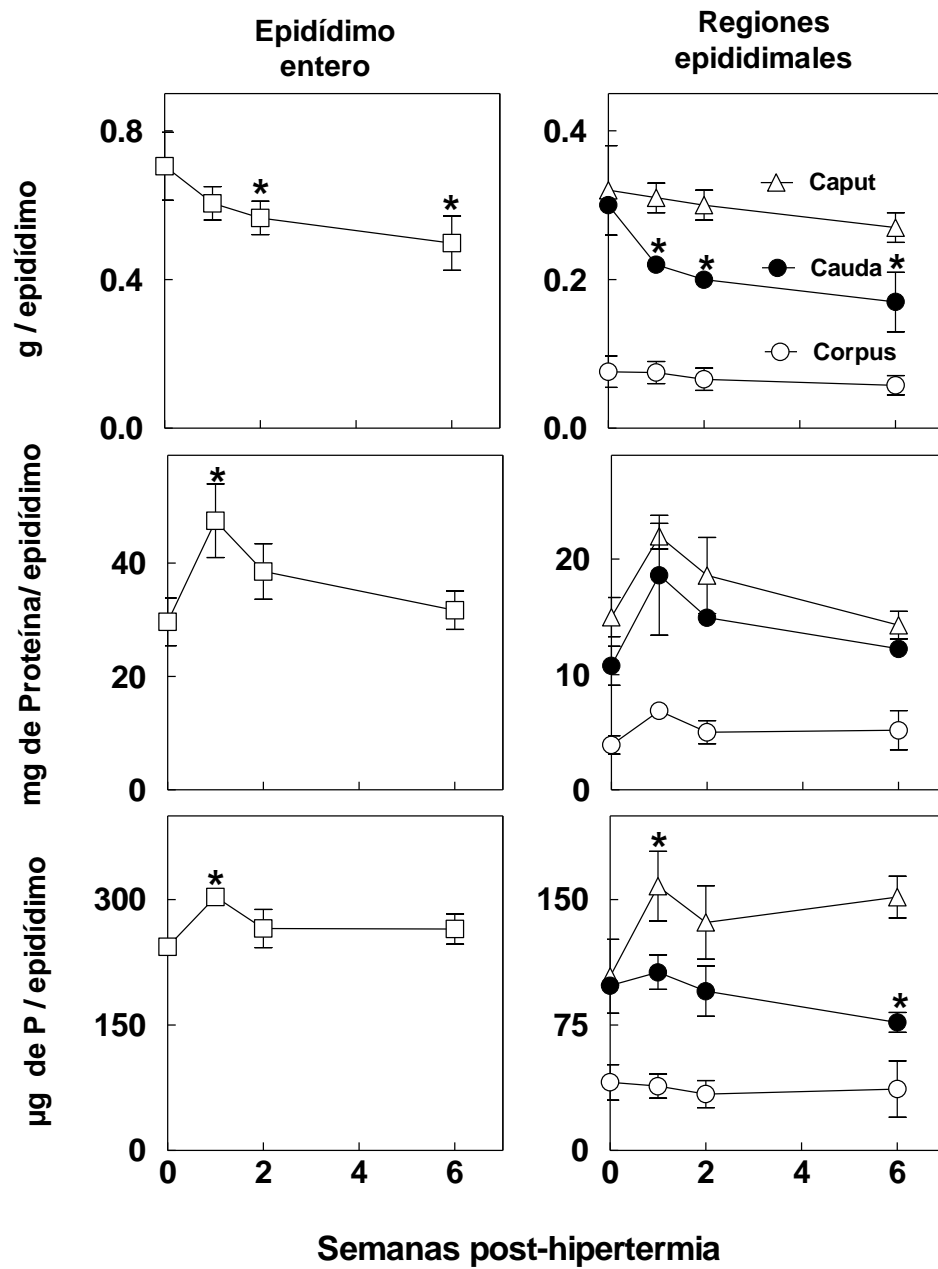


**Fig. 24.** Cambios en la histología del cuerpo epididimal semanas después de la hipertermia. Se muestran fotomicrografías de secciones de la región del cuerpo (corpus) obtenidas como se describe en la Fig.24. Se observan detalles similares a lo que se describió en la misma, con respecto a la aparición de células dañadas en la primera y segunda semanas post-hipertermia, como disminución gradual de las mismas luego de su inclusión en una sustancia amorfa en el interior de los conductos.

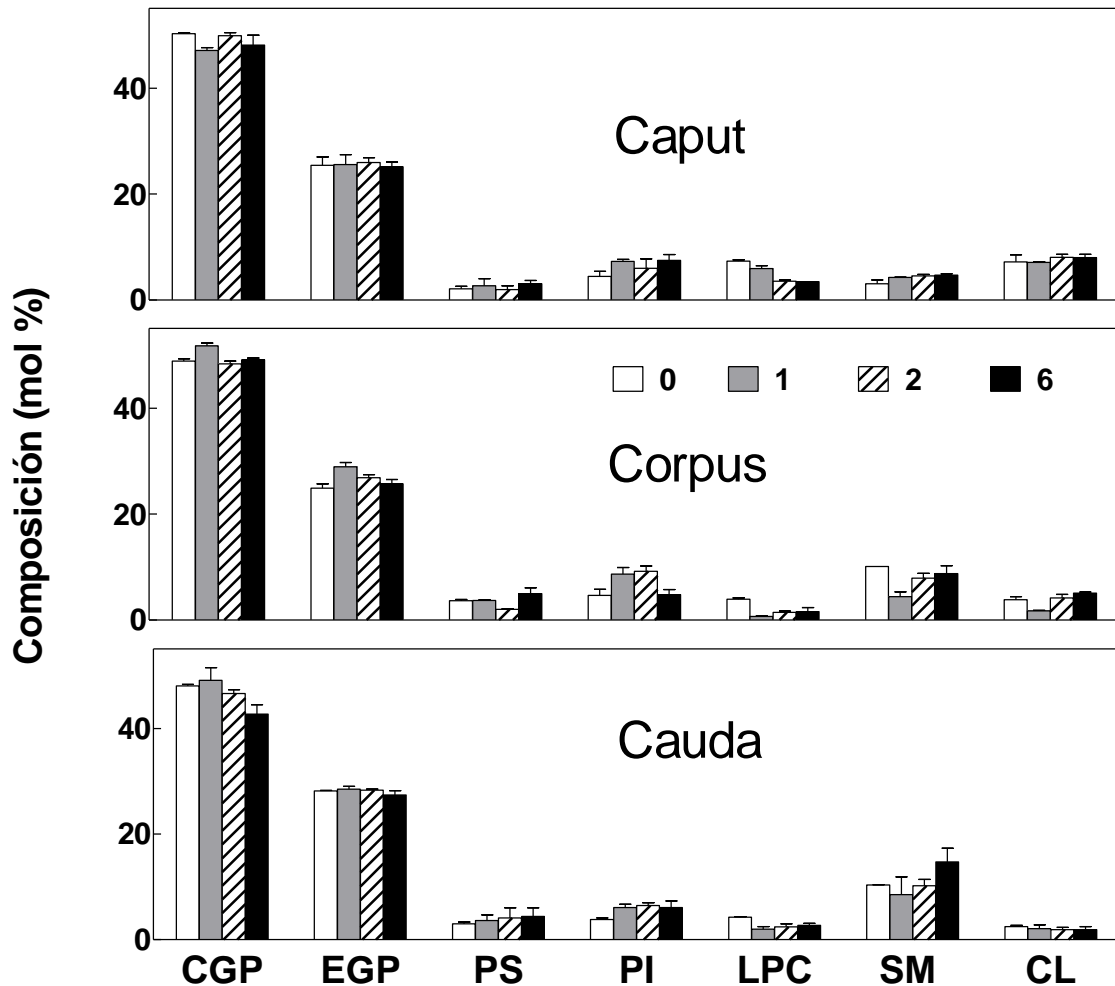




**Fig. 25.** Cambios en la histología de la cola epididimal semanas después de la hipertermia. Se muestran fotomicrografías de secciones de la región de la cola (cauda) obtenidas como se describen las figuras 22 y 23. Se observa la separación de la masa central de células y espermatozoides dañados en algunos conductos a las semanas 1 y 2. A la semana 6 algunos conductos están patentes.

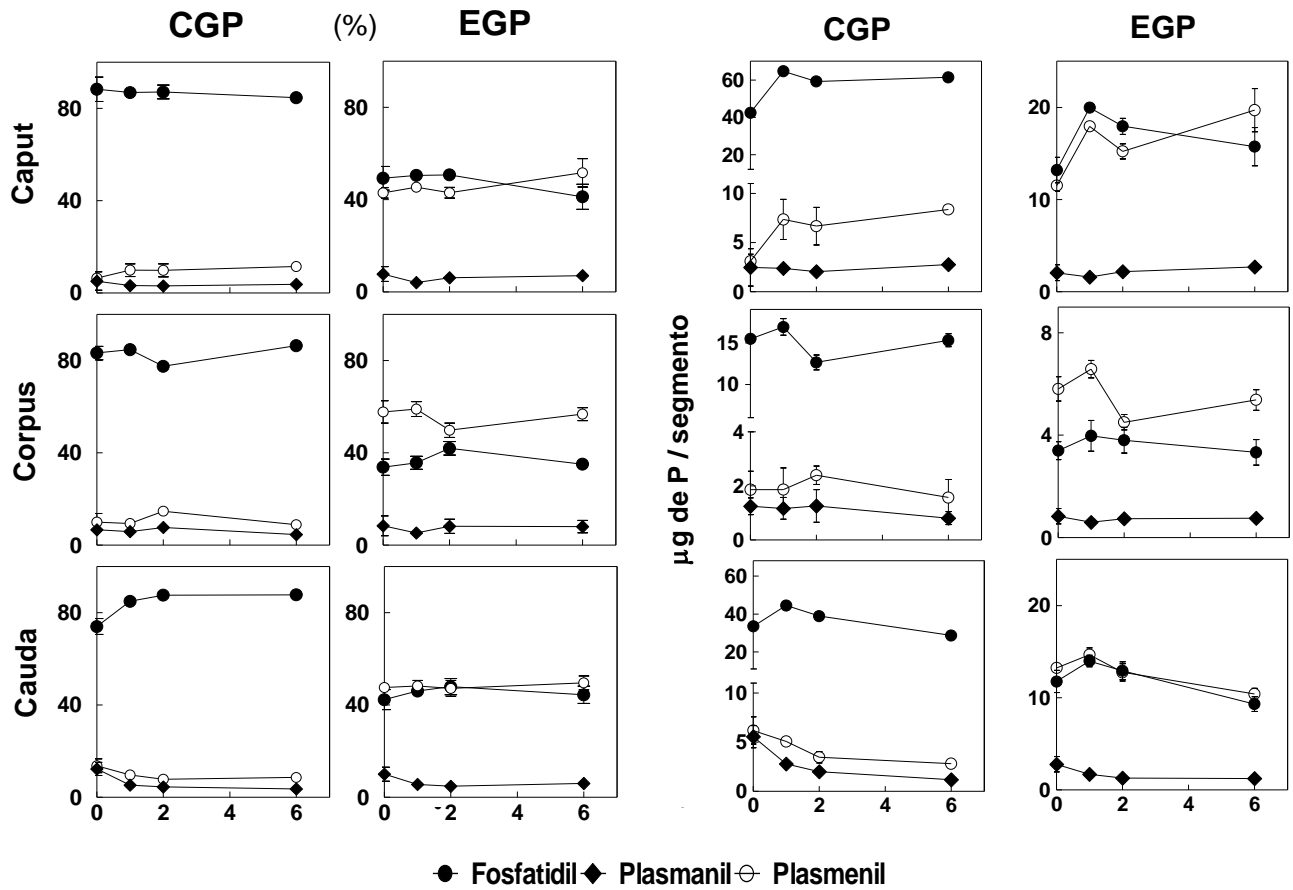


**Fig. 26.** Consecuencias de la hipertermia sobre el peso y sobre el contenido de fosfolípidos y de proteína del epidídimo. En los paneles de la izquierda se muestran los valores totales y en los de la derecha la contribución de cada región a los mismos. Si bien las tres regiones perdieron peso, no habiendo ninguna de ellas recuperado el peso original a la semana 6. El aumento del contenido de fósforo lipídico y de proteína en la primera semana post-hipertermia es consistente con la presencia en la luz de los túbulos epididimarios de espermatozoides inmóviles más restos de células germinales dañadas provenientes del testículo en todo el epidídimo. Los asteriscos (\*) señalan diferencias significativas entre las muestras y el control,  $p < 0.05$ .

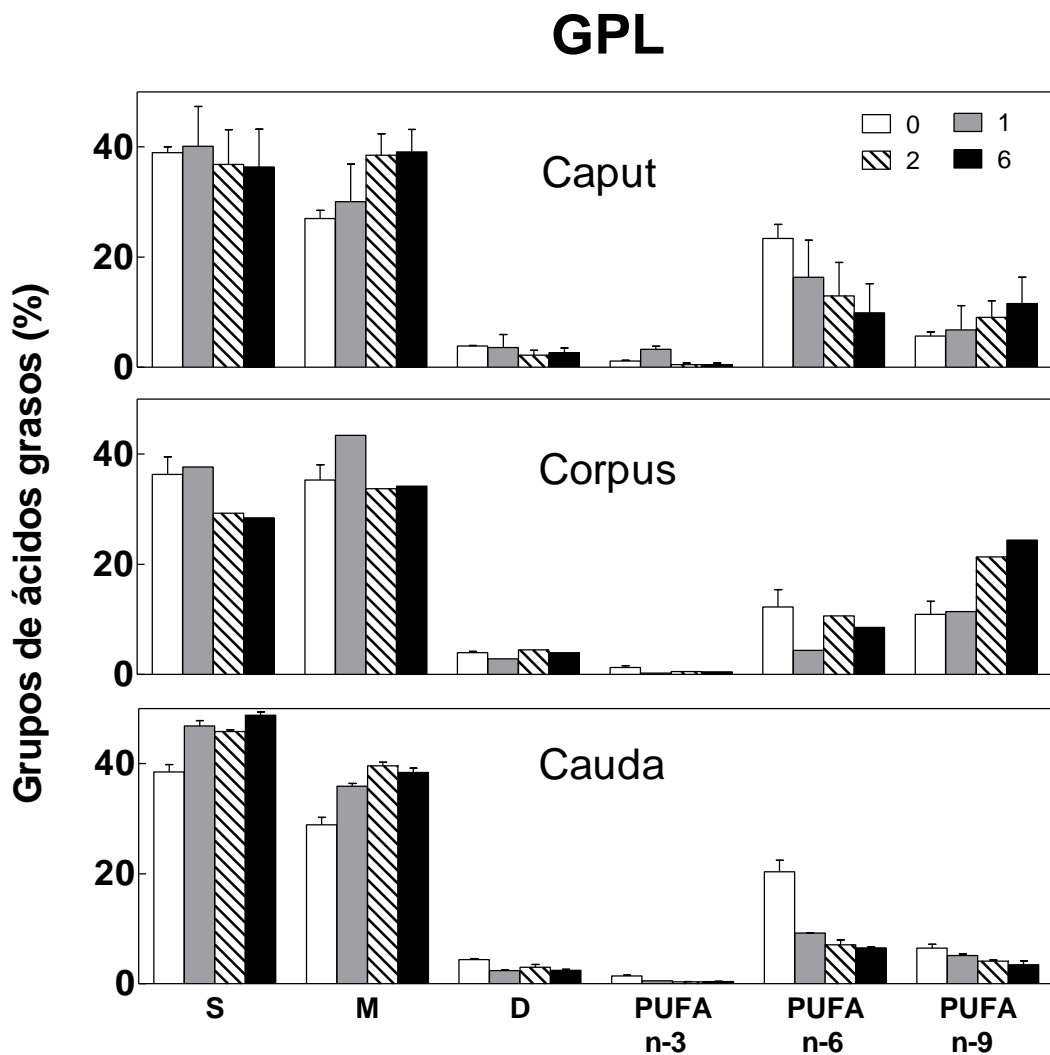


**Fig. 27.** Fosfolípidos de las tres regiones epididimarias semanas después de las exposiciones a la hipertermia. Los colores de las barras se corresponden con los de las semanas, que se indican con los números 0, 1, 2 y 6. CGP y EGP, glicerofosfolípidos de colina y de etanolamina, respectivamente. PS y PI, fosfatidil-serina e inositol, respectivamente; LPC, lisofosfatidilcolina; SM, esfingomielina, y CL, cardiolipina. A la semana 6, el cambio más significativo en la *cauda* fue el aumento en la proporción de esfingomielina, que refleja la disminución de la de los CGP.

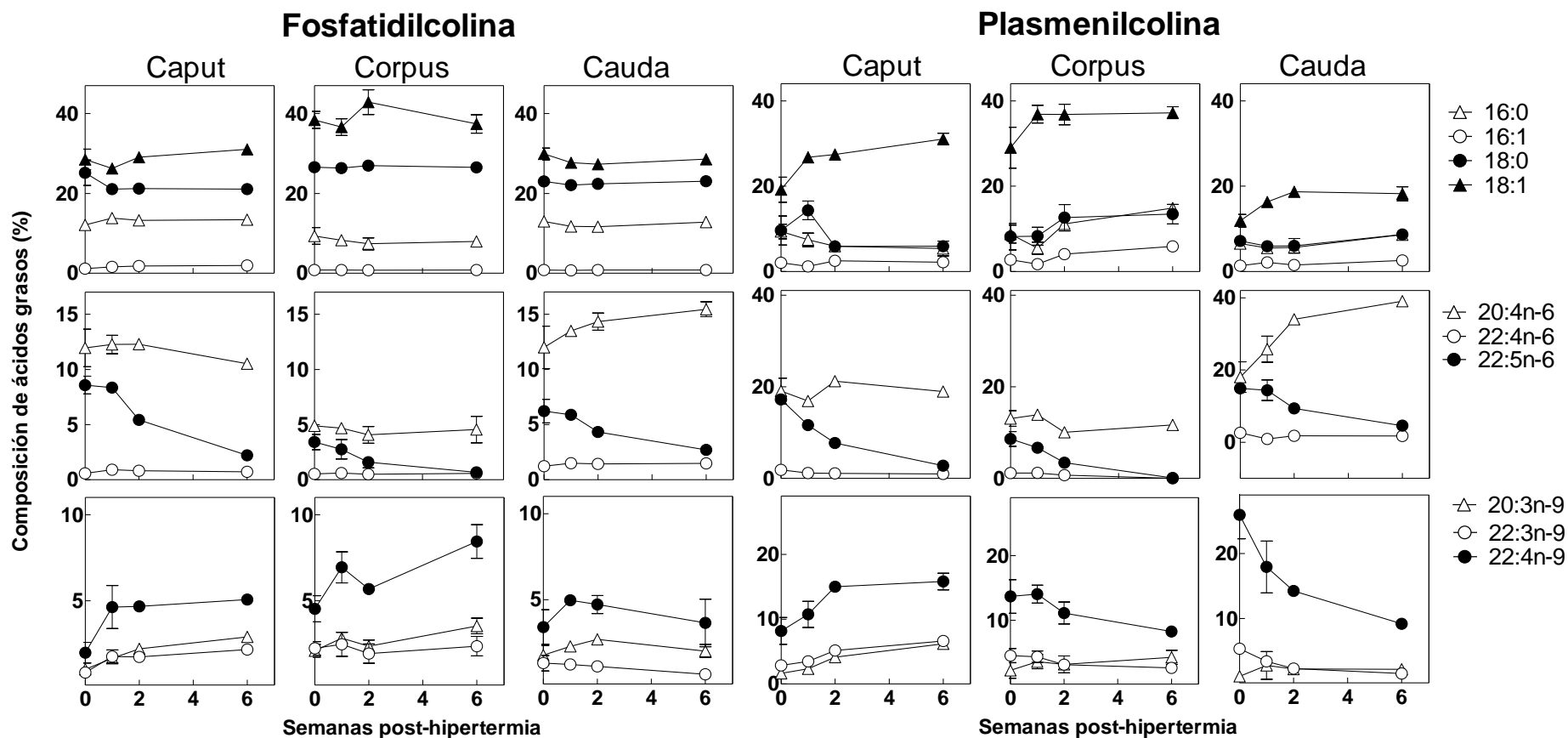




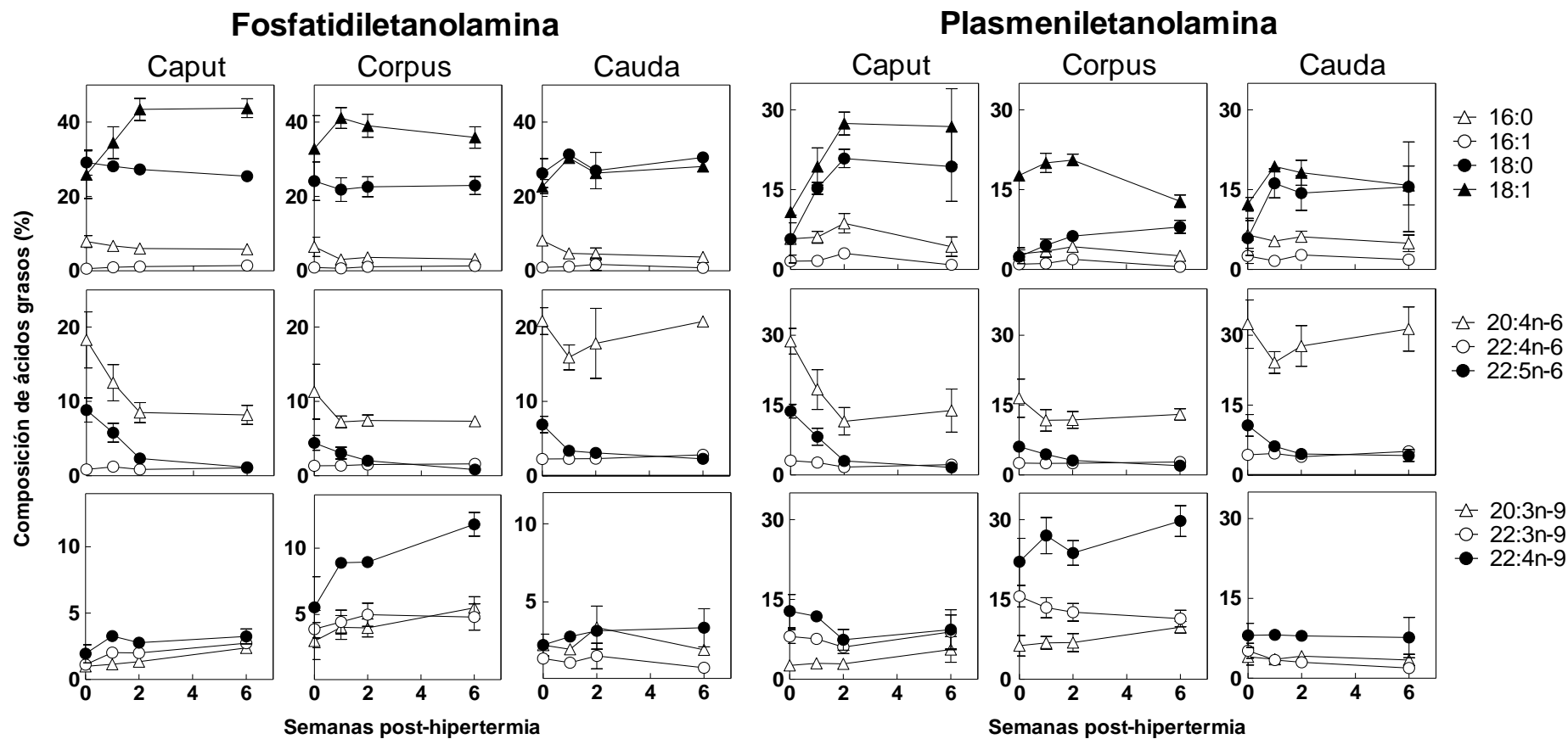
**Fig. 28.** Proporciones y cantidades por segmento epididimal de las tres subclases de CGP y EGP semanas después de las exposiciones del epidídimo a la hipertermia. En el caso de los EGP, es de notar la elevada proporción de plasmeniletanolamina en las tres regiones, y que ésta termine siendo la subclase mayoritaria, no sólo en el cuerpo, sino también a la semana 6 en la cabeza, superando a la fosfatidiletanolamina.



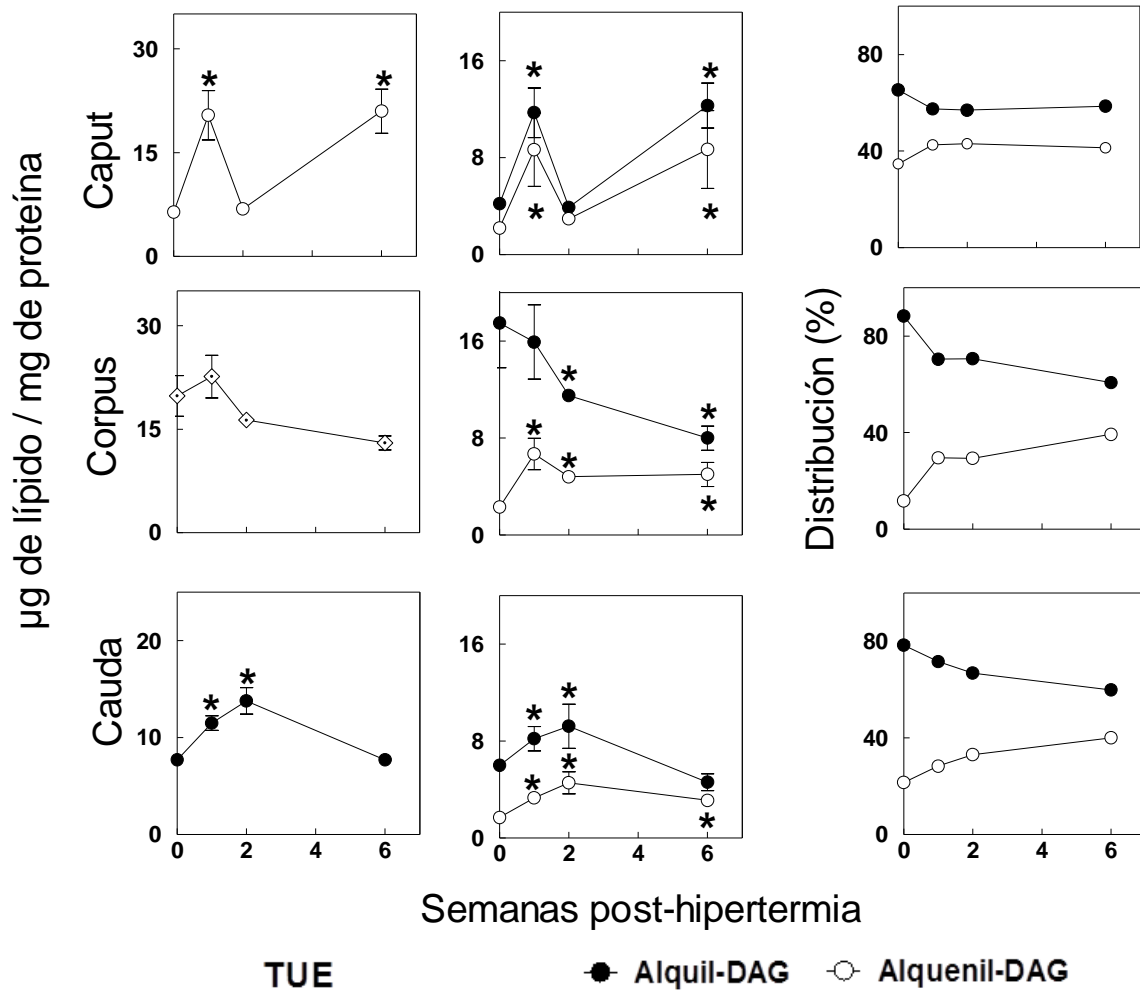
**Fig. 29.** Cambios globales en función del tiempo luego de la exposición del epidídimo a la hipertermia sobre los grupos de ácidos grasos de los glicerofosfolípidos (GPL) totales de cada una de sus regiones epididimales. Fue común en las tres regiones la caída en la proporción de PUFA n-6 a lo largo de las semanas. En el *corpus* se incrementó el porcentaje de 18:1 a la semana para bajar luego, al mismo tiempo que aumentaron los porcentajes de PUFA n-9. La proporción de PUFA n-9 comenzó a incrementarse gradualmente en los GPL de *caput* y *corpus* con el tiempo, mientras continuó disminuyendo en los de *cauda*.



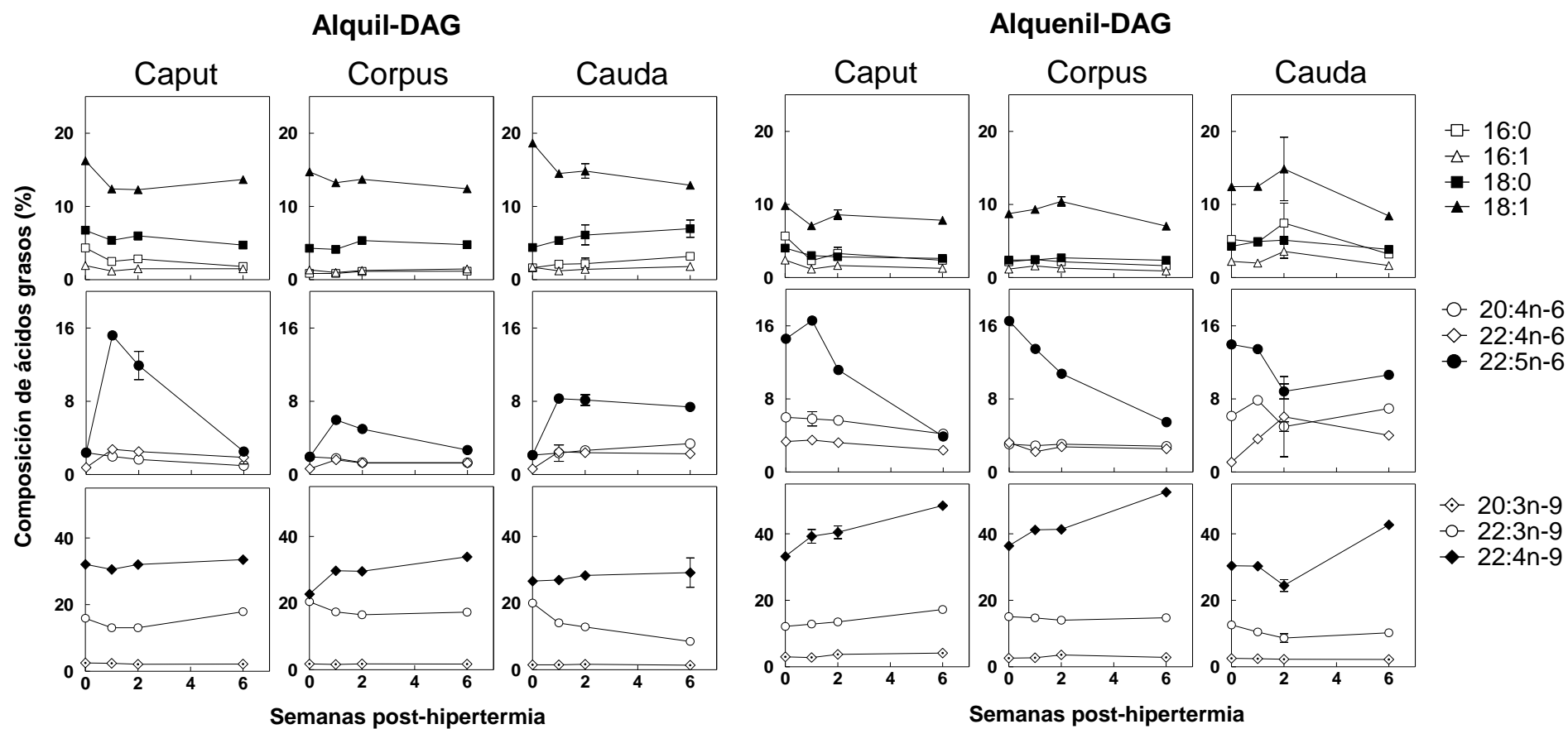
**Fig 30.** Cambios en la composición de ácidos grasos de fosfatidilcolina y plasmenilcolina de cada una de las tres regiones epididimales luego de la exposición del epidídimo a la hipertermia.



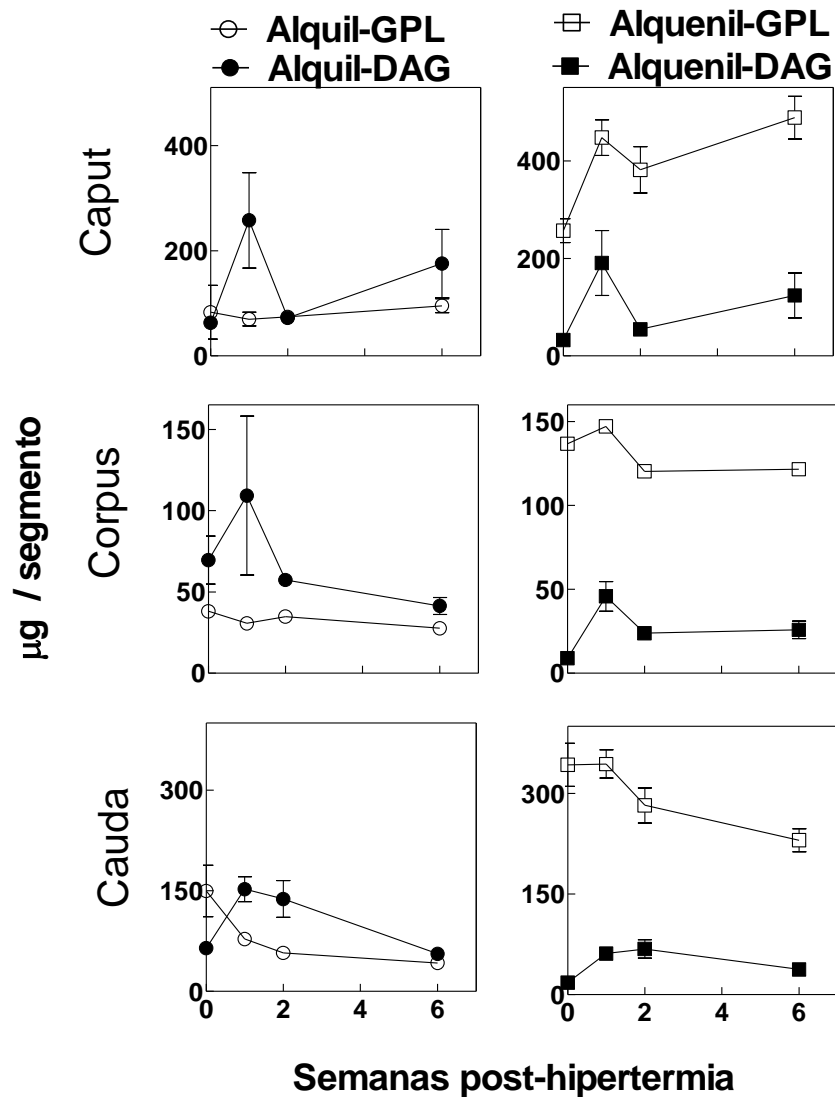
**Fig 31.** Cambios en la composición de ácidos grasos de fosfatidiletanolamina y plasmeniletanolamina de cada una de las tres regiones epididimales luego de la exposición del epidídimo a la hipertermia de las tres regiones epididimales.



**Fig 32:** Cambios en los TUE totales y sus dos subclases en las tres regiones del epidídimo luego de las exposiciones a la hipertermia. En los paneles de la izquierda se presenta la cantidad, y en los de la derecha las proporciones, de alquil-DAG y alquil-DAG. Se observa un significativo incremento de ambos TUE en la cabeza en la primera semana y en la cola en la segunda. Los asteriscos (\*) señalan diferencias significativas entre las muestras y el control,  $p < 0.05$ .

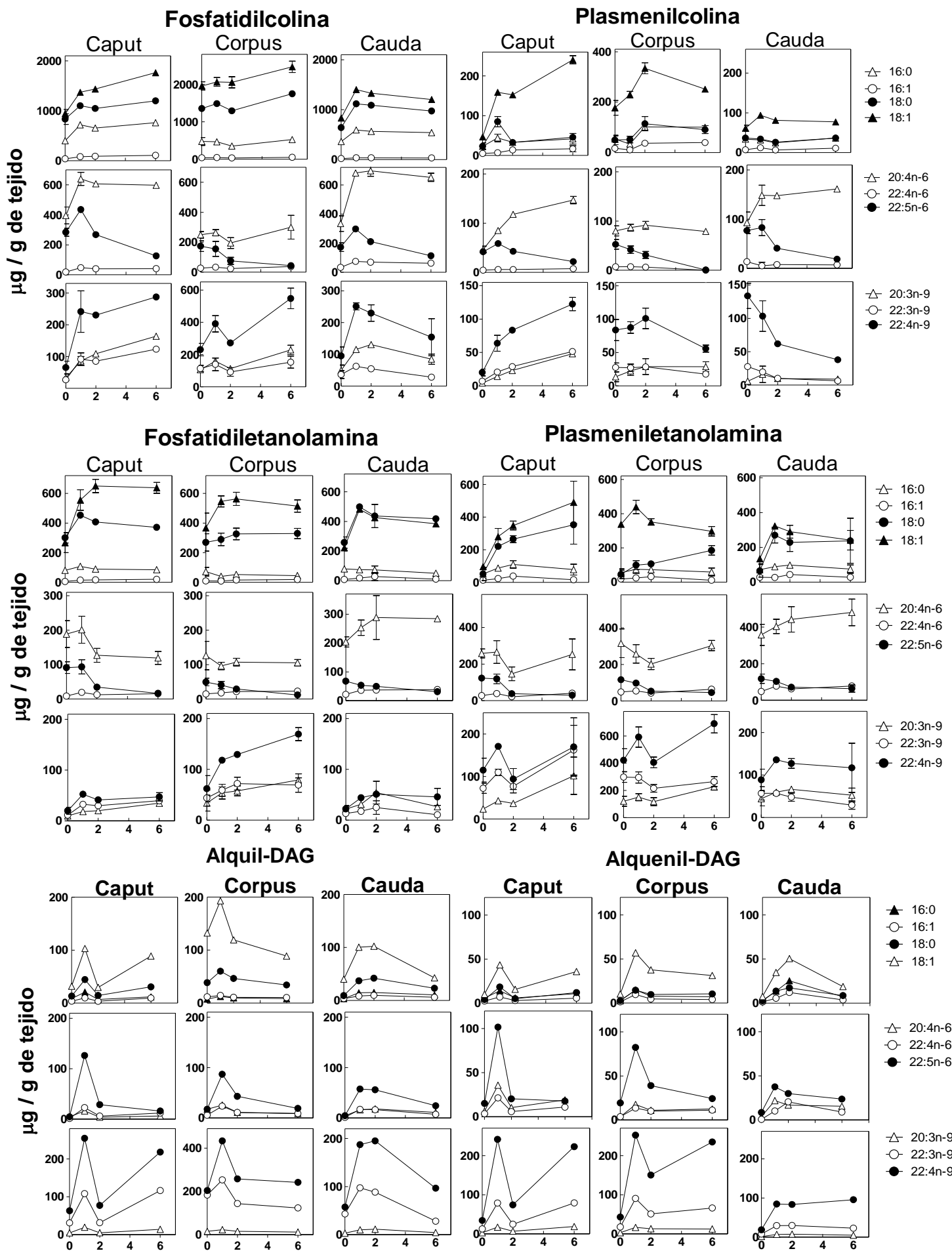


**Fig 33.** Cambios en la composición de ácidos grasos de los alquenil-DAG y alquil-DAG en función del tiempo transcurrido luego de las exposiciones del epidídimo a la hipertermia.

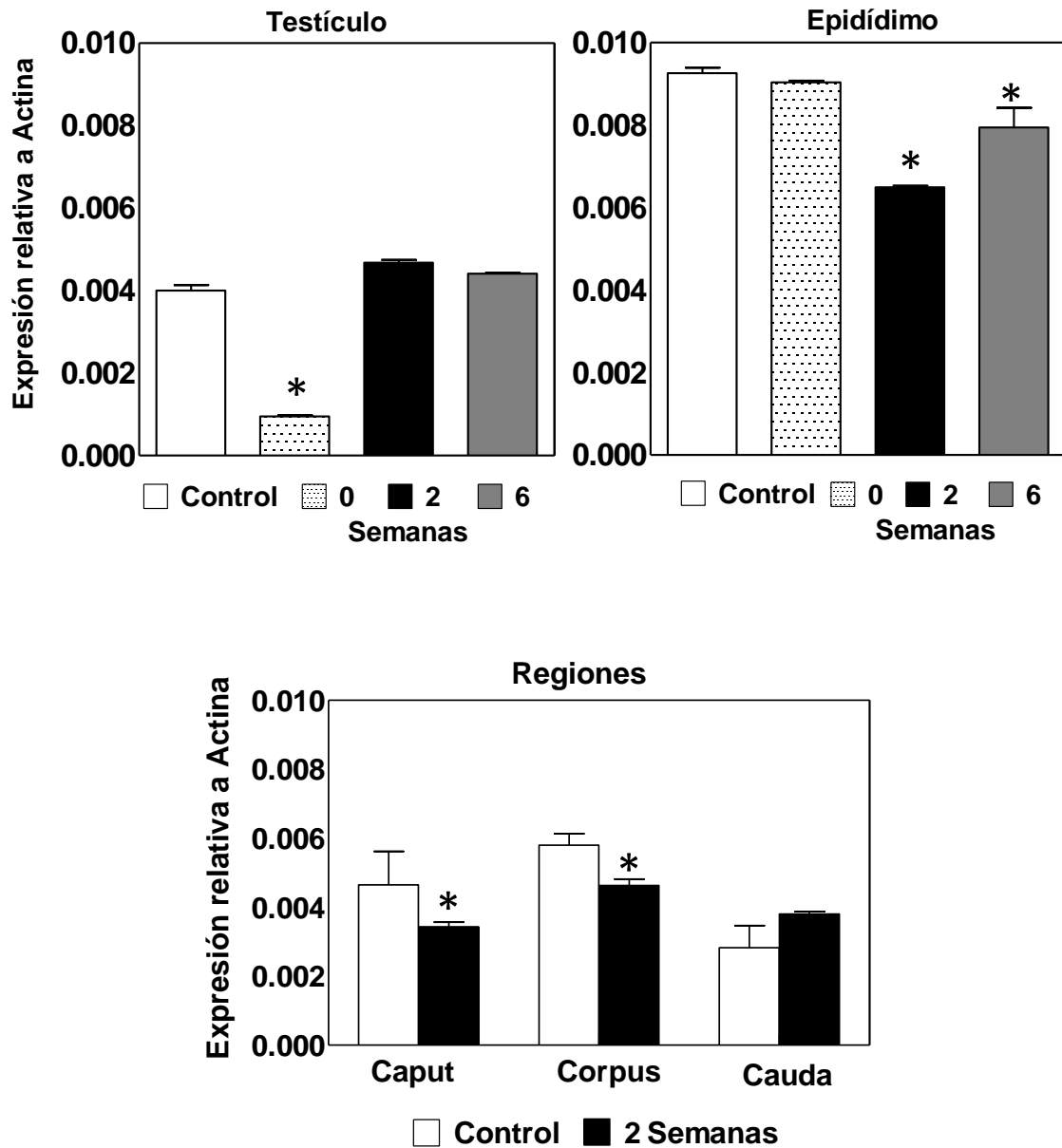


**Fig. 34.** Comparación entre los cambios de los dos TUE y de las correspondientes subclases de GPL con uniones éteres en estudio a consecuencia de las exposiciones del epidídimo a la hipertermia. Los alquil-GPL representan la suma de plasmanilcolina y plasmaniletanolamina (en los paneles de la izquierda) y los alquenil-GPL la suma de plasmenilcolina y plasmeniletanolamina (en los paneles de la derecha).

**Fig. 35.** (en la página siguiente) Figura-resumen compendiando los cambios cuantitativos en ácidos grasos de las subclases de CGP, EGP y TUE estudiadas en este capítulo.







**Fig. 36.** Cambios en los niveles de ARNm de AGPS en testículo, epidídimo de rata y en sus tres regiones luego de las exposiciones a episodios de hipertermia. Los asteriscos (\*) señalan diferencias significativas entre las muestras y el control,  $p < 0.05$ .

***RESULTADOS***

***CAPÍTULO III***

## 1. GLICEROFOSFOLÍPIDOS DEL ESPERMATOZOIDE Y SUS ÁCIDOS GRASOS

### 1.1. Distribución de subclases de GPL de colina y de etanolamina entre la cabeza y cola espermáticas

Al comparar la composición de ácidos grasos de las subclases de GPL del epidídimo adulto estudiadas en el Capítulo 2 con las del espermatozoide entero obtenido de la *cauda* epididimal (**Fig. 1**), las tres subclases de CGP y EGP de las gametas mostraron contener un porcentaje mayor de PUFA de 20 y 22 carbonos que el tejido epididimal. El 22:5n-6 fue el ácido graso más abundante en todas las subclases, mientras el 22:4n-9 predominó en la plasmencilolina. Esto motivó nuestro interés en averiguar si las subclases principales de CGP y EGP exhibirían una tendencia a distribuirse diferencialmente entre la cabeza y la cola espermáticas, ya sea en las proporciones entre ellas en las de sus especies moleculares predominantes.

La composición en fosfolípidos de cabeza y cola mostró que si bien los CGP predominaron en ambas regiones espermáticas (**Fig. 2A**), hubo diferencias notorias entre cabeza y cola en las proporciones no sólo de los dos GPL mayoritarios, sino en el tercer fosfolípido en orden de abundancia en cada región. En la cabeza, los porcentajes de CGP y EGP (60% y 15% de los fosfolípidos, respectivamente) indicaron un predominio de 4 veces de los primeros con respecto a los segundos, mientras que en la cola dichas proporciones (43% y 32%, respectivamente) indicaron una relación de 1:3, mostrando una mayor importancia relativa de los segundos en la cola que en la cabeza. La SM fue el tercer fosfolípido más abundante entre los fosfolípidos de la cabeza. Por su parte, la CL fue el tercer fosfolípido más abundante en la fracción de la cola, siendo casi indetectable en la cabeza. Esto concuerda con el hecho de que este lípido es un componente de las mitocondrias, y que éstas se localizan en la *pieza media* del espermatozoide, segmento que en el fraccionamiento aquí empleado permanece junto con la cola.

La composición en subclases de CGP y EGP mostró una distribución diferencial muy específica únicamente para plasmencilolina y plasmencilolanilcolina (**Fig. 2B**). Ambas fueron prácticamente indetectables en la cabeza, estando en proporción no despreciable en la cola (11% de los CGP y 13% de los EGP). Por otra parte, hubo notorias diferencias entre cabeza y cola en las proporciones (%) de las dos subclases mayoritarias. Así, la proporción entre fosfatidilcolina y plasmencilolina en la cabeza fue de 58:42 (1,4) y en la cola de 50:39 (1,3), mientras que para los EGP la misma relación fue de 48:52 (0,9) y de 68:19 (3,6), respectivamente. Estos índices subrayan la importancia cuantitativa de la plasmencilolina, tanto en la cabeza como en la cola, mientras que en el caso de los EGP la cabeza fue relativamente más rica en plasmencilolanilcolina que la cola.

El espermatozoide de rata se caracteriza por tener una larga y voluminosa cola y una cabeza muy pequeña. Al comparar el contenido de cada clase lipídica en cada región en relación al número de células (**Fig. 3 A**), resultó evidente la superioridad cuantitativa de los fosfolípidos de la cola, que por esta razón prácticamente determinó la composición fosfolipídica del espermatozoide entero. Esto fue así para casi todos los lípidos examinados, con la única excepción de la SM, a la cual contribuyeron en cantidad similar la SM de la gran cola y la SM de la pequeña cabeza.

Las cantidades de cada subclase (**Fig. 3 B**), volvieron a mostrar que la cola contribuyó con la mayor parte de los dos fosfolípidos. Sin embargo, pese a su pequeño tamaño, la cabeza aportó más fosfatidilcolina y más plasmencilolina que la cola a los fosfolípidos totales del espermatozoide. En cuanto a los dos plasmalógenos, la plasmencilolina predominó ampliamente sobre la plasmeniletanolamina, tanto en la cabeza como en la cola.

## 1.2. Ácidos grasos de diacil y plasmencil glicerofosfolípidos

Los PUFA de las series n-6 y n-9 de 20 y 22 átomos de carbono fueron los principales ácidos grasos de los GPL totales del espermatozoide (**Fig. 4**). En los CGP de la cabeza, el 22:4n-9 fue el PUFA principal, seguido por el 22:5n-6, mientras que en los CGP de la cola también predominaron ambos, aunque en el orden inverso. Por su parte, en los EGP de cabeza y cola el ácido graso predominante fue el 22:5n-6, seguido del 20:4n-6. Por lo tanto, los principales determinantes de la abundancia de 22:4n-9 en los GPL espermáticos fueron los GPL de colina y los principales determinantes de la abundancia de 22:5n-6 fueron los de etanolamina.

Tanto en los CGP como en los EGP de la cola predominó el 22:5n-6. En cuanto a los otros dos PUFA, el contraste principal fue que los EGP fueron pobres en 22:4n-9 y ricos en 20:4n-6 en ambas regiones, mientras lo opuesto ocurrió con los CGP, donde el 20:4n-6 fue muy minoritario (Fig. 4).

Al estudiar las subclases por separado (**Fig. 5 A**), hallamos que el 20:4n-6 de los EGP, y por lo tanto el 20:4n-6 de los GPL totales, fue aportado casi exclusivamente por la fosfatidiletanolamina de ambas regiones, ya que la plasmeniletanolamina virtualmente carecía de él, tanto en la cabeza como en la cola. En cambio, tanto la fosfatidilcolina como la plasmencilolina de ambas regiones contribuyeron con 22:4n-9 a los GPL totales. Otro hecho llamativo fue el predominio de los PUFA de 22 carbonos en los dos plasmalógenos de ambas regiones.

Al comparar cuantitativamente los ácidos grasos de las subclases de EGP y CGP de la cola, la fosfatidiletanolamina y la fosfatidilcolina, (**Fig. 5 B**), siendo las subclases más abundantes de esta región espermática, aportaron a ella mayoritariamente PUFA n-6, 20:4n-6 y 22:5n-6, siendo el primero contribuido casi exclusivamente por la fosfatidiletanolamina y el segundo por ambos. En cuanto a los plasmalógenos, la plasmenilcolina fue la principal responsable del 22:4n-9 y del 22:5 de la cola.

Por el contrario, en la cabeza espermática tanto la fosfatidilcolina como la plasmenilcolina predominaron sobre las correspondientes subclases de etanolamina, aportando especies moleculares con 22:5n-6 y 22:4n-9. Llamativamente, la plasmenilcolina de la cabeza aportó la mayor parte del 22:4n-9 espermático, pese al pequeño tamaño de esta región.

## **2. EFECTOS DEL AISLAMIENTO Y DE LA ACTIVACIÓN *IN VITRO* SOBRE LOS LÍPIDOS DEL ESPERMATOZOIDE DE RATA Y SUS ÁCIDOS GRASOS**

El hecho de que los espermatozoides de rata fueran tan ricos en plasmalógenos condujo a la pregunta de cómo estas subclases se comportarían durante reacciones asociadas a la función del espermatozoide, como lo son la capacitación (Cap) y la reacción acrosomal (AR). En trabajos previos del grupo (Zanetti *et al.* 2010) se había observado que los CGP se hidrolizan significativamente como consecuencia de la incubación en condiciones capaces de inducir la Cap, y, aunque algo menos, también durante la AR, cuando ésta es inducida por el ionóforo de calcio A23187. Sin embargo, no se había discriminado cómo contribuían a estos efectos las dos subclases mayoritarias de este lípido, pregunta que nos propusimos contestar en la presente sección.

En estudios aún anteriores (Furland *et al.* 2007) se había observado que el mero hecho de aislar los espermatozoides de rata a partir del epidídimo, y el número e intensidad de manipulaciones como lavados y centrifugaciones a que se los sometía, provocaba una variable pero significativa hidrólisis de la SM para dar ceramida. Sin embargo, dicha hidrólisis podía evitarse si en el medio de aislamiento se incluía un quelante de iones bivalentes como el EDTA, lo cual se atribuyó a la presencia de cantidades variables de iones de calcio en el medio, provenientes del tejido. Esto también nos llevó a plantearnos si habría o no algún efecto hasta el momento inadvertido del aislamiento de los espermatozoides sobre alguna una de las subclases de CGP y EGP.

Con el fin de contestar a estas preguntas, y con un foco en las subclases diacil y plasmenil de CGP y de EGP, en esta sección se compararon los niveles de los lípidos en espermatozoides bajo las siguientes condiciones: C1, espermatozoides controles aislados directamente del epidídimo en un medio apropiado en presencia de EDTA y

directamente expuestos a la extracción de sus lípidos. C2, espermatozoides aislados en condiciones similares, esto es, aislados tan rápidamente y delicadamente como fue posible y resuspendidos (en ausencia de EDTA) en el medio descrito por Biggers-Whitten-Whittingham. Las muestras denominadas C3, Cap y AR, fueron preparadas a partir de muestras aisladas como se dice para C2, que luego fueron incubados en el mismo medio y por el mismo tiempo (5 horas y media) en las siguientes condiciones: C3, sin agregados; Cap, en presencia de albúmina, iones de calcio y bicarbonato, para lograr la capacitación, y AR, en las mismas condiciones que en Cap, sólo que agregando el ionóforo A23187 media hora antes de concluir las incubaciones, con el fin de inducir la reacción acrosomal.

### 2.1. Cambios en fosfolípidos y subclases de CGP y EGP

Tomando como base una determinada cantidad de células ( $10^9$ ), se determinó que ni en los fosfolípidos totales, ni en CGP y EGP (**Fig. 6**) ocurrieron cambios significativos como consecuencia del aislamiento (C2 con respecto a C1). Esto difirió de lo observado previamente con la SM (Furland *et al.* 2007) y lo observado paralelamente en el presente estudio (**Fig. 7**) con este último lípido, lo que reforzó la idea de que se trata de un efecto altamente selectivo.

Los niveles de CGP y EGP disminuyeron significativamente como consecuencia de la incubación durante 5 horas y media en el medio control que no contenía agregados con respecto a sus controles no incubados (C3 con respecto a C2, Fig. 6). Una observación de interés al comparar los tres controles entre sí fue que los niveles de ácidos grasos libres, al igual que los inicialmente minoritarios lisofosfolípidos y diacilgliceroles, se incrementaron notoriamente entre C1 y C2, y que alcanzaron sus valores máximos en los controles incubados, C3, (**Fig. 7**). Mientras ocurrían estos incrementos, los niveles de colesterol por célula permanecieron sin cambios entre los tres controles (Fig. 7).

En este contexto, los ácidos grasos libres, lisofosfolípidos y diglicéridos que se habían acumulado en las gametas incubadas como controles C3, disminuyeron drásticamente en las muestras capacitadas, al igual que el colesterol, lo que puede atribuirse a la presencia de albúmina, bicarbonato y iones  $\text{Ca}^{2+}$  en el medio (Fig. 7). Estos resultados concordaron con la premisa de que la pérdida de colesterol desde las gametas en presencia de un aceptor como la albúmina en el medio es un evento clave de la capacitación (Travis & Kopf 2002), pero permitieron añadir nuevos actores lipídicos a este fenómeno.

Así, al analizar por separado las dos subclases mayoritarias de los CGP y EGP, la cantidad de plasménicolina y de plasméniletanolamina permanecieron prácticamente sin

cambios en los tres controles, mientras los de fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina disminuyeron fuertemente a consecuencia de la larga incubación implicada en C3 (Fig. 7).

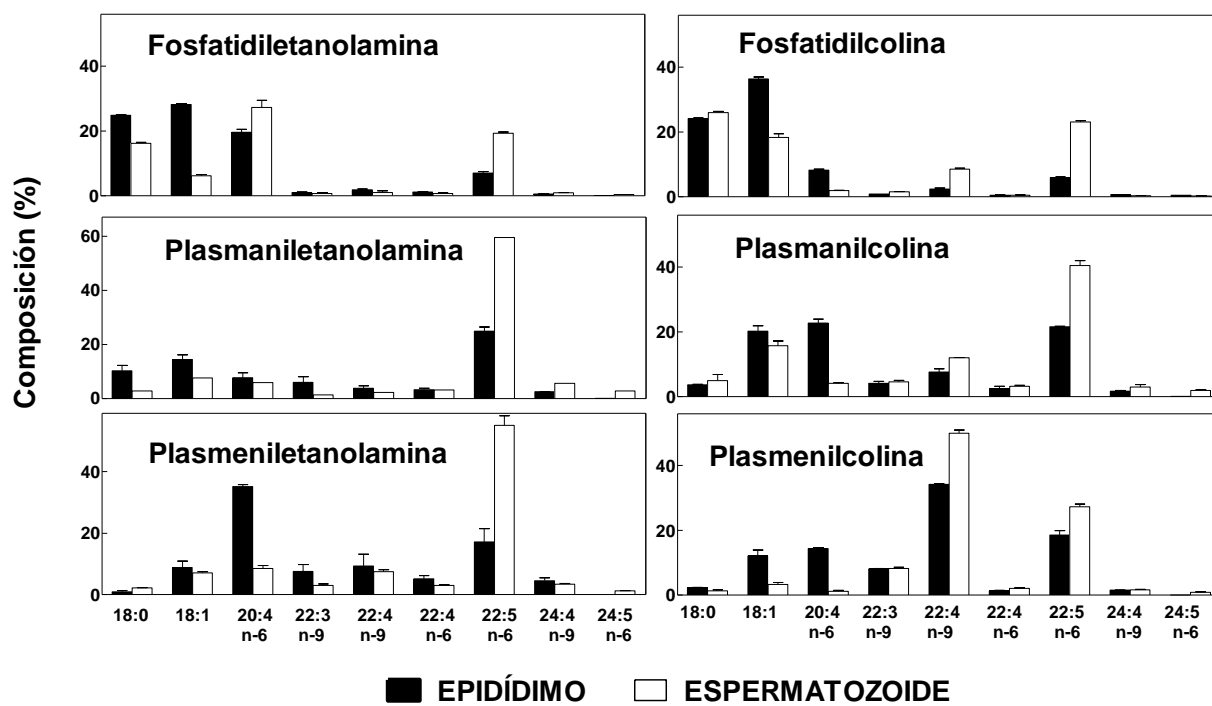
En las muestras que experimentaron la Cap y la AR, el nivel de plasmeniletanolamina se mantuvo casi al mismo nivel luego de la reacción acrosomal que en los tres controles, mientras el de plasmencilolina tendió a disminuir (Fig. 7). En contraste con los plasmalógenos, los niveles de las mayoritarias fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina disminuyeron en las muestras que sufrieron la Cap, y adicionalmente en la AR, con respecto los controles ya disminuidos en C3 (Fig. 7). Esto permitió concluir que las gametas que sufrieron la reacción acrosomal se enriquecieron relativamente en plasmalógenos.

## 2.2. Cambios en ácidos grasos de CGP y EGP

La composición de ácidos grasos de las dos subclases mayoritarias de los CGP y EGP espermáticas (**Fig. 8**) mostró una gran reactividad de las especies de fosfatidilcolina que contenían 22:5n-6 y de las fosfatidiletanolaminas con 22:5n-6 y 20:4n-6, siendo por lo tanto estas especies las principales responsables de las disminuciones en cantidad observadas en PC y PE en la Fig. 6.

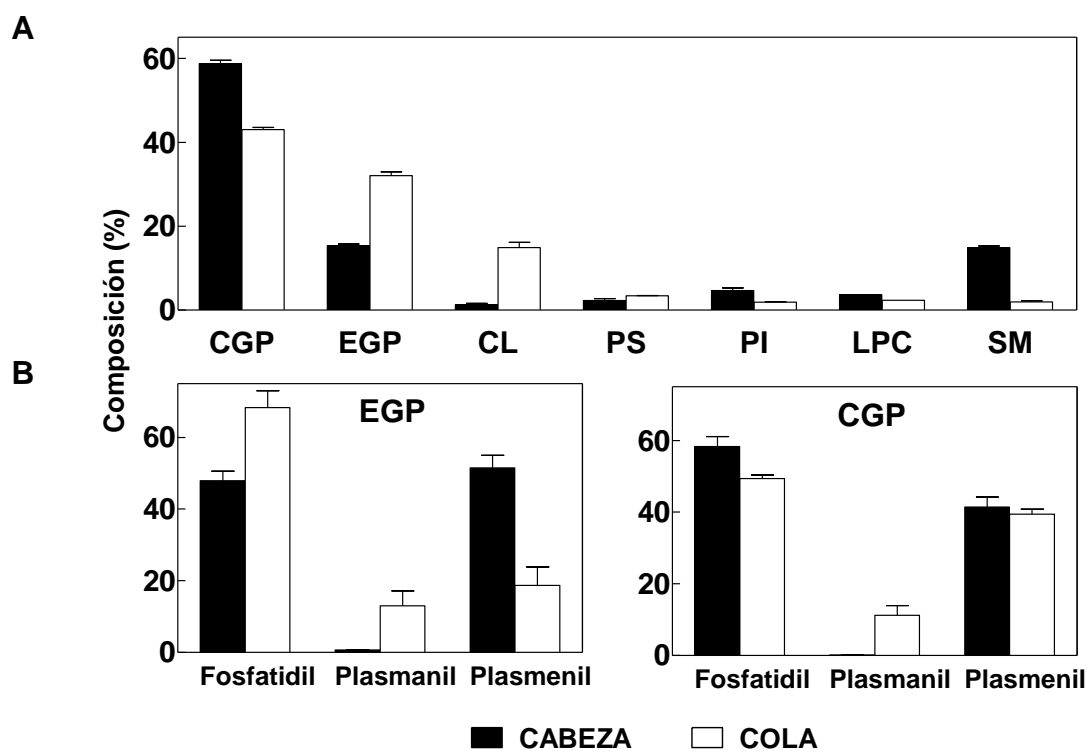
Por su parte, mientras que en la plasmencilolina las especies con 22:5n-6 y 22:4 n-9 tendieron a disminuir sólo después de inducidas la Cap y la AR, las correspondientes especies de plasmeniletanolamina mostraron una llamativa constancia a lo largo de todas las condiciones experimentales en estudio.

En conclusión, las muestras de controles incubados, capacitados y reaccionados difirieron significativamente de los controles no incubados, tanto en la composición de sus clases y subclases de lípidos (Fig. 7) como en la de sus PUFA mayoritarios (Fig. 8).

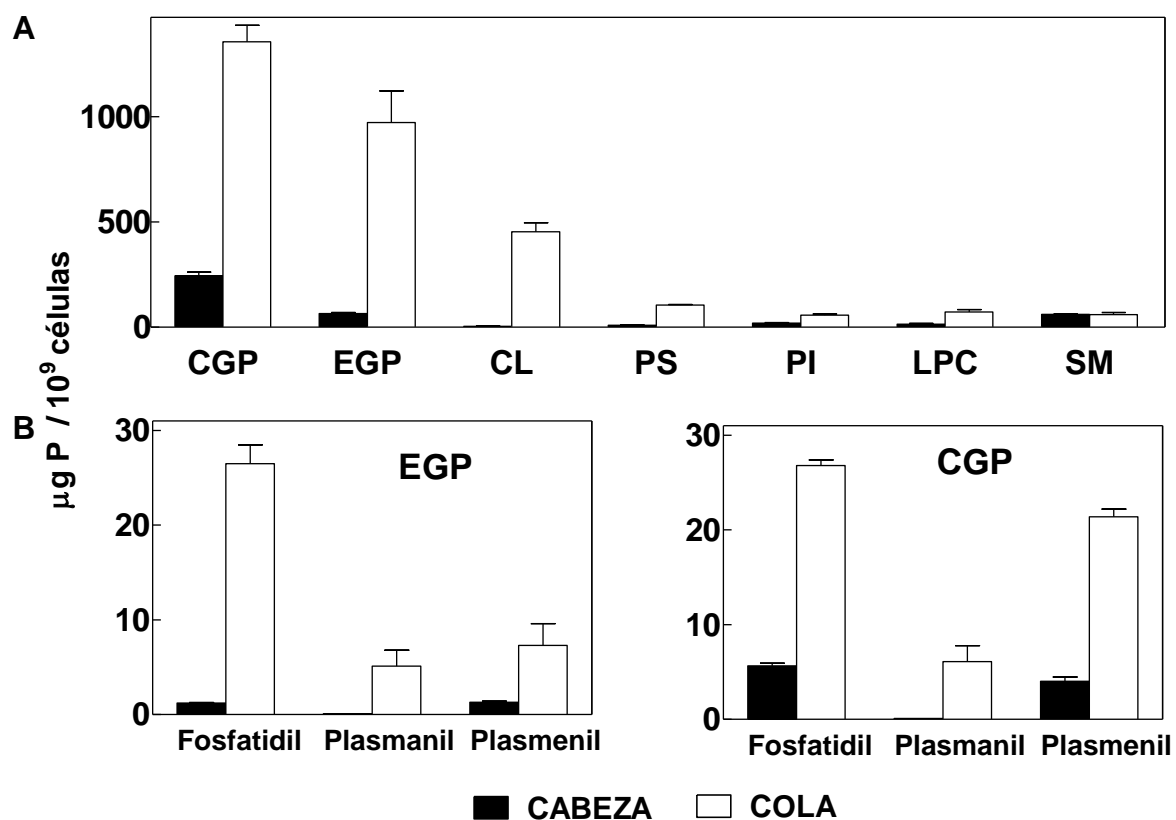


**Fig. 1.** Comparación entre la composición de ácidos grasos de GPL de epidídimo y de espermatozoides de rata. Las tres subclases de CGP y EGP obtenidas del epidídimo adulto (Capítulo 2), se comparan con las mismas tres de espermatozoides enteros aislados de la región caudal, datos tomados de la bibliografía (Aveldaño, 1992a). Se destaca el enriquecimiento en PUFA de 22 carbonos que presentan las seis subclases de las gametas con respecto al tejido, 22:5n-6 en todas ellas y 22:4n-9 casi exclusivamente en la plasmenilcolina.

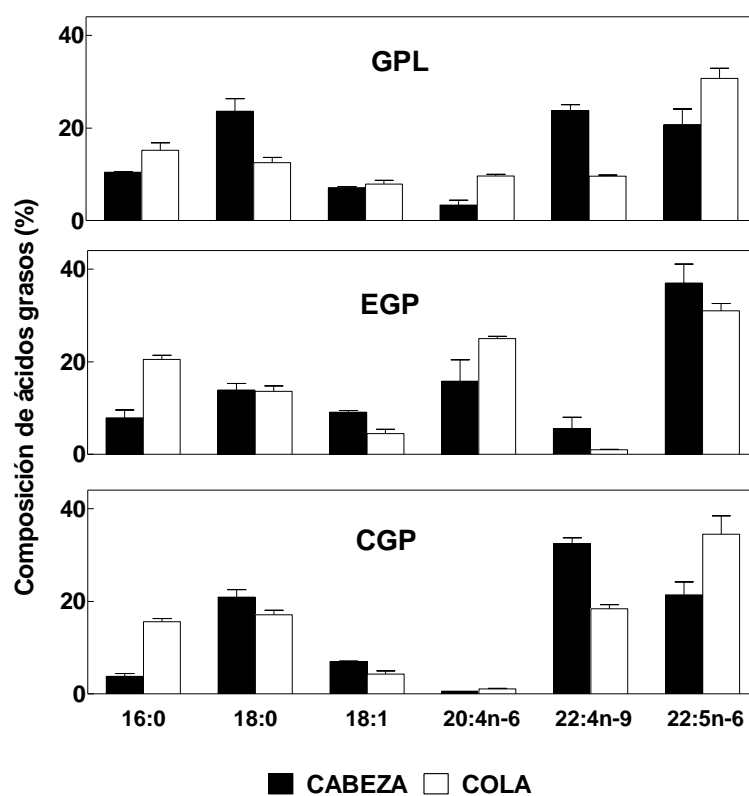




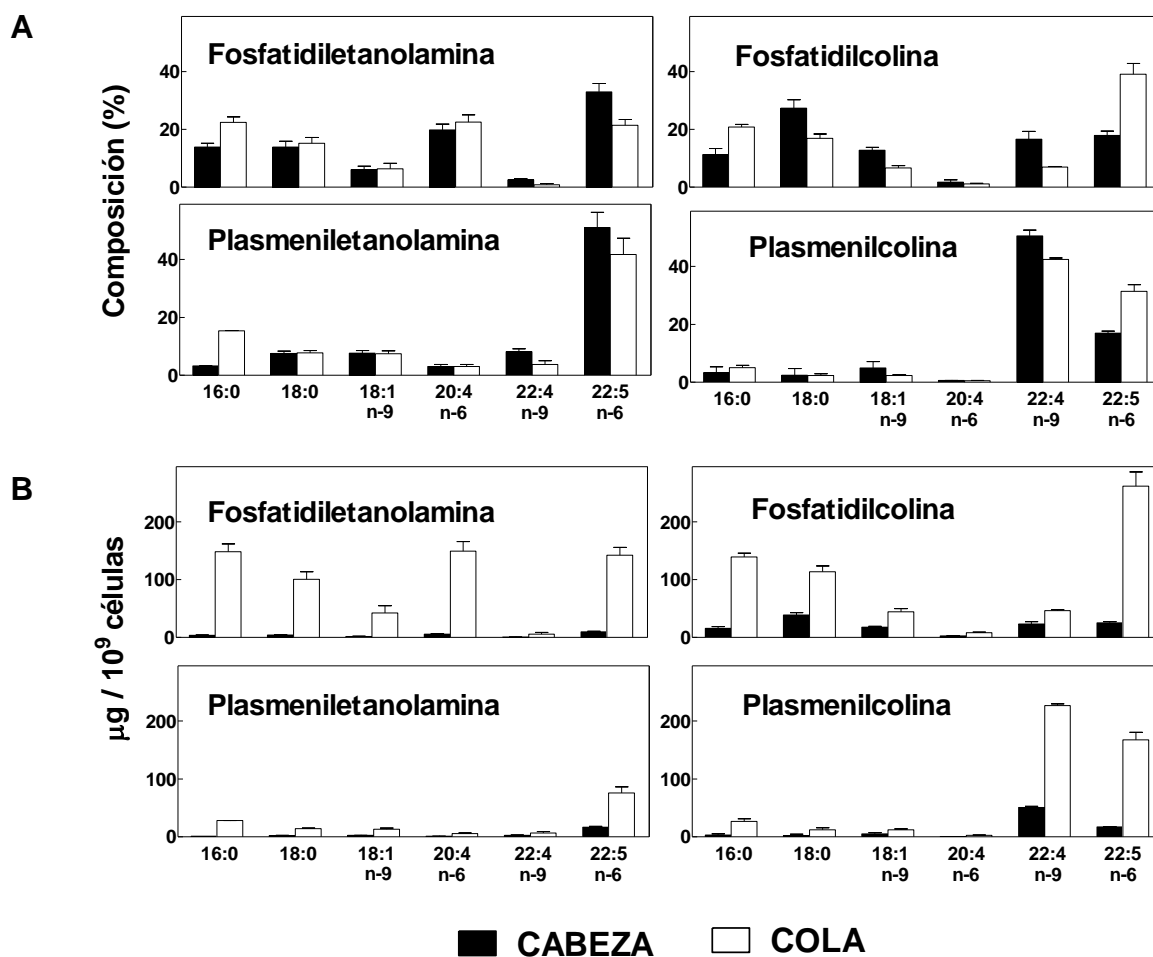
**Fig.2.** Composición en clases de fosfolípidos (A) y composición en subclases de los CGP y los EGP (B) de la cabeza y la cola de espermatozoide de rata.



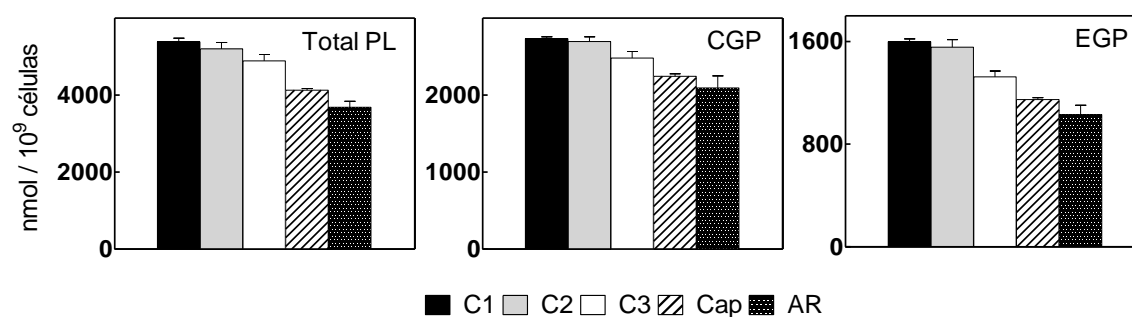
**Fig. 3.** Contenido de clases de fosfolípidos (A) y de subclases de CGP y EGP (B) en la cabeza y la cola de espermatozoide de rata.



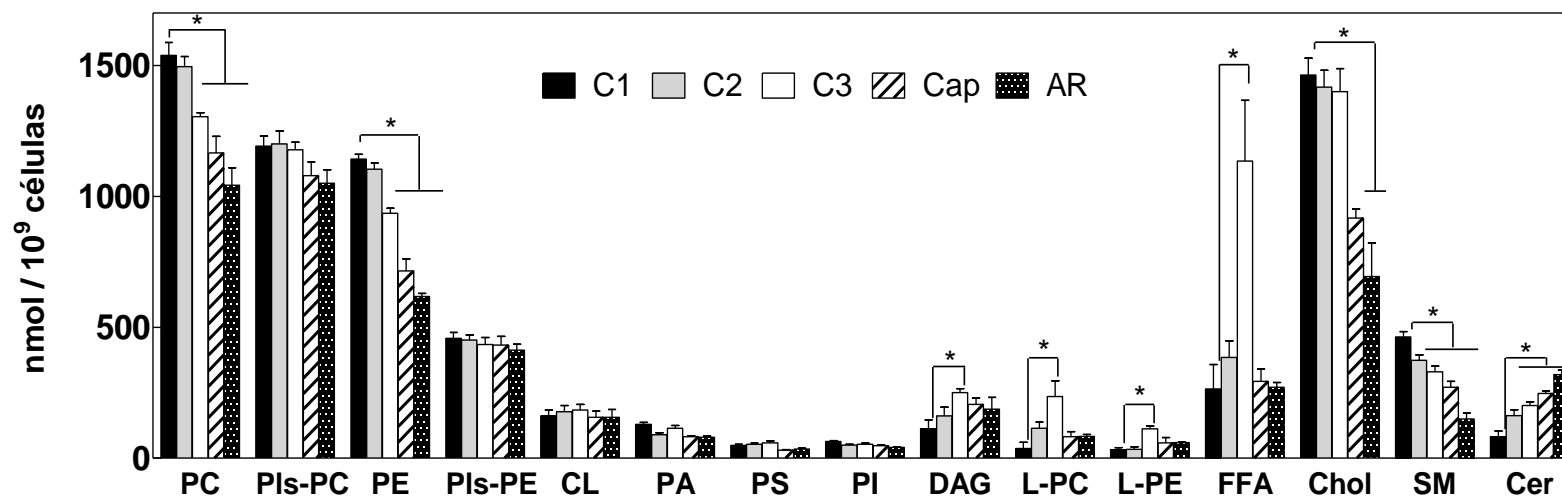
**Fig. 4.** Principales ácidos grasos de los glicerofosfolipidos totales (GPL) y de los GPL de colina (CGP) y de etanolamina (EGP) en fracciones puras de cabezas y colas espermáticas. Los GPL de la cabeza fueron más ricos en 22:4n-9 que los de la cola, en tanto que estos últimos fueron más ricos en 22:5n-6 que los de la cabeza.



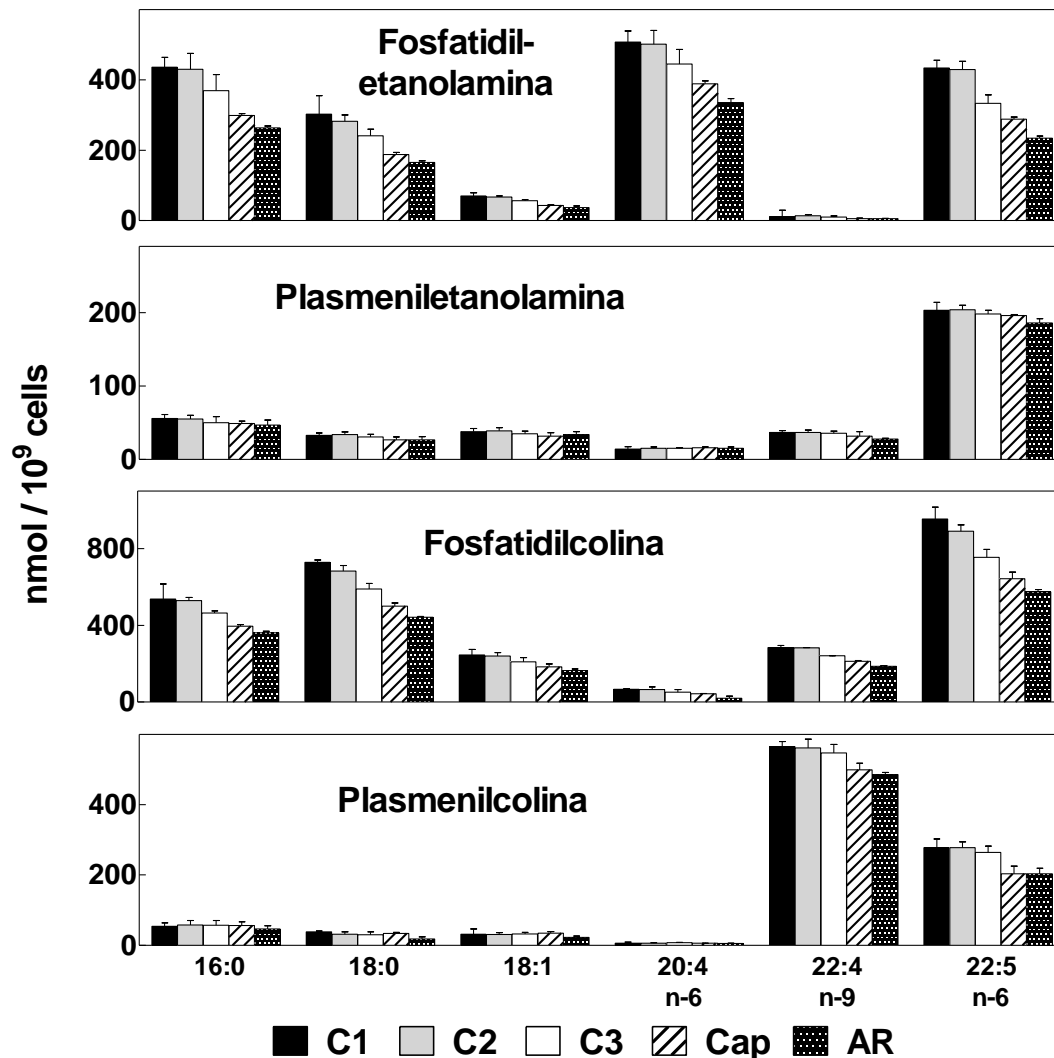
**Fig. 5.** Composición (A) y contenido (B) de ácidos grasos en las subclases mayoritarias de CGP y EGP de cabeza y cola de espermatozoide de rata. En los paneles inferiores se utilizaron las mismas escalas para facilitar la comparación.



**Fig. 6.** Contenido de fosfolípidos totales (Total PL), y de las dos clases mayoritarias de glicerofosfolípidos en el espermatozoide de rata luego de su aislamiento y de incubaciones diseñadas para inducir la capacitación (Cap) y la reacción acrosomal (AR). Las condiciones estudiadas fueron: C1, espermatozoides aislados del epidídimo en presencia de EDTA; C2, espermatozoides aislados de la misma manera pero en ausencia de EDTA; C3, Cap y AR, espermatozoides aislados como en C2 y luego incubados en el mismo medio y por el mismo tiempo (5 horas y media) en las siguientes condiciones: C3, sin agregados; Cap, en presencia de albúmina, iones de calcio y bicarbonato, y AR, en las mismas condiciones que Cap, pero agregando el ionóforo A23187 media hora antes de concluir las incubaciones.



**Fig. 7.** Cambios cuantitativos en constituyentes lipídicos de espermatozoides de rata después de su aislamiento y de su activación in vitro. Mi contribución en este trabajo fue estudiar los cambios de los GPL y sus subclases, así como sus ácidos grasos (Fig. 8). Los demás lípidos de esta figura fueron analizados por el Dr. G. M. Oresti. Las abreviaturas para los tratamientos corresponden a las 5 condiciones que se describen en la leyenda de la Fig. 6, a saber: C1, espermatozoides aislados en presencia de EDTA; C2, espermatozoides aislados de manera similar pero en ausencia de EDTA; C3, Cap, and AR, son espermatozoides aislados como en C2 y luego incubados por el mismo periodo y en el mismo medio sin suplementos (C3) o con los suplementos necesarios para inducir la capacitación (Cap) y la reacción acrosomal (AR). Los asteriscos señalan diferencias significativas con respecto a los controles C1. Pls-PC, Plasmenilcolina; Pls-PE, plasmeniletanolamina



**Fig.8.** Cambios en el contenido de ácidos grasos representativos de las dos subclases mayoritarias de CGP y EGP del espermatozoide de rata después su aislamiento y activación in vitro. Las abreviaturas corresponden a las 5 condiciones que se describen en la leyenda de la Fig. 5, a saber: C1, espermatozoides aislados en presencia de EDTA; C2, espermatozoides aislados de manera similar pero en ausencia de EDTA; C3, Cap, y AR, son espermatozoides aislados como en C2 y luego incubados por el mismo periodo y en el mismo medio sin suplementos (C3) o con los suplementos necesarios para inducir la capacitación (Cap) y la reacción acrosomal (AR).

***DISCUSIÓN***



Los estudios de esta tesis profundizaron el conocimiento sobre los lípidos con uniones éteres del testículo y sus células y pusieron en evidencia aspectos hasta ahora desconocidos sobre los lípidos del epidídimo y sus regiones, así como de los espermatozoides.

### **-Fosfolípidos con uniones éteres**

De los fosfolípidos con uniones éteres estudiados, uno que estimuló gran interés fue la plasmanilcolina. Como decimos en la introducción, para sintetizar este fosfolípido, así como la plasmaniletanolamina, un prerrequisito es la actividad de enzimas peroxisomales claves entre las cuales está la AGPS. En el capítulo 2 mostramos que el mRNA de esta enzima se expresó en el testículo y varias veces más fuertemente en el epidídimo. Este resultado concuerda con un trabajo previo en el que se investigó la expresión, tanto a nivel mRNA como proteína de esta enzima y su antecesora, la alquilglicerona fosfato aciltransferasa, en ambos tejidos de la rata (Reisse *et al.* 2001). En el caso del testículo sin embargo estos autores detectaron las enzimas en células del intersticio pero no en células de los túbulos seminíferos, lo que también podría ser nuestro caso, ya que la detectamos en el testículo entero. Ellos concluyeron de sus observaciones que los peroxisomas que observaban pertenecerían a las células de Leydig, que las células germinales y de Sertoli no contenían peroxisomas, por lo que los espermatozoides adquirirían sus plasmalógenos al madurar en el epidídimo. Nuestra determinación en el Capítulo 2 corroboró que efectivamente la expresión de la AGPS fue significativamente más baja en el testículo que en el epidídimo, pero también vimos que las células germinales aisladas de los túbulos seminíferos (Cap 1) presentan *productos* de enzimas peroxisomales como la plasmanilcolina y la plasmaniletanolamina (un 5% y un 3 % de los fosfolípidos, respectivamente). La plasmaniletanolamina producida a partir de esta última tampoco fue muy alta y la plasmenilcolina producida a partir de ésta última fue aún más baja (3.5 y < del 1% de los fosfolípidos). En las células de Sertoli, la cantidad de las subclases plasmanil fue aún menor, como lo sugiere nuestra determinación mostrando menor contenido en túbulos seminíferos que en células germinales.

Llamativamente, otro estudio demostró que las células de Sertoli y las germinales poseen peroxisomas, que éstos se localizan en las espermatogonias, que tienen enzimas diferentes a los peroxisomas de las células del intersticio, y que se pierden en el curso de la espermatogénesis (Luers *et al.* 2006). Un estudio ulterior concluye que estas organelas están presentes en la mayor parte de las células testiculares, excepto en los espermatozoides maduros, y que en las espermátidas varían en estructura, abundancia y localización dependiendo de su grado de maduración (Nenicu *et al.* 2007). Más recientemente se confirmó esto y se demostró que sólo los peroxisomas se pierden de las células germinales en las últimas fases de

la espermiogénesis, pues estas organelas son segregadas de las espermatidas en los cuerpos residuales (Dastig *et al.* 2011). Entre las múltiples funciones de los peroxisomas de las células germinales estos autores mencionan la síntesis de plasmalógenos.

Creemos que no podría excluirse que las células de Sertoli poseyeran peroxisomas, dado que poseen actividad fagocítica (Wang *et al.* 2006), y normalmente luego de la fagocitosis de los cuerpos residuales y apoptóticos (los primeros provenientes de las muchas células germinales que normalmente egresan y los segundos de las que mueren por día) entre otras actividades deben  $\beta$ -oxidar los PUFA y los VLCPUFA que éstos transportan en sus lípidos. Inmunoreactividad para enzimas peroxisomales, entre las cuales está la enzima peroxisomal multifuncional-2, se ha hallado en células de Sertoli, células germinales y de Leydig (Huyghe *et al.* 2006). En su deficiencia, se acumulan sustratos de la  $\beta$ -oxidación peroxisomal como VLCPUFA y ácido pristánico, y los niveles de 22:5n-6 en el testículo se reducen. La delección selectiva de peroxisomas en células de Sertoli murinas lleva a la infertilidad. En el interior de los túbulos seminíferos asociamos actividad fagocítica y peroxisomas con las células de Sertoli. Sin embargo, los peroxisomas son organelas abundantes y activas en los fagocitos, p. ej. los macrófagos residentes en el peritoneo (Eguchi *et al.* 1979). La alta concentración de peroxisomas que varios de los autores mencionados más arriba localizan en el intersticio entre los túbulos seminíferos como pertenecientes a células de Leydig, en algunos casos con actividad catalasa, podrían pertenecer a los abundantes macrófagos residentes en ese sitio (Hedger 2002, Haider 2004, Winnall & Hedger 2013).

Lamentablemente a los fosfolípidos con uniones 1-O-alkil-éter no los estudiamos por separado en las células espermatogénicas para conocer sus ácidos grasos aún, pero nos intrigó sobremanera que la proporción de plasm<sub>an</sub>ilcolina y plasm<sub>an</sub>iletanolamina fuese dos o más veces más alta en las células germinales que en los túbulos seminíferos (Cap. 1), lo cual indica que pertenecen a ellas y no a las células de Sertoli. La suma de plasm<sub>an</sub>ilcolina y plasm<sub>an</sub>iletanolamina en las células germinales alcanzó al 8% de los fosfolípidos, mientras la suma de plasm<sub>en</sub>ilcolina y plasm<sub>en</sub>iletanolamina contribuyó con apenas un 5% a los mismos.

El hecho de que los cuerpos residuales se enriquezcan en los dos plasmalógenos mientras se empobrecen en plasm<sub>an</sub>il-GPL (Cap 1) con respecto a las células espermatogénicas sugiere que estos últimos lípidos se “conservan” en ellas para ser destinados a los espermatozoides, mientras los plasmalógenos se descartan y se envían a “reciclar” a las células de Sertoli *vía* cuerpos residuales. Esta especulación coincidiría con el hecho de que los espermatozoides maduros no

contienen peroxisomas y concordaría con que contuvieron más plasmanilcolina que plasmaniletanolamina (Cap. 3).

Más adelante sugeriremos que una buena parte de los TUE que se forman en el testículo provienen del catabolismo de los GPL con uniones éteres. Queda por contestar la pregunta de por qué, si los CR contienen más alquenil-GPL que alquil-GPL a ser enviados a catabolizar a las células de Sertoli, luego de su procesamiento en éstas los TUE “normales” del testículo maduro contienen mucho más alquil-DAG que alquenil DAG. Una posibilidad es que los primeros sean más estables que los segundos, cuya unión vinil-éter es más fácilmente oxidable.

El hecho de que los espermatoцитos y espermátidas produjeran plasmanilcolina, plasmaniletanolamina y plasmeniletanolamina, pero muy poca plasmenilcolina (Cap. 1) mientras los espermatozoides ya maduros extraídos de la *cauda* epididimal contuvieran abundancia de los dos plasmalógenos, pero mucha más plasmenilcolina que plasmeniletanolamina (Cap. 3) enfatiza el rol crucial del epitelio epididimal en la adquisición de estos lípidos por las gametas. Los presentes resultados sobre la alta expresión de la AGPS, en el epidídimo concuerdan con los reportado por Reisse et al. (2001), a lo que aquí agregamos la cuantificación, que demuestra la mayor expresión de esta enzima en el *corpus* y el *caput* que en la *cauda*.

Nuestros datos mostraron que el epidídimo contuvo, en el epitelio de todas sus regiones, cantidades importantes de las cuatro subclases de GPL con uniones éteres (Cap. 2) además de PC y PE. Aún el epidídimo inmaduro, en ausencia de espermatozoides, contuvo plasmeniletanolamina con 22:4n-9, mientras la plasmenilcolina con 22:4n-9 sólo apareció en el epidídimo en coincidencia con la presencia de espermatozoides.

### **-Plasmenilcolina**

Una pregunta que nos intriga desde hace años en vista de la progresiva abundancia en la proporción de plasmenilcolina rica en 22:3 y 22:4n-9 que adquiere el espermatozoide de rata a medida que avanza y madura en su tránsito por las tres distintas regiones epididimales (Cap. 3), es cuál será el rol del epidídimo en esta adquisición. Los presentes resultados muestran que en el epidídimo existe una concentración importante de GPL y lípidos neutros con altas proporciones de 18:1n-9, un precursor obligado de los abundantes PUFA n-9 que también produce. Éstos pueden considerarse PUFA exclusivos del epidídimo, ya que ni el testículo ni en otros tejidos se detectan. En el presente estudio, lípidos con estos ácidos grasos experimentaron grandes aumentos en su cantidad en el epidídimo con el desarrollo postnatal, y, tanto las regiones epididimales como los espermatozoides se enriquecieron en ellos en el sentido testículo→caput→corpus→cauda. Ello indica que

el epidídimo es el responsable de proporcionar la plasménicolina con PUFA n-9 a las gametas. El mecanismo bioquímico sobre cuáles de sus células sintetizan este plasmalógeno, cómo lo hacen, y cómo lo transfieren a los espermatozoides aún está por establecer.

Entre las *células* del epitelio pseudoestratificado epididimal, las más abundantes en toda su extensión son las principales, que en el adulto normal se acompañan de células narrow, claras, y basales (Hermo & Robaire 1992). Todas ellas tienen actividad fagocítica intensa por una parte, y las principales tienen capacidad para producir proteínas a incorporar a los espermatozoides en tránsito por otra. Algunas de las proteínas adquiridas por las gametas durante su maduración epididimal se comportan como proteínas integrales de membrana, y otras son proteínas que se asocian a la membrana del espermatozoide a través de un ancla de glycosilfosfatidil-inositol (GPI). Estas últimas son secretadas en una forma apocrina por el epitelio epididimal, especialmente en la región del *caput*, incluidas en estructuras rodeadas de membrana denominados *epidídimosomas* (Sullivan *et al.* 2005). Estas partículas nos intrigan sobremanera por varios motivos. Uno de ellos es que su membrana tiene una composición en sus lípidos muy distinta del tejido epididimal, al ser muy ricas en esfingomielina y ácido araquidónico (Rejraji *et al.* 2006). Si bien nunca se mencionó la posibilidad de que en su membrana contuvieran lípidos con uniones éteres, sobre la base de los presentes resultados creemos que eso sería posible, ya que a través de estos exosomas se envían a los espermatozoides proteínas y lípidos *que surgen juntos* de las membranas del Golgi. Otro motivo de interés en estas partículas es que el fosfoinosítido que forma parte de las anclas proteicas con glicosilfosfatidilinositol (GPI-AP) mencionadas es un 1-O-alquil-2-acil-fosfatidilinositol (Fujihara & Ikawa 2015), lo que implica que además de los descritos en esta tesis, el epidídimo fabrica a través de otras vías biosintéticas ( $PA \rightarrow CDP-DG \rightarrow PI$ ) otros lípidos con una unión alquilo. Un tercer punto que nos intriga sobremanera es que entre las proteínas que los exosomas transportan en su interior hacia el lumen epididimal, se encuentra la citoquina conocida como factor inhibidor de la migración de los macrófagos (MIF) (Sullivan *et al.* 2005).

Volviendo a la biosíntesis de lípidos, uno entre los múltiples posibles caminos para que la plasménicolina rica en 22:3n-9 y 22:4n-9 se sintetizase en las células principales del epitelio y se transfiriese a las gametas es como componente de los epidídimosomas. En cuanto a las enzimas y mecanismos involucrados, pueden proponerse varios. Uno de ellos podría ser que en la célula epitelial, la abundante plasméniletanolamina con 22:4n-9 existente simplemente intercambiara ese PUFA con una especie molecular de plasménicolina que contenga otro ácido graso en sn-2, por una aciltransferasa o una transacilasa (Yamashita *et al.* 2014). La plasménicolina conteniendo 22:4n-9 se enviaría al espermatozoide, del cual en intercambio se

extraerían segmentos de membrana conteniendo alguno de los GPL que éste trae desde el testículo, como p. ej. la PC.

La fosfolipasa A2 secretoria del grupo III (sPLA2-III), es un miembro de la familia de las fosfolipasas A2 secretorias que se expresa en el epitelio proximal del epidídimo de ratón (Sato *et al.* 2010). Durante el tránsito epididimal, la PC normalmente sufre (los autores deberían decir los CGP sufren) una *remodelación* en sus grupos acilos desde 18:1n-9, 18:2n-6 y 20:4n-6 a 22:5n-6 y 22:6n-3, al tiempo que se generan metabolitos de la 12/15 lipoxigenasa. Ambas actividades están comprometidas en ratones deficientes en el gen que codifica la sPLA2-III, en cuyos espermatozoides caudales se observa maduración anormal, defectos en los flagelos y en los acrosomas, y disfunciones como hipomotilidad y baja capacidad para fertilizar oocitos. Una actividad similar podría estar operando en nuestro caso en el epidídimo de rata durante la maduración espermática. Esta enzima, secretada por las células epiteliales, intervendría para intercambiar una parte de los ácidos grasos incluyendo el 20:4n-6 y el 22:5n-6 con que vienen provistos los CGP de los espermatozoides desde el testículo, por 22:3n-9 y 22:4n-9. Nuestros datos del Capítulo 3 sugieren que este intercambio es muy activo en las tres subclases de CGP, en especial en la plasmenilcolina

En el hígado, la metilación de la PE produce PC por la acción catalítica de la PE-N-metil transferasa (PEMT). Otra de las formas de biosintetizar Pls-Cho con 22:4n-9 podría ser a partir de Pls-Et con 22:4n-9 existente, a través de tres metilaciones sucesivas de ésta por la PE metiltransferasa (PEMT). Esta enzima, que utiliza S-adenosil-metionina (SAM) como dadora de metilos, ha sido larga y ampliamente estudiada en el hígado (que prácticamente carece de plasmalógenos), por el grupo de Vance, desde la década de 1980 (Ridgway & Vance 1987) a la actualidad (Vance 2014, Gao *et al.* 2015). En los tejidos y células distintas de hepatocitos en los que se la ha estudiado, los autores siempre se refieren a la metilación de la PE, cuando en tejidos distintos del hígado es posible que se metilen con distinta intensidad las distintas subclases de EGP. Sin embargo, aún hoy se tiene muy escaso conocimiento sobre la posible actividad diferencial de la PEMT hacia cada una de las tres subclases de EGP. Es interesante que aparte del hígado, transcriptos para la PEMT se han observado en testículo humano, indicando su posible acción en la biosíntesis de PC en este tejido (Shields *et al.* 2001). El *corpus* epididimal y sus células parecen atractivos para estudiar por separado la actividad de metilación de la enzima sobre las tres subclases de EGP.

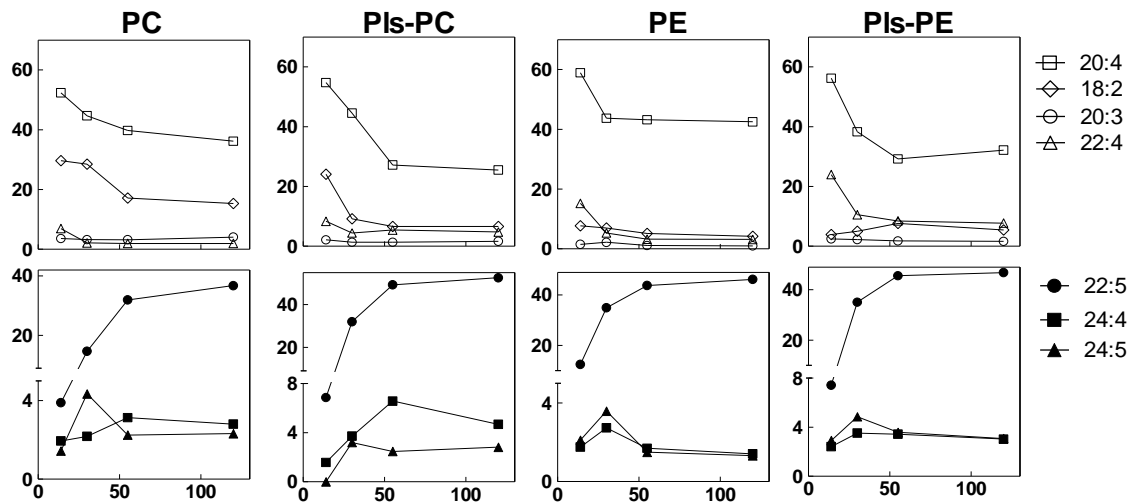
Con respecto a grupos acilos de las tres subclases de CGP y EGP en el epidídimo, llamaron mucho nuestra atención las diferencias en ácidos grasos por subclase que se dieron en el *caput*. 1) Las mayoritarias PC y PE mostraron una

composición en ácidos grasos similar, con 18:0, 18:1n-9, 20:4n-6 y 22:5n-6 como ácidos grasos importantes. 2) Las minoritarias plasmaniletanolamina y la plasmanilcolina del caput, en cambio, se caracterizaron ambas por ser muy ricas en ácidos grasos saturados, 16:0 y 18:0, como corresponde a lípidos que se sintetizan *de novo*. 3) Los dos plasmalógenos de esta región, plasmenilcolina y plasmeniletanolamina, eran ricas en 20:4n-6 y 22:5n-6, seguidos éstos en un lejano tercer lugar por 22:3n-9 y 22:4n-9. Esta composición de ácidos grasos, localizada en esta región, es compatible con la idea de que los dos alquil-acil-GPL sean sintetizados *de novo en el caput*, la plasmaniletanolamina sea convertida en plasmeniletanolamina, ésta en plasmenilcolina, y ambos plasmalógenos sean “enriquecidos” en PUFA n-6, los cuales podrían ser provistos por grupos acilos cedidos por PC y PE. En el *corpus*, el porcentaje de 18:1n-9 y de PUFA n-9 se incrementó en las seis subclases. Por último en la *cauda*, se incrementaron los % de PUFA n-6 y n-9.

### **-PUFA de GPL testiculares y epididimales**

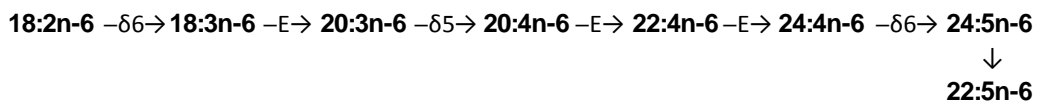
Los presentes estudios mostraron que las células inmaduras, tanto del testículo como del epidídimo, ya tenían la capacidad de sintetizar lípidos con uniones éteres. En el caso del testículo, al día postnatal 14, en los túbulos seminíferos solo hay espermatogonias y células de Sertoli que ya se han diferenciado completamente. La presencia de estos lípidos está de acuerdo con lo que discutimos más arriba, de que las espermatogonias y las células de Sertoli contienen peroxisomas y son capaces de sintetizar plasmalógenos. Los fosfolípidos testiculares en este momento del desarrollo postnatal contenían abundante 20:4n-6 pero aún cantidades mínimas de 22:5n-6 (Cap. 1). El principal cambio con el desarrollo postnatal fue el incremento, en los GPL, de sus PUFA de 20 y 22 carbonos.

En el caso de la rata, el 22:5n-6 comenzó a aumentar en la vida postnatal en asociación con la presencia de espermatoцитos (Cap. 1), lo que sugiere que éste es un ácido graso prácticamente exclusivo de los lípidos de las células germinales. Su incremento permite asociarlo con una actividad biosintética propia de los espermatoцитos, en especial de los espermatoцитos en paquitenos. Esto está apoyado, no solo por la presencia de abundante 22:5n-6 sino también de PUFA de 24 carbonos en los GPL de estas células, en las cuales se expresan activamente dos elongasas (Oresti et al., 2013) necesarias para sintetizar el 22:5n-6. Las espermátidas demostraron haber acumulado aún más 22:5n-6 y PUFA de 24 carbonos que los espermatoцитos. Como era de esperar, el porcentaje de 22:5n-6 se incrementó mientras el de sus precursores, el 20:3n-6, el 20:4n-6 y el 22:4n-6, disminuyeron, como se observa en la figura 1, en el que se consideraron solamente los PUFA de la serie n-6:



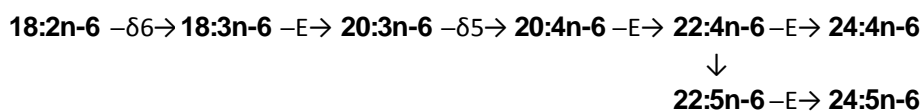
**Figura 1.** Cambios en las relaciones entre PUFA n-6 en PL del testículo con el desarrollo postnatal. Los datos se expresan en porcentajes entre ellos.

Los resultados sugieren que primero en el desarrollo se expresan la  $\delta$ -5 desaturasa requerida para formar el 20:4n-6 y más adelante aparece la actividad encargada de introducir la doble ligadura en C4 para dar el 22:5n-6. El hecho de que los VLCPUFA 24:4n-6 y 24:5n-6 se incrementaron tempranamente con el desarrollo para disminuir después, como muestra este esquema, mientras el 22:5n-6 continuaba aumentando, durante un tiempo lo encontramos coherente con la propuesta de que la vía de biosíntesis del predominante 22:5n-6 involucra una elongación del 22:4n-6 a 24:4n-6, seguida de una  $\delta$ -6 desaturación de éste a 24:5n-6 y luego un acortamiento de la cadena de éste en dos átomos de carbonos para dar el 22:5n-6 (Voss *et al.* 1991).



Sin embargo, esta propuesta, que implicaba la participación desaturasas y elongasas microsomales y de una  $\beta$ -oxidación peroxisomal del 24:5n-6, recibió fuertes críticas fundamentadas con sólidos y convincentes argumentos (Infante & Huszagh 1998), concluyendo que el 24:4 y el 24:5 eran simples productos de la elongación del 22:4 y del 22:5 y no precursores de éste. Estos autores propusieron que la biosíntesis de 22:5n-6 y la del 22:6n-3 tienen lugar en la mitocondria, a la cual acceden los PUFA precursores por un mecanismo dependiente de carnitina, y que en esta organela, a través de los mismos pasos pero utilizando isoformas específicas de las enzimas para cada serie, se biosintetizan el 22:5n-6 y el 22:6n-3. En definitiva, el 22:5n-6 se sintetizaría fácilmente a partir del araquidonoil-CoA y del abundante acetyl-CoA

presente en la mitocondria, y luego una parte de ellos se destinaría a elongaciones sucesivas:



Estas explicaciones nos hicieron pensar que, de ser así, en nuestro caso también era posible que el 24:4n-6 y del 24:5n-6 fueran productos directos de la elongación microsomal del 22:4n-6 y del 22:5n-6 previamente formados, y que sus porcentajes disminuyeran luego de aumentar al progresar el desarrollo postnatal en el testículo, no necesariamente porque se utilizan para ser “acortados” a 22:5n-6, sino para ser “elongados” a 28:4n-6 y 30:5n-6, respectivamente, dos prominentes representantes entre los VLCPUFA que abundan en la esfingomielina y la ceramida de las células germinales y los espermatozoides que de ellas derivan (Furland *et al.* 2007b, Oresti *et al.* 2010b).

Otra controversia, aún no resuelta, sobre si las células espermatogénicas son capaces de sintetizar sus propios PUFA o si los reciben “preformados” desde las células de Sertoli, también se originó de interpretación de resultados obtenidos *in vitro*. Cuando células germinales aisladas de ratas adultas son incubadas con ácidos grasos de 20 y 22 carbonos marcados [ $1\text{-}^{14}\text{C}$ ], se forman fácilmente los correspondientes ácidos grasos de 22 y de 24 carbonos, pero poco de 22:5n-6 o de 22:6n-3, lo que sugirió que estas células prácticamente “carecían” de  $\delta$ -6 desaturasa (Retterstol *et al.* 2001). En cambio, cuando las células de Sertoli se incuban con [ $1\text{-}^{14}\text{C}$ ] 20:5n-3 como sustrato *por 24 horas*, éste es activamente elongado y desaturado a 22:6n-3. Dado que las células germinales de rata normalmente tienen *mucho* más 22:5n-6 que las células de Sertoli, y que su capacidad para sintetizarlo es menor, estos autores propusieron que el 22:5n-6 se sintetizaría en éstas últimas y luego se transferiría a las germinales. Sin embargo, no pudieron comprobar tal transferencia en co-cultivos celulares. Posteriormente el mismo grupo, estudiando la expresión (mRNA) de la  $\delta$ -9, la  $\delta$ -5 y la  $\delta$ -6 desaturasa en células testiculares (Saether *et al.* 2003), mostraron que la expresión (mRNA) de éstas dos últimas era mucho menor en células germinales que en células de Sertoli, lo que fortalecía su hipótesis. Sin embargo, se debe tener en cuenta que *in vivo*, los espermatoцитos primarios pasan un tiempo bastante largo en el estadio de paquiteno de la profase (unos 9 días) durante el cual ordenadamente deben sintetizar muchos compuestos (moléculas pequeñas y macromoléculas como DNA, mRNAs, proteínas) además de ácidos grasos y lípidos, por lo que puede pensarse que esto se debe hacer en forma secuencial y concertada. Tal vez la síntesis de fosfolípidos necesaria para las membranas de las células que se generarán luego de la meiosis a partir de ellos ocurra sólo en algún corto lapso dentro de este largo

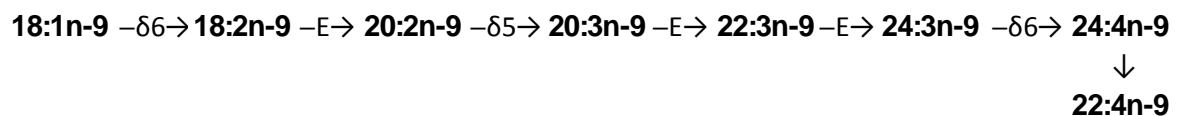


período, y es posible que sea un requisito temprano. Puede especularse que una vez cumplido el propósito de formar la cantidad suficiente de estos lípidos necesaria para las membranas de las células hijas, en algún momento se deje de expresar el mRNA de estas desaturasas en los paquitenos, se frene su actividad, o sean degradadas, lo que explicaría su baja expresión.

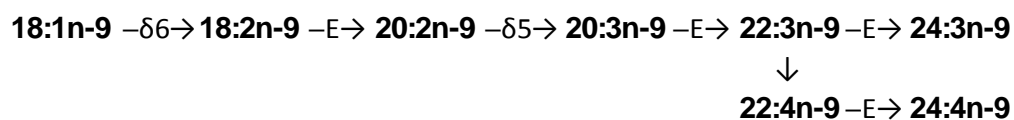
Dado que las espermátidas tempranas y las redondas que se forman luego de la meiosis son más pequeñas que los espermatoцитos, prácticamente podrían “heredar” de éstos los lípidos y ácidos grasos preformados contenidos en membranas de organelas intracelulares (p. ej., las mitocondriales, las nucleares, las microsomales, etc), así como lípidos neutros en gotas lipídicas. Dado que de aquí en más las espermátidas ya no se dividirán, sino que se “remodelarán” en la espermiogénesis, requerirán cantidades modestas de nuevos PUFA, sólo las necesarias para reemplazar ácidos grasos preexistentes como el 20:4n-6 por otros como el 22:5n-6, lo que explicaría la baja expresión de las desaturasas en ellas. En apoyo de esta idea, tanto los espermatoцитos en paquitenos como las espermátidas redondas expresan bajos niveles de las desaturasas pero en cambio ambos expresan (mRNA) dos elongasas que participan en la formación de estos PUFA (la ELOVL2 y la ELOVL5), casi sin diferencias entre ellas (Oresti *et al.* 2010b).

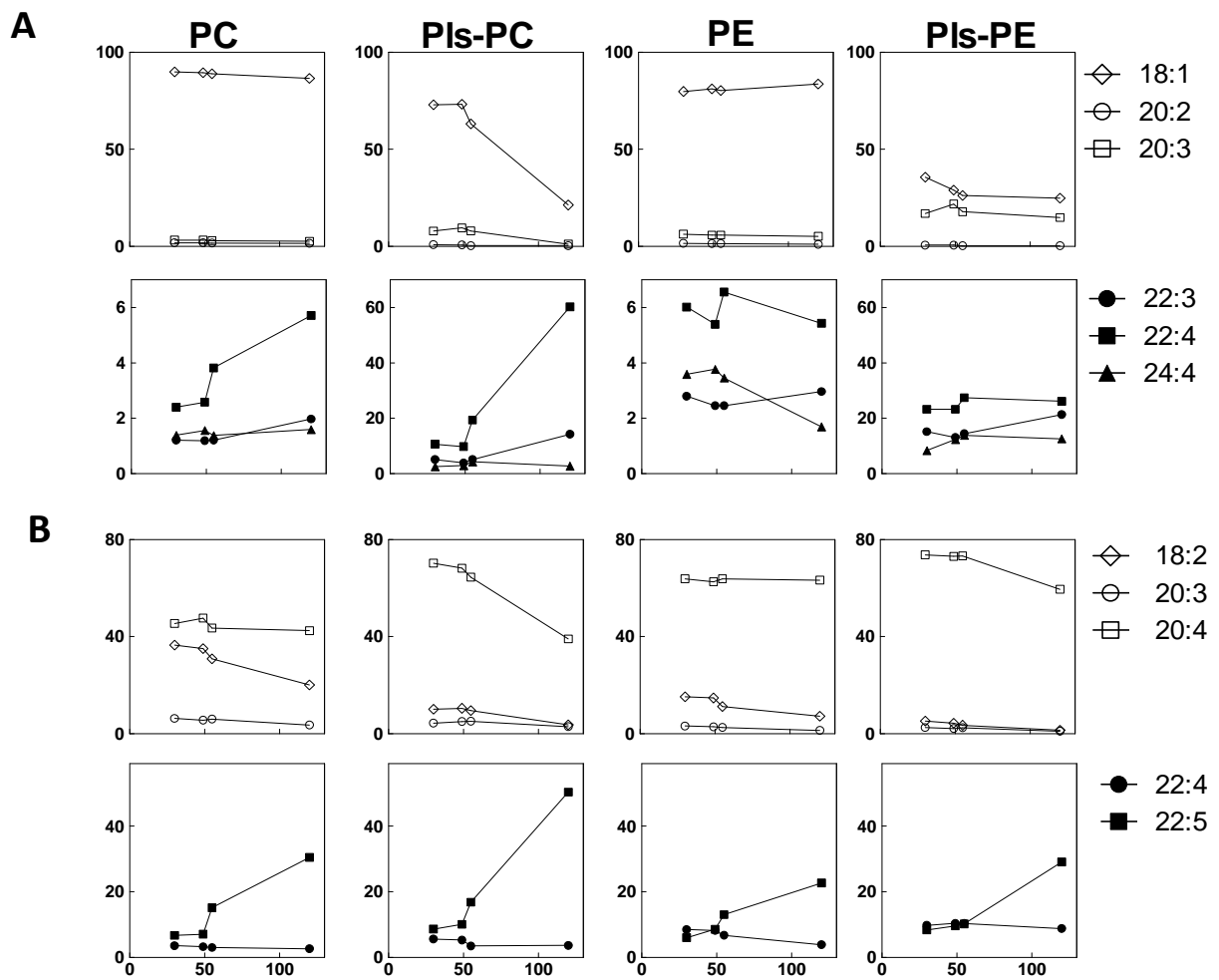
En la figura 2 se muestran los porcentajes de PUFA n-9 y n-6 durante el desarrollo postnatal del epidídimo. Los pasos enzimáticos necesarios para la síntesis del 22:4n-9 por lo tanto podrían asimilarse a los de los PUFA de 22 carbonos de las otras dos series, 22:5n-6 y el 22:6n-3 a través de las mismas vías alternativas:

1)



2)





**Figura 2.** Cambios en las relaciones entre PUFA n-9 (A) y PUFA n-6 (B) en PL del epidídimo con la edad postnatal. Los datos se expresan en porcentajes entre ellos.

**-Triglicéridos con una unión éter**

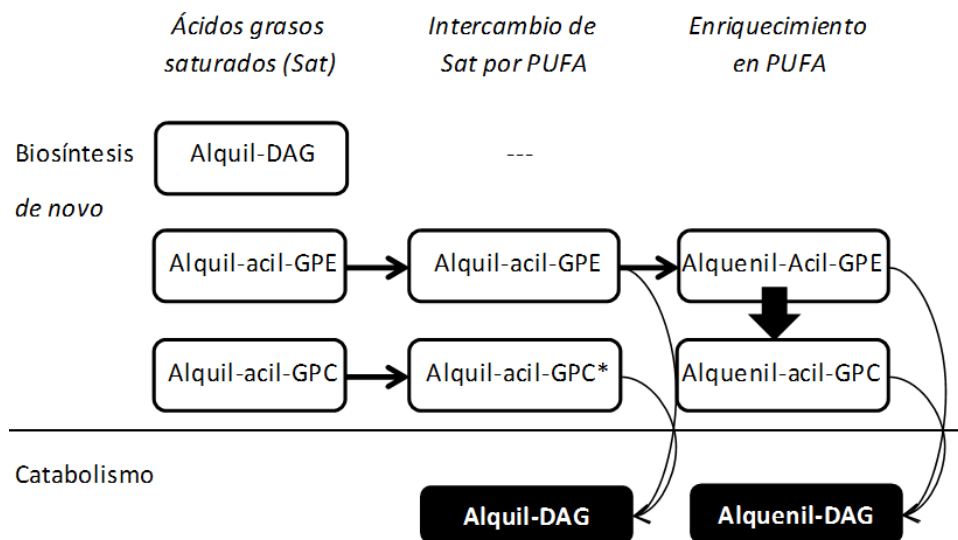
Un hallazgo de gran interés en esta tesis, por su presencia tanto en testículos como en epidídimos normales, y tanto en animales en desarrollo como en adultos, fueron los triglicéridos con una unión éter (TUE). Una propiedad común entre los TUE de ambos tejidos, si bien con diferencias en las proporciones entre ellos, fue que en ambos casos predominaron los 1-O-alkil- sobre los 1-O-alkenil- DAG. Esta fue una de las cuestiones que más nos intrigarón sobre estos lípidos, dado que en los GPL de ambos tejidos, por el contrario, los que tienen una unión 1-O-alkilo fueron muy inferiores cuantitativamente a los que tuvieron uniones 1-O-alkenilo.

Si repasamos la vía de síntesis que esquematizamos en la Fig. 7 de la Introducción, los tres lípidos con una unión 1-alkilo (plasmanilcolina, plasmaniletanolamina y alkil-DAG) podrían surgir del mismo camino, la vía de Kennedy. Sin embargo, como describimos en la Introducción, se sabe que la vía de

novo forma especies moleculares con ácidos grasos saturados, y que los PUFA se introducen después de formadas éstas especies por reacciones de intercambio de acilos vía acil-transferasas (ver más adelante esquema 1). Si bien en los dos tejidos del tracto reproductor estudiados detectamos especies de TUE con ácidos grasos saturados, en ambos tejidos predominaron las especies con PUFA. La principal diferencia entre los TUE testiculares y los epididimales fue en su cantidad y en su composición de ácidos grasos, la cual reflejó la de los fosfolípidos: en el testículo los TUE fueron ricos en 22:5n-6, 24:4n-6, 24:5n-6 y PUFA de muy larga cadena más largos (Cap. 1) mientras que en el epidídimo fueron ricos en PUFA n-9, PUFA n-6 y monoenoicos. La principal semejanza fue que en ambos casos 1) los alquil-DAG predominaron sobre los alquenil-DAG, y 2) que los alquenil-DAG contenían un mayor porcentaje de PUFA n-6 (20:4n-6, 22:5n-6) que los alquil-DAG.

En cuanto a las células en que se producen los TUE, estos lípidos fueron excesivamente minoritarios en las células germinales y cuerpos residuales aislados, pero mucho más altos en los túbulos seminíferos (Cap. 1) (donde sólo había células germinales y células de Sertoli), por lo que inferimos que los TUE se forman en estas últimas. Las células de Sertoli guardan una muy estrecha relación estructural y metabólica con las germinales, tienen actividad fagocítica y uno entre sus muchos roles *normales* es el de fagocitar las células germinales apoptóticas (Nakanishi & Shiratsuchi 2004, Nakagawa *et al.* 2005, Xiong *et al.* 2009) y los cuerpos residuales (Kerr & De Kretser 1975) que continuamente se forman, y luego procesar los materiales que contienen. Entre estos cuerpos hay proteínas, mRNAs, y lípidos (GPL y colesterol en restos de membranas y organelas, y abundantes TAG). Los GPL allí contenidos podrían perder su grupo polar dando un diglicérido, cuyo hidroxilo podría ser rápidamente esterificado con otro PUFA para dar los correspondientes triglicéridos, esto es, TAG y TUE, lo que implica la actividad de una acilCoA: diglicérido acil transferasa (DGAT). La enzima generadora de TUE podría ser *una* de las dos isoformas de la DGAT cuya expresión diferencial entre células (germinales, Sertoli, e intersticiales) se ha reportado en testículo de rata (Oresti *et al.* 2013).

En las células epiteliales del epidídimo *normal* del adulto debe ocurrir un catabolismo similar continuo de fosfolípidos pues los espermatozoides “en tránsito” pierden una buena cantidad de sus fosfolípidos al madurar entre caput y cauda (Evans & Setchell 1979, Parks & Hammerstedt 1985, Rana *et al.* 1991). Restos de estas membranas son endocitados por las células epiteliales, a lo que seguiría en ellas el catabolismo (hidrólisis en distintas partes de la molécula) de los fosfolípidos así incorporados (con eventual generación de DG y ácidos grasos que podrían combinarse para formar glicéridos neutros (esquema 1). Tanto los TG (TAG y TUE) como las gotas lipídicas abundaron normalmente en las células de las tres regiones epididimales (Cap. 2).



**Esquema 1.** Posibles caminos biosintéticos de GPL y glicéridos neutros con uniones éteres.

Esta propuesta se vio reforzada por los efectos sobre los TUE durante el desarrollo, ya que en el testículo (Cap 1) se observó un pico de su concentración el día 21 postnatal, justo alrededor de la fecha en que se sabe que se produce la primera onda de espermatogénesis acompañada de la apoptosis (fisiológica) de un gran número de espermatoцитos (Jahnukainen *et al.* 2004). También se observó un pico de concentración de TUE en el epidídimo (Cap 2) al día postnatal 49, poco tiempo después de que los lúmenes vacíos de sus conductos se hubiera detectado una oleada de células en degeneración provenientes del testículo (Cap 2). Estas células, que podrían tener funciones regulatorias, al día 49 habían sido eliminadas y en parte reemplazadas por los primeros espermatozoides. En esta circunstancia, los alquenil-DAG no se modificaron mientras se incrementaron significativamente alquil-DAG ricos en 18:1 y PUFA<sub>n</sub>-9, lo que sugiere que se originaron en células del propio epitelio epididimal.

En el caso del testículo, la idea de que los TUE se forman durante el catabolismo de GPL con uniones éteres en células de Sertoli se ve fuertemente reforzada por el hecho de que, en condiciones en que éstas sobreviven cuando mueren células espermatogénicas, como es el caso del criptorquidismo (Furland *et al.* 2007a), la administración de doxorubicina (Zanetti *et al.* 2007), la irradiación con rayos X (Oresti *et al.* 2010a), y en el caso de esta tesis, la hipertermia (Cap. 1), se puede asociar la muerte de células germinales con la caída en los niveles de GPL y la aparición concomitante de cantidades aumentadas de TAG y TUE, además de EC.

En el epidídimo afectado por los episodios repetidos de hipertermia, en el presente trabajo observamos que se generaron importantes cantidades de alquil-DAG

y alquenil-DAG una semana después, en las tres regiones, ambos con un impacto mayor en el *caput* que en el *corpus* y que en la *cauda*. La cantidad de TUE acumulada fue mayor y más rápida aquí que en el testículo (pico a la semana), y también fue más rápida y eficiente su remoción, pues los TUE habían bajado al nivel anterior una semana después, mientras en el testículo continuaba el incremento de TUE (y también de EC) hasta después de la segunda semana post-hipertermia.

La diferencia más llamativa sobre los efectos de la hipertermia entre el testículo y el epidídimo fue que en el primero los GPL disminuyeron sus niveles mientras en el segundo aumentaron. Solo en parte el origen de estos GPL aumentados podrían ser células intraluminales. Para ello debería suponerse que siete días después de la hipertermia las células de Sertoli en los túbulos seminíferos continuaron sosteniendo la espermiogénesis y no dejaron de producir el *fluido* en el que normalmente se transportan los espermatozoides desde el testículo por la *rete testis* hasta la cabeza epididimal. De ese modo, parte de los GPL incrementados en el *caput* epididimal podrían encontrarse en el lumen y ser componentes 1) de las células germinales dañadas y restos celulares desprendidas de su sitio normal en el testículo a causa de la hipertermia (Fig 1, Cap. 1); 2) de los pocos espermatozoides que se formaron en una semana a partir de las espermátidas elongadas que no fueron dañadas por la hipertermia y que continuaron su diferenciación saliendo del testículo, y 3) de los espermatozoides que se encontraban en la *rete testis* y conductillos eferentes y arribaron al *caput* epididimal. Además, independientemente de los efectos sobre el testículo, cada una de las exposiciones a 43 °C puede haber afectado también a los espermatozoides que se hallaban en el epidídimo cosa de la cual no encontramos referencias para un diseño experimental como el presente pero sí para el caso del criptoepididimismo (Bedford 1991).

Que en el *caput* más activamente que en las otras dos regiones se debió producir una intensa y eficiente fagocitosis de células y espermatozoides dañados y sus restos, con degradación de sus GPL y producción de TAG y TUE en células no dañadas tiene cierto apoyo en el hecho de que los TUE formados en la primera semana fueron alquil-DAG y alquenil-DAG excepcionalmente ricos en 22:5n-6 (Cap 2). Sin embargo, las especies de TUE “endógenas” del epitelio epididimal, las ricas en 18:1n-9 y 22:3n-9 y 22:4n-9, no sólo incrementaron *también* varias veces su concentración como consecuencia de la hipertermia, sino que lo hicieron en las tres regiones, *caput*, *corpus* y *cauda*.

Una posible explicación al inesperado resultado de que después de las exposiciones a la hipertermia, salvo el peso, todo aumentó en el epidídimo (fósforo lipídico, proteína, las subclases estudiadas y los TUE) es que se hubiera incrementado el número de células. Es improbable que éstas fueran las células principales porque ya

no se dividen en el adulto. Buscando una posible respuesta, encontramos que el compartimiento basal del epitelio epididimal contiene una densa población de células que pertenecen al sistema mononuclear fagocítico, compuesto por células dendríticas y macrófagos (Da Silva *et al.* 2011). Precisamente en el segmento inicial del *caput*, fagocitos mononucleares establecen interacciones extremadamente estrechas con el epitelio epididimal, proyectando finas dendritas entre la mayor parte de las células epiteliales (Da Silva & Barton 2016). Algunas de estas delgadas proyecciones pasan a través de las uniones estrechas entre las células epiteliales (que conforman la barrera hematoepididimal) para sensar la calidad del medio en el que se desarrollan los espermatozoides. Dado que el epidídimo a través de las vías excurrentes está en contacto con el medio externo, estas células continuamente monitorean el medio en el que los espermatozoides se desarrollan con la doble finalidad de protegerlos contra posibles disturbios (entre otros, las infecciones) y de establecer la necesaria autotolerancia ante los antígenos de los espermatozoides, “extraños” al sistema inmune. Que estos fagocitos pueden haber ayudado en el aclaramiento del lumen epididimal conteniendo restos de células y espermatozoides dañados lo sugiere el hecho de cuando se provoca la apoptosis de las células del segmento inicial del *caput*, ellos sufren cambios morfológicos y fenotípicos importantes y engullen cuerpos apoptóticos y otros restos celulares, manteniendo la integridad de la barrera hematoepididimal (Smith *et al.* 2014).

#### **-Subclases de lípidos del espermatozoide**

Un hallazgo significativo de esta tesis fue que la mayoría de las clases y subclases de GPL del espermatozoide de rata, así como sus PUFA principales, presentaron diferencias cualitativas y cuantitativas entre fracciones puras de cabezas y colas. Son muy escasas las referencias previas existentes en la literatura que nos permitan hacer comparaciones o comentarios. Por ejemplo, un trabajo similar realizado en espermatozoides de mono determinó los niveles de desmosterol y de ácido docosaheptaenoico en los fosfolípidos de la cabeza y la cola (Connor *et al.* 1998).

Con respecto a la hidrólisis selectiva que sufrieron la fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina durante la activación funcional de los espermatozoides en incubaciones diseñadas para lograr la capacitación y la reacción acrosomal, hicimos una observación similar a la que se había hecho previamente con la esfingomielina: la mera incubación en condiciones control, esto es sin agregados, llevó a un pequeño pero significativo grado de hidrólisis de PC y PE, el cual se incrementó con la capacitación y la reacción acrosomal.

Un miembro de la familia de las fosfolipasas A2 secretorias, la X sPLA2, abunda en los acrosomas de los espermatozoides murinos, y es liberada en su forma activa durante la capacitación a través de la denominada “reacción acrosomal espontánea”

(Escoffier *et al.* 2010). La deficiencia específica de esta enzima reduce esta forma de reacción acrosomal y las gametas tienen menor eficiencia en la fertilización *in vitro* (IVF). Estas deficiencias pueden compensarse mediante la adición de liso-PC o de la enzima recombinante, mejorando el resultado de la IVF. Esta podría ser la enzima responsable de las hidrólisis de PC y PE (lípidos abundantes en la cola espermática) que observamos en el Capítulo 3 en los espermatozoides de rata durante las incubaciones. Más aún, explicaría el hecho de que, en comparación con los controles no incubados C2, tanto en los controles incubados C3 como en los espermatozoides capacitados, el grado de reacción acrosomal espontánea observado fuese bastante alto (12.4%, 29.7% y 48.8%, respectivamente, datos no mostrados). Por supuesto, luego de la reacción acrosomal inducida por A23187, el número de espermatozoides que la habían sufrido fue el máximo posible (91%). Esto concuerda con el hecho de que el grado de hidrólisis de PC y PE, que finalmente también afectó en parte a la plasmenilcolina, fue creciendo en la dirección C2→C3→Cap→AR (Capítulo 3), y permite sospechar que la mayor parte de esas hidrólisis, si bien ocurren contemporáneamente con la capacitación, se podrían adjudicar a las reacciones acrosomales espontáneas subyacentes.

El hecho de que la plasmenilcolina y especialmente la plasmeniletanolamina hayan sido más “resistentes” a dicha hidrólisis que los diacil-GPL sugiere que las primeras deben estar localizadas en sitios del espermatozoide no tan fácilmente accesible a esa fosfolipasa como los segundos, por ejemplo en membranas internas, como la nuclear, microsomal, o incluso la acrosomal interna.

Otro hallazgo interesante en las gametas está relacionado con los 1-O-alkil lípidos plasmaniletanolamina y plasmanilcolina. Nos sorprendió gratamente tanto el hecho de que estas subclases estuvieran casi exclusivamente presentes en la cola espermática, como que contuvieran 22:5n-6 como su ácido graso predominante. No encontramos por el momento explicación al hecho de que el 22:5n-6 fuera el ácido graso casi exclusivo en la plasmaniletanolamina mientras la plasmanilcolina contenía además de éste otros ácidos grasos, como 18:1n-9 y 22:4n-9. Dado que la plasmanilcolina rica en PUFA puede ser precursora del PAF, y que éste lípido bioactivo puede ser sintetizado en espermatozoides de rata (Muguruma & Johnston 1997), este hallazgo merece investigaciones adicionales. Entre otras cosas, creemos necesario determinar si algo similar se cumple en espermatozoides de otros mamíferos. De ser así, estos lípidos adquirirían importancia funcional.

#### **-Plasmanilcolina y PAF**

Recordemos que el PAF es sintetizado a través de dos caminos, uno denominado el de la remodelación y el otro el camino de novo (Snyder 1995). En el de

la remodelación, se produce liso PAF a partir de la hidrólisis de la 1-alkil-2-acil-GPC, a través de la actividad: 1) de una PLA2, o 2) de una transacilasa independiente de CoA que transfiere el grupo acilo de la plasmanilcolina otro GPL, tras lo cual el liso PAF es acetilado por la acetilCoA: liso PAF acetiltransferasa para formar PAF. En la vía de novo, el 1-alkil-2-liso-GP es acetilado para formar el 1-alkil-2-acetil-GP, que es desfosforilado por una fosfohidrolasa para dar 1-alkil-2-acetil-sn-glicerol, una especie de diglicérido que es convertida a PAF por acción de una CDP colina: 1-alkil-2-acetil- sn-glicerol colina fosfotransferasa específica. Por otra parte, el PAF tiene corta vida media. Su catabolismo es catalizado 1) por la PAF-acetilhidrolasa para dar liso-PAF, cuyo nivel desciende rápidamente pues puede ser, por una parte, re-acilado o re-acetilado en sn-2, y por otra, degradado a 1-alkil-liso-GP, el cual es desfosforilado a 1-alkil-glicerol.

En los neutrófilos activados se acepta ampliamente que el primer paso en la síntesis de PAF es la hidrólisis de la 1-alkil-2-araquidonoil-GPC como precursor preferido para dar liso-PAF, el cual es rápidamente acetilado por la acetil-CoA:liso-PAF acetiltransferasa. Un número de observaciones indicó que, más que por una fosfolipasa A2, el liso-PAF se forma por la acción de la transacilasa independiente de CoA presente en las células (Venable *et al.* 1991). En un estudio paralelo (Nieto *et al.* 1991) los autores presentan una serie de evidencias de que el fosfolípido que actúa en la transacilación es la **plasmeniletanolamina** rica en PUFA. La 1-alkil-2-araquidonoil-GPC transfiere su 20:4 a esta alquenil-liso-GPE por una transacilación Co-A independiente, generando liso-PAF, el cual es rápidamente acetilado para dar PAF.

La presencia de PAF en espermatozoides se ha reportado en varias especies de mamífero, incluyendo el hombre, y se lo ha asociado con la fertilidad (Angle *et al.* 1993). Se ha visto que estimula muchas funciones espermáticas (Sengoku *et al.* 1993), entre ellas la motilidad (Ricker *et al.* 1989), además de facilitar la capacitación y la reacción acrosomal (Krausz *et al.* 1994). El tratamiento de espermatozoides con progesterona o A23187 resulta en aumento de su síntesis (Baldi *et al.* 1993). El pretratamiento de espermatozoides con PAF aumenta la interacción entre espermatozoides y oocitos facilitando la fertilización in vitro (Angle *et al.* 1993, Fukuda *et al.* 1994)

En espermatozoides de rata las dos vías mencionadas para la biosíntesis de PAF son operativas, siendo el camino *de novo* aún más activo que el de la remodelación (Muguruma & Johnston 1997). Con respecto al catabolismo, en el mismo artículo se demuestra que tanto las gametas como el fluido epididimal contienen PAF-acetilhidrolasa con una actividad específica 6 veces más alta que en los espermatozoides y una forma de fosfolipasa D que convierte el liso-PAF en el lípido



neutro, el 1-O-alkil-glicerol. Estos autores propusieron que el PAF que es sintetizado por los espermatozoides no actúa mientras éstos están en el epidídimo porque el que pueda formarse es rápidamente inactivado por estas enzimas, previniendo así su activación en ese sitio; sin embargo ese freno desaparece cuando las gametas son liberadas en medios donde la actividad enzimática es diluida o inactivada pudiendo finalmente el PAF ejercer sus efectos estimulatorios sobre la actividad espermática (Muguruma & Johnston 1997). Nuestra plasménicolina rica en PUFA podría cumplir un rol como precursora del PAF que producen los espermatozoides. Uniendo los tres capítulos de esta tesis podríamos especular que la plasmánicolina se sintetiza en las células espermatogénicas y se remodela en el epidídimo para formar parte de las gametas donde finalmente servirá de sustrato para generar PAF, el cual participará en la activación funciones importantes para la fertilidad.

## ***REFERENCIAS***

- Ahmad G, Moinard N, Esquerre-Lamare C, Mieusset R & Bujan L** 2012 Mild induced testicular and epididymal hyperthermia alters sperm chromatin integrity in men. *Fertil Steril* 97 546-553.
- Albert DH & Snyder F** 1983 Biosynthesis of 1-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine (platelet-activating factor) from 1-alkyl-2-acyl-sn-glycero-3-phosphocholine by rat alveolar macrophages. Phospholipase A2 and acetyltransferase activities during phagocytosis and ionophore stimulation. *J Biol Chem* 258 97-102.
- Angle MJ, Tom R, Jarvi K & McClure RD** 1993 Effect of platelet-activating factor (PAF) on human spermatozoa-oocyte interactions. *J Reprod Fertil* 98 541-548.
- Aveldaño MI** 1992a Long and Very Long Polyunsaturated Fatty Acids of Retina and Spermatozoa: The Whole Complement of Polyenoic Fatty Acid Series. In *Neurobiology of Essential Fatty Acids* Ed NG Bazan. Plenum press.
- Aveldaño MI, Rotstein NP & Vermouth NT** 1992b Lipid remodelling during epididymal maturation of rat spermatozoa. Enrichment in plasmenylcholines containing long-chain polyenoic fatty acids of the n-9 series. *Biochem J* 283 ( Pt 1) 235-241.
- Baldi E, Falsetti C, Krausz C, Gervasi G, Carloni V, Casano R & Forti G** 1993 Stimulation of platelet-activating factor synthesis by progesterone and A23187 in human spermatozoa. *Biochem J* 292 ( Pt 1) 209-216.
- Banks S, King SA, Irvine DS & Saunders PT** 2005 Impact of a mild scrotal heat stress on DNA integrity in murine spermatozoa. *Reproduction* 129 505-514.
- Bartz R, Li WH, Venables B, Zehmer JK, Roth MR, Welti R, Anderson RG, Liu P & Chapman KD** 2007 Lipidomics reveals that adiposomes store ether lipids and mediate phospholipid traffic. *J Lipid Res* 48 837-847.
- Beckman JK & Coniglio JG** 1979 A comparative study of the lipid composition of isolated rat Sertoli and germinal cells. *Lipids* 14 262-267.
- Bedford JM** 1991 Effects of elevated temperature on the epididymis and testis: experimental studies. *Adv Exp Med Biol* 286 19-32.
- Bellve AR, Cavicchia JC, Millette CF, O'Brien DA, Bhatnagar YM & Dym M** 1977 Spermatogenic cells of the prepuberal mouse. Isolation and morphological characterization. *J Cell Biol* 74 68-85.
- Bendahmane M, Zeng HT & Tulsiani DR** 2002 Assessment of acrosomal status in rat spermatozoa: studies on carbohydrate and non-carbohydrate agonists. *Arch Biochem Biophys* 404 38-47.
- Blank ML, Kasama K & Snyder F** 1972 Isolation and identification of an alkyldiacylglycerol containing isovaleric acid. *J Lipid Res* 13 390-395.
- Bligh EG & Dyer WJ** 1959 A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 37 911-917.
- Braverman NE & Moser AB** 2012 Functions of plasmalogen lipids in health and disease. *Biochim Biophys Acta* 1822 1442-1452.
- Brewis IA, Van Gestel RA, Gadella BM, Jones R, Publicover SJ, Roldan ER, Frayne J & Barratt CL** 2005 The spermatozoon at fertilisation: current understanding and future research directions. *Hum Fertil (Camb)* 8 241-251.
- Brites P, Waterham HR & Wanders RJ** 2004 Functions and biosynthesis of plasmalogens in health and disease. *Biochim Biophys Acta* 1636 219-231.

- Cheng SS, Piantadosi C & Snyder F** 1967 Lipid droplets and glyceryl ether diesters in ehrlich ascites cells grown in tissue culture. *Lipids* 2 193-194.
- Chowdhury AK & Steinberger E** 1964 A quantitative study of the effect of heat on germinal epithelium of rat testes. *Am J Anat* 115 509-524.
- Clermont Y & Perey B** 1957 Quantitative study of the cell population of the seminiferous tubules in immature rats. *Am J Anat* 100 241-267.
- Connor WE, Lin DS, Wolf DP & Alexander M** 1998 Uneven distribution of desmosterol and docosahexaenoic acid in the heads and tails of monkey sperm. *J Lipid Res* 39 1404-1411.
- Da Silva N & Barton CR** 2016 Macrophages and dendritic cells in the post-testicular environment. *Cell Tissue Res* 363 97-104.
- Da Silva N, Cortez-Retamozo V, Reinecker HC, Wildgruber M, Hill E, Brown D, Swirski FK, Pittet MJ & Breton S** 2011 A dense network of dendritic cells populates the murine epididymis. *Reproduction* 141 653-663.
- Darin-Bennett A, Poulos A & White IG** 1974 The phospholipids and phospholipid-bound fatty acids and aldehydes of dog and fowl spermatozoa. *J Reprod Fertil* 41 471-474.
- Dastig S, Nenicu A, Otte DM, Zimmer A, Seitz J, Baumgart-Vogt E & Luers GH** 2011 Germ cells of male mice express genes for peroxisomal metabolic pathways implicated in the regulation of spermatogenesis and the protection against oxidative stress. *Histochem Cell Biol* 136 413-425.
- Davis JT, Bridges RB & Coniglio JG** 1966 Changes in lipid composition of the maturing rat testis. *Biochem J* 98 342-346.
- Diagne A, Fauvel J, Record M, Chap H & Douste-Blazy L** 1984 Studies on ether phospholipids. II. Comparative composition of various tissues from human, rat and guinea pig. *Biochim Biophys Acta* 793 221-231.
- Durairajanayagam D, Agarwal A & Ong C** 2015 Causes, effects and molecular mechanisms of testicular heat stress. *Reprod Biomed Online* 30 14-27.
- Eguchi M, Sannes PL & Spicer SS** 1979 Peroxisomes of rat peritoneal macrophages during phagocytosis. *Am J Pathol* 95 281-294.
- Escoffier J, Jemel I, Tanemoto A, Taketomi Y, Payre C, Coatrieux C, Sato H, Yamamoto K, Masuda S, Pernet-Gallay K, Pierre V, Hara S, Murakami M, De WM, Lambeau G & Arnoult C** 2010 Group X phospholipase A2 is released during sperm acrosome reaction and controls fertility outcome in mice. *J Clin Invest* 120 1415-1428.
- Evans RW & Setchell BP** 1979 Lipid changes during epididymal maturation in ram spermatozoa collected at different times of the year. *J Reprod Fertil* 57 197-203.
- Evans RW, Weaver DE & Clegg ED** 1980 Diacyl, alkenyl, and alkyl ether phospholipids in ejaculated, in utero-, and in vitro-incubated porcine spermatozoa. *J Lipid Res* 21 223-228.
- Flesch FM & Gadella BM** 2000 Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. *Biochim Biophys Acta* 1469 197-235.
- Fujihara Y & Ikawa M** 2015 GPI-AP release in cellular, developmental, and reproductive biology. *J Lipid Res*.
- Fukuda A, Roudebush WE & Thatcher SS** 1994 Platelet activating factor enhances the acrosome reaction, fertilization in vitro by subzonal sperm injection and resulting embryonic development in the rabbit. *Hum Reprod* 9 94-99.

- Furland NE, Maldonado EN & Aveldaño MI** 2003 Very long chain PUFA in murine testicular triglycerides and cholesterol esters. *Lipids* 38 73-80.
- Furland NE, Maldonado EN, Aresti PA & Aveldaño MI** 2007a Changes in lipids containing long- and very long-chain polyunsaturated fatty acids in cryptorchid rat testes. *Biol Reprod* 77 181-188.
- Furland NE, Oresti GM, Antollini SS, Venturino A, Maldonado EN & Aveldaño MI** 2007b Very long-chain polyunsaturated fatty acids are the major acyl groups of sphingomyelins and ceramides in the head of mammalian spermatozoa. *J Biol Chem* 282 18151-18161.
- Furland NE, Zanetti SR, Oresti GM, Maldonado EN & Aveldaño MI** 2007b Ceramides and sphingomyelins with high proportions of very long-chain polyunsaturated fatty acids in mammalian germ cells. *J Biol Chem* 282 18141-18150.
- Gadella BM, Tsai PS, Boerke A & Brewis IA** 2008 Sperm head membrane reorganization during capacitation. *Int J Dev Biol* 52 473-480.
- Gao X, van der Veen JN, Hermansson M, Ordonez M, Gomez-Munoz A, Vance DE & Jacobs RL** 2015 Decreased lipogenesis in white adipose tissue contributes to the resistance to high fat diet-induced obesity in phosphatidylethanolamine N-methyltransferase-deficient mice. *Biochim Biophys Acta* 1851 152-162.
- Gitlits VM, Toh BH, Loveland KL & Sentry JW** 2000 The glycolytic enzyme enolase is present in sperm tail and displays nucleotide-dependent association with microtubules. *Eur J Cell Biol* 79 104-111.
- Giusto NM & Bazan NG** 1973 High increment of triglycerols with ether linkages in the retina during anoxia. *Biochem Biophys Res Commun* 55 515-521.
- Gomendio M & Roldan ER** 2008 Implications of diversity in sperm size and function for sperm competition and fertility. *Int J Dev Biol* 52 439-447.
- Grogan DE, Mayer DT & Sikes JD** 1966 Quantitative differences in phospholipids of ejaculated spermatozoa and spermatozoa from three levels of the epididymis of the boar. *J Reprod Fertil* 12 431-436.
- Grogan WM, Farnham WF & Szopiak BA** 1981 Long chain polyenoic acid levels in viably sorted, highly enriched mouse testis cells. *Lipids* 16 401-410.
- Gross RW** 1984 High plasmalogen and arachidonic acid content of canine myocardial sarcolemma: a fast atom bombardment mass spectroscopic and gas chromatography-mass spectroscopic characterization. *Biochemistry* 23 158-165.
- Gross RW** 1985 Identification of plasmalogen as the major phospholipid constituent of cardiac sarcoplasmic reticulum. *Biochemistry* 24 1662-1668.
- Haider SG** 2004 Cell biology of Leydig cells in the testis. *Int Rev Cytol* 233 181-241.
- Hajra AK & Das AK** 1996 Lipid biosynthesis in peroxisomes. *Ann N Y Acad Sci* 804 129-141.
- Hartree EF & Mann T** 1959 Plasmalogen in ram semen, and its role in sperm metabolism. *Biochem J* 71 423-434.
- Hedger MP** 2002 Macrophages and the immune responsiveness of the testis. *J Reprod Immunol* 57 19-34.
- Henning H, Masal C, Herr A, Wolf K, Urhausen C, Beineke A, Beyerbach M, Kramer S & Gunzel-Apel AR** 2014 Effect of short-term scrotal hyperthermia on spermatological parameters, testicular blood flow and gonadal tissue in dogs. *Reprod Domest Anim* 49 145-157.

- Hermo L, Oko R & Robaire B** 1992 Epithelial cells of the epididymis show regional variations with respect to the secretion of endocytosis of immobilin as revealed by light and electron microscope immunocytochemistry. *Anat Rec* **232** 202-220.
- Horrocks LA** 1968 The alk-1-enyl group content of mammalian myelin phosphoglycerides by quantitative two-dimensional thin-layer chromatography. *J Lipid Res* **9** 469-472.
- Huyghe S, Schmalbruch H, De GK, Verhoeven G, Guillou F, Van Veldhoven PP & Baes M** 2006 Peroxisomal multifunctional protein 2 is essential for lipid homeostasis in Sertoli cells and male fertility in mice. *Endocrinology* **147** 2228-2236.
- Infante JP & Huszagh VA** 1998 Analysis of the putative role of 24-carbon polyunsaturated fatty acids in the biosynthesis of docosapentaenoic (22:5n-6) and docosahexaenoic (22:6n-3) acids. *FEBS Lett* **431** 1-6.
- Ishizuka I, Suzuki M & Yamakawa T** 1973 Isolation and characterization of a novel sulfoglycolipid, 'seminolipid,' from boar testis and spermatozoa. *J Biochem* **73** 77-87.
- Jahnukainen K, Chrysis D, Hou M, Parvinen M, Eksborg S & Soder O** 2004 Increased apoptosis occurring during the first wave of spermatogenesis is stage-specific and primarily affects midpachytene spermatocytes in the rat testis. *Biol Reprod* **70** 290-296.
- Jain YC & Anand SR** 1975 Phospholipids of goat spermatozoa and the seminal plasma. *Biol Reprod* **12** 393-395.
- Jain YC & Anand SR** 1976 The lipids of buffalo spermatozoa and seminal plasma. *J Reprod Fertil* **47** 255-260.
- Jost U** 1974 1-alkyl-2,3-diacyl-sn-glycerol, the major lipid in the Harderian gland of rabbits. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* **355** 422-426.
- Jouvin-Marche E, Ninio E, Beaurain G, Tence M, Niaudet P & Benveniste J** 1984 Biosynthesis of Paf-acether (platelet-activating factor). VII. Precursors of Paf-acether and acetyl-transferase activity in human leukocytes. *J Immunol* **133** 892-898.
- Kampa IS & Frascella DW** 1977 Effect of hyperthermia on epididymal cyclic AMP levels in diabetic non-diabetic and hypophysectomized rats. *Horm Metab Res* **9** 282-285.
- Kasama K, Blank ML & Snyder F** 1989 Identification of 1-alkyl-2-acyl-3-(2',3'-diacylglycerol)glycerols, a new type of lipid class, in harderian gland tumors of mice. *J Biol Chem* **264** 9453-9461.
- Kerr JB & De Kretser DM** 1975 Cyclic variations in Sertoli cell lipid content throughout the spermatogenic cycle in the rat. *J Reprod Fertil* **43** 1-8.
- Kim B, Park K & Rhee K** 2013 Heat stress response of male germ cells. *Cell Mol Life Sci* **70** 2623-2636.
- Kirchhoff C** 1999 Gene expression in the epididymis. *Int Rev Cytol* **188** 133-202.
- Knobil & Neill's** 2006 *The Physiology of Reproduction*. Elsevier inc.
- Krausz C, Gervasi G, Forti G & Baldi E** 1994 Effect of platelet-activating factor on motility and acrosome reaction of human spermatozoa. *Hum Reprod* **9** 471-476.
- Larson JL & Miller DJ** 1999 Simple histochemical stain for acrosomes on sperm from several species. *Mol Reprod Dev* **52** 445-449.
- Lee TC** 1998 Biosynthesis and possible biological functions of plasmalogens. *Biochim Biophys Acta* **1394** 129-145.
- Lin HJ, Ho FC & Lee CL** 1978 Abnormal distribution of O-alkyl groups in the neutral glycerolipids from human hepatocellular carcinomas. *Cancer Res* **38** 946-949.

- Lodhi IJ & Semenkovich CF** 2014 Peroxisomes: a nexus for lipid metabolism and cellular signaling. *Cell Metab* 19 380-392.
- Lue YH, Hikim AP, Swerdloff RS, Im P, Taing KS, Bui T, Leung A & Wang C** 1999 Single exposure to heat induces stage-specific germ cell apoptosis in rats: role of intratesticular testosterone on stage specificity. *Endocrinology* 140 1709-1717.
- Luers GH, Thiele S, Schad A, Volkl A, Yokota S & Seitz J** 2006 Peroxisomes are present in murine spermatogonia and disappear during the course of spermatogenesis. *Histochem Cell Biol* 125 693-703.
- Luhrs CA & Slomiany BL** 1989 A human membrane-associated folate binding protein is anchored by a glycosyl-phosphatidylinositol tail. *J Biol Chem* 264 21446-21449.
- Malkov M, Fisher Y & Don J** 1998 Developmental schedule of the postnatal rat testis determined by flow cytometry. *Biol Reprod* 59 84-92.
- Miyazaki M, Kim HJ, Man WC & Ntambi JM** 2001 Oleoyl-CoA is the major de novo product of stearoyl-CoA desaturase 1 gene isoform and substrate for the biosynthesis of the Harderian gland 1-alkyl-2,3-diacylglycerol. *J Biol Chem* 276 39455-39461.
- Mueller HW, O'Flaherty JT & Wykle RL** 1982 Ether lipid content and fatty acid distribution in rabbit polymorphonuclear neutrophil phospholipids. *Lipids* 17 72-77.
- Muguruma K & Johnston JM** 1997 Metabolism of platelet-activating factor in rat epididymal spermatozoa. *Biol Reprod* 56 529-536.
- Muguruma K & Johnston JM** 1997 Metabolism of platelet-activating factor in rat epididymal spermatozoa. *Biol Reprod* 56 529-536.
- Mukherjea M** 1977 Studies on some unusual lipids of the preputial glands of rats and mice and their hormonal influence. *Endokrinologie* 69 136-142.
- Murase T, Imaeda N, Kondoh N & Tsubota T** 2004 Ceramide enhances acrosomal exocytosis triggered by calcium and the calcium ionophore A23187 in boar spermatozoa. *J Reprod Dev* 50 667-674.
- Nakagawa A, Shiratsuchi A, Tsuda K & Nakanishi Y** 2005 In vivo analysis of phagocytosis of apoptotic cells by testicular Sertoli cells. *Mol Reprod Dev* 71 166-177.
- Nakanishi Y & Shiratsuchi A** 2004 Phagocytic removal of apoptotic spermatogenic cells by Sertoli cells: mechanisms and consequences. *Biol Pharm Bull* 27 13-16.
- Nenicu A, Luers GH, Kovacs W, David M, Zimmer A, Bergmann M & Baumgart-Vogt E** 2007 Peroxisomes in human and mouse testis: differential expression of peroxisomal proteins in germ cells and distinct somatic cell types of the testis. *Biol Reprod* 77 1060-1072.
- Nieto ML, Venable ME, Bauldry SA, Greene DG, Kennedy M, Bass DA & Wykle RL** 1991 Evidence that hydrolysis of ethanolamine plasmalogens triggers synthesis of platelet-activating factor via a transacylation reaction. *J Biol Chem* 266 18699-18706.
- Nishimune Y & Okabe M** 1993 Mammalian Male Gametogenesis: Growth, Differentiation and Maturation of Germ Cells. *Development, Growth & Differentiation*.
- Ojima-Uchiyama A, Masuzawa Y, Sugiura T, Waku K, Saito H, Yui Y & Tomioka H** 1988 Phospholipid analysis of human eosinophils: high levels of alkylacylglycerophosphocholine (PAF precursor). *Lipids* 23 815-817.
- Oresti GM, Ayuza Aresti PL, Gigola G, Reyes LE & Aveldaño MI** 2010a Sequential depletion of rat testicular lipids with long-chain and very long-chain polyenoic fatty acids after X-ray-induced interruption of spermatogenesis. *J Lipid Res* 51 2600-2610.

- Oresti GM, Garcia-Lopez J, Avelano MI & Del MJ** 2013 Cell-type-specific regulation of genes involved in testicular lipid metabolism: fatty acid-binding proteins, diacylglycerol acyltransferases, and perilipin 2. *Reproduction* 146 471-480.
- Oresti GM, Reyes JG, Luquez JM, Osses N, Furland NE & Avelaño MI** 2010b Differentiation-related changes in lipid classes with long-chain and very long-chain polyenoic fatty acids in rat spermatogenic cells. *J Lipid Res* 51 2909-2921.
- Park SH, Kano K & Seyama Y** 1993 1-Alkyl-2,3-diacylglycerol synthesis in primary culture cells of guinea pig harderian gland. *J Biochem* 114 492-497.
- Parks JE & Hammerstedt RH** 1985 Development changes occurring in the lipids of ram epididymal spermatozoa plasma membrane. *Biol Reprod* 32 653-668.
- Perez-Crespo M, Pintado B & Gutierrez-Adan A** 2008 Scrotal heat stress effects on sperm viability, sperm DNA integrity, and the offspring sex ratio in mice. *Mol Reprod Dev* 75 40-47.
- Poulos A & White IG** 1973 The phospholipid composition of human spermatozoa and seminal plasma. *J Reprod Fertil* 35 265-272.
- Poulos A, Voglmayr JK & White IG** 1973 Phospholipid changes in spermatozoa during passage through the genital tract of the bull. *Biochim Biophys Acta* 306 194-202.
- Prescott SM, Zimmerman GA & McIntyre TM** 1990 Platelet-activating factor. *J Biol Chem* 265 17381-17384.
- Rana AP, Majumder GC, Misra S & Ghosh A** 1991 Lipid changes of goat sperm plasma membrane during epididymal maturation. *Biochim Biophys Acta* 1061 185-196.
- Reisse S, Rothardt G, Volkl A & Beier K** 2001 Peroxisomes and ether lipid biosynthesis in rat testis and epididymis. *Biol Reprod* 64 1689-1694.
- Rejraji H, Sion B, Prensier G, Carreras M, Motta C, Frenoux JM, Vericel E, Grizard G, Vernet P & Drevet JR** 2006 Lipid remodeling of murine epididymosomes and spermatozoa during epididymal maturation. *Biol Reprod* 74 1104-1113.
- Retterstol K, Tran TN, Haugen TB & Christophersen BO** 2001 Metabolism of very long chain polyunsaturated fatty acids in isolated rat germ cells. *Lipids* 36 601-606.
- Reyes JG, Diaz A, Osses N, Opazo C & Benos DJ** 1997 On stage single cell identification of rat spermatogenic cells. *Biol Cell* 89 53-66.
- Ricker DD, Minhas BS, Kumar R, Robertson JL & Dodson MG** 1989 The effects of platelet-activating factor on the motility of human spermatozoa. *Fertil Steril* 52 655-658.
- Ridgway ND & Vance DE** 1987 Purification of phosphatidylethanolamine N-methyltransferase from rat liver. *J Biol Chem* 262 17231-17239.
- Robaire B & Viger RS** 1995 Regulation of epididymal epithelial cell functions. *Biol Reprod* 52 226-236.
- Romrell LJ, Bellve AR & Fawcett DW** 1976 Separation of mouse spermatogenic cells by sedimentation velocity. A morphological characterization. *Dev Biol* 49 119-131.
- Rouser G, Fkeischer S & Yamamoto A** 1970 Two dimensional thin layer chromatographic separation of polar lipids and determination of phospholipids by phosphorus analysis of spots. *Lipids* 5 494-496.
- Russell LD, Ettlin RA, Hikim AP & Clegg ED** 1990 *Histological and Histopathological Evaluation of the Testis*. Cache River Press.



- Saether T, Tran TN, Rootwelt H, Christophersen BO & Haugen TB** 2003 Expression and regulation of delta5-desaturase, delta6-desaturase, stearyl-coenzyme A (CoA) desaturase 1, and stearyl-CoA desaturase 2 in rat testis. *Biol Reprod* 69 117-124.
- Sansone G & Hamilton JG** 1969 Glyceryl ether, wax ester and triglyceride composition of the mouse preputial gland. *Lipids* 4 435-440.
- Sato H, Taketomi Y, Isogai Y, Miki Y, Yamamoto K, Masuda S, Hosono T, Arata S, Ishikawa Y, Ishii T, Kobayashi T, Nakanishi H, Ikeda K, Taguchi R, Hara S, Kudo I & Murakami M** 2010 Group III secreted phospholipase A2 regulates epididymal sperm maturation and fertility in mice. *J Clin Invest* 120 1400-1414.
- Scott CC, Heckman A, Nettesheim P & Snyder F** 1979 Metabolism of ether-linked glycerolipids in cultures of normal and neoplastic rat respiratory tract epithelium. *Cancer Res* 39 207-214.
- Scott TW & Dawson RM** 1963 Phospholipid interrelationships in rat epididymal tissue and spermatozoa. *Biochem J* 87 507-512.
- Sengoku K, Tamate K, Takaoka Y & Ishikawa M** 1993 Effects of platelet activating factor on human sperm function in vitro. *Hum Reprod* 8 1443-1447.
- Setchell BP** 1998 The Parkes Lecture. Heat and the testis. *J Reprod Fertil* 114 179-194.
- Seyama Y, Otsuka H, Ohashi K, Vivien-Roels B & Pevet P** 1995 Sexual dimorphism of lipids in Harderian glands of golden hamsters. *J Biochem* 117 661-670.
- Shields DJ, Agellon LB & Vance DE** 2001 Structure, expression profile and alternative processing of the human phosphatidylethanolamine N-methyltransferase (PEMT) gene. *Biochim Biophys Acta* 1532 105-114.
- Smith TB, Cortez-Retamozo V, Grigoryeva LS, Hill E, Pittet MJ & Da SN** 2014 Mononuclear phagocytes rapidly clear apoptotic epithelial cells in the proximal epididymis. *Andrology* 2 755-762.
- Snyder F & Blank ML** 1969 Relationships of chain lengths and double bond locations in O-alkyl, O-alk-1-enyl, acyl, and fatty alcohol moieties in preputial glands of mice. *Arch Biochem Biophys* 130 101-110.
- Snyder F & Wood R** 1968 The occurrence and metabolism of alkyl and alk-1-enyl ethers of glycerol in transplantable rat and mouse tumors. *Cancer Res* 28 972-978.
- Snyder F & Wood R** 1969 Alkyl and alk-1-enyl ethers of glycerol in lipids from normal and neoplastic human tissues. *Cancer Res* 29 251-257.
- Snyder F** 1972 Enzymatic systems that synthesize and degrade glycerolipids possessing ether bonds. *Adv Lipid Res* 10 233-259.
- Snyder F** 1991 Metabolism, regulation and function of ether-linked glycerolipids and their bioactive species. In *Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes* Ed A Elsevier Science Publishers.
- Snyder F** 1995 Platelet-activating factor and its analogs: metabolic pathways and related intracellular processes. *Biochim Biophys Acta* 1254 231-249.
- Stables MJ & Gilroy DW** 2011 Old and new generation lipid mediators in acute inflammation and resolution. *Prog Lipid Res* 50 35-51.
- Sugiura T, Onuma Y, Sekiguchi N & Waku K** 1982 Ether phospholipids in guinea pig polymorphonuclear leukocytes and macrophages. Occurrence of high levels of 1-O-alkyl-2-acyl-sn-glycero-3-phosphocholine. *Biochim Biophys Acta* 712 515-522.

- Sullivan R, Saez F, Girouard J & Frenette G** 2005 Role of exosomes in sperm maturation during the transit along the male reproductive tract. *Blood Cells Mol Dis* 35 1-10.
- Sun EL & Flickinger CJ** 1979 Development of cell types and of regional differences in the postnatal rat epididymis. *Am J Anat* 154 27-55.
- Tadano-Aritomi K, Matsuda J, Fujimoto H, Suzuki K & Ishizuka I** 2003 Seminolipid and its precursor/degradative product, galactosylalkylacylglycerol, in the testis of saposin A- and prosaposin-deficient mice. *J Lipid Res* 44 1737-1743.
- Tence M, Jouvin-Marche E, Bessou G, Record M & Benveniste J** 1985 Ether-phospholipid composition in neutrophils and platelets. *Thromb Res* 38 207-214.
- Travis AJ & Kopf GS** 2002 The role of cholesterol efflux in regulating the fertilization potential of mammalian spermatozoa. *J Clin Invest* 110 731-736.
- Travis AJ, Tutuncu L, Jorgez CJ, Ord TS, Jones BH, Kopf GS & Williams CJ** 2004 Requirements for glucose beyond sperm capacitation during in vitro fertilization in the mouse. *Biol Reprod* 71 139-145.
- van den Bosch H, Schrakamp G, Hardeman D, Zomer AW, Wanders RJ & Schutgens RB** 1993 Ether lipid synthesis and its deficiency in peroxisomal disorders. *Biochimie* 75 183-189.
- van der Veen JN, Lingrell S & Vance DE** 2012 The membrane lipid phosphatidylcholine is an unexpected source of triacylglycerol in the liver. *J Biol Chem* 287 23418-23426.
- Vance DE** 2014 Phospholipid methylation in mammals: from biochemistry to physiological function. *Biochim Biophys Acta* 1838 1477-1487.
- Vance JE** 1990 Lipoproteins secreted by cultured rat hepatocytes contain the antioxidant 1-alk-1-enyl-2-acylglycerophosphoethanolamine. *Biochim Biophys Acta* 1045 128-134.
- Varisli O, Uguz C, Agca C & Agca Y** 2009 Various physical stress factors on rat sperm motility, integrity of acrosome, and plasma membrane. *J Androl* 30 75-86.
- Venable ME, Nieto ML, Schmitt JD & Wykle RL** 1991 Conversion of 1-O-[3H]alkyl-2-arachidonoyl-sn-glycero-3-phosphorylcholine to lyso platelet-activating factor by the CoA-independent transacylase in membrane fractions of human neutrophils. *J Biol Chem* 266 18691-18698.
- Visconti PE, Bailey JL, Moore GD, Pan D, Olds-Clarke P & Kopf GS** 1995 Capacitation of mouse spermatozoa. I. Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation. *Development* 121 1129-1137.
- Visconti PE, Westbrook VA, Chertihin O, Demarco I, Sleight S & Diekman AB** 2002 Novel signaling pathways involved in sperm acquisition of fertilizing capacity. *J Reprod Immunol* 53 133-150.
- Voss A, Reinhart M, Sankarappa S & Sprecher H** 1991 The metabolism of 7,10,13,16,19-docosapentaenoic acid to 4,7,10,13,16,19-docosahexaenoic acid in rat liver is independent of a 4-desaturase. *J Biol Chem* 266 19995-20000.
- Wallner S & Schmitz G** 2011 Plasmalogens the neglected regulatory and scavenging lipid species. *Chem Phys Lipids* 164 573-589.
- Wang H, Wang H, Xiong W, Chen Y, Ma Q, Ma J, Ge Y & Han D** 2006 Evaluation on the phagocytosis of apoptotic spermatogenic cells by Sertoli cells in vitro through detecting lipid droplet formation by Oil Red O staining. *Reproduction* 132 485-492.
- Watschinger K & Werner ER** 2013 Orphan enzymes in ether lipid metabolism. *Biochimie* 95 59-65.

- Winnall WR & Hedger MP** 2013 Phenotypic and functional heterogeneity of the testicular macrophage population: a new regulatory model. *J Reprod Immunol* 97 147-158.
- Wood R & Snyder F** 1967 Characterization and identification of glyceryl ether diesters present in tumor cells. *J Lipid Res* 8 494-500.
- Wood R & Snyder F** 1968 Quantitative determination of alk-1-enyl- and alkyl-glyceryl ethers in neutral lipids and phospholipids. *Lipids* 3 129-135.
- Xiong W, Wang H, Wu H, Chen Y & Han D** 2009 Apoptotic spermatogenic cells can be energy sources for Sertoli cells. *Reproduction* 137 469-479.
- Yamashita A, Hayashi Y, Nemoto-Sasaki Y, Ito M, Oka S, Tanikawa T, Waku K & Sugiura T** 2014 Acyltransferases and transacylases that determine the fatty acid composition of glycerolipids and the metabolism of bioactive lipid mediators in mammalian cells and model organisms. *Prog Lipid Res* 53 18-81.
- Yamazaki T, Seyama Y, Otsuka H, Ogawa H & Yamakawa T** 1981 Identification of alkyldiacylglycerols containing saturated methyl branched chains in the Harderian gland of guinea pig. *J Biochem* 89 683-691.
- Yin Y, Hawkins KL, DeWolf WC & Morgentaler A** 1997 Heat stress causes testicular germ cell apoptosis in adult mice. *J Androl* 18 159-165.
- Yoon CY, Hong CM, Cho YY, Song JY, Hong IJ, Cho DH, Lee BJ, Song HJ & Kim CK** 2001 Flow cytometric evaluation on the age-dependent changes of testicular DNA contents in rats. *J Vet Sci* 2 43-46.
- Zanetti SR & Aveldaño MI** 2014 Long-term biopermanence of ceramides, cholesteryl esters, and ether-linked triglycerides with very-long-chain PUFA in the cadmium-damaged testis. *Biochim Biophys Acta* 1841 151-161.
- Zanetti SR, Maldonado EN & Aveldaño MI** 2007 Doxorubicin affects testicular lipids with long-chain (C18-C22) and very long-chain (C24-C32) polyunsaturated fatty acids. *Cancer Res* 67 6973-6980.
- Zanetti SR, Monclus ML, Rensetti DE, Fornes MW & Aveldaño MI** 2010 Differential involvement of rat sperm choline glycerophospholipids and sphingomyelin in capacitation and the acrosomal reaction. *Biochimie* 92 1886-1894.
- Zhu W, Xu Z, Dai Y, Cai M & Sun H** 2004 [Application of percutaneous epididymal sperm aspiration and testicular sperm extraction to the diagnosis and treatment of azoospermia]. *Zhonghua Nan Ke Xue* 10 928-929.

## TRABAJOS PUBLICADOS

-“Differentiation-related changes in lipid classes with long-chain and very long-chain polyenoic fatty acids in rat spermatogenic cells” Oresti GM, Reyes JG, Luquez JM, Osses N, Furland NE and Aveldaño MI. *Journal of Lipid Research*, 2010 Oct;51(10):2909-21. doi: 10.1194/jlr.M006429. Epub 2010 Jul 7. ISSN 0022-2275

-“Mild testicular hyperthermia transiently increases lipid droplet accumulation and modifies sphingolipid and glycerophospholipid acyl chains in rat testis” Furland NE, Luquez JM, Oresti GM, and Aveldaño MI. *Lipids*, 2011 May;46(5):443-54. doi: 10.1007/s11745-011-3527-3. Epub 2011 Feb 13. ISSN 0024-4201

-“Uneven distribution of ceramides, sphingomyelins and glycerophospholipids between heads and tails of rat spermatozoa” Oresti GM, Luquez JM Furland NE and Aveldaño MI. *Lipids*, 2011 Dec;46(12):1081-90. doi: 10.1007/s11745-011-3601-x. Epub 2011 Aug 6. ISSN 0024-4201

- “Lipid biochemical and biophysical changes in rat spermatozoa during isolation and functional activation in vitro” Oresti GM, Peñalva DA, Luquez JM, Antollini SS, Aveldaño MI. *Biology of Reproduction*, 2015 Oct 21. pii: biolreprod.115.131201. [Epub ahead of print] ISSN 0006-3363

- “Lipids with long chain polyenoic fatty acids (PUFA) of the n-9 series in rat epididymal cells”. Luquez JM, Oresti GM, Aveldaño MI, Furland NE. (Trabajo en etapa de elaboración).

- “Heat stress affects the metabolism of lipids of epididymal epithelial cells”. Luquez JM, Oresti GM, Vallés AS, Aveldaño MI, Furland NE. (Trabajo en etapa de elaboración).

## TRABAJOS PRESENTADOS EN REUNIONES CIENTÍFICAS

### A) INTERNACIONALES

- "Lipid biochemical-biophysical correlations during isolation and functional activation of rat spermatozoa". Peñalva, DA, Oresti, GM, Luquez, JM, Antollini, SS and Aveldaño, MI. 56th Meeting of the International Conference on the Bioscience of Lipids (ICBL). Iguazú, Misiones, Argentina. 22-26 de Septiembre de 2015. Publicado en el libro de resúmenes de la Reunión, Pág.

### B) NACIONALES

-“Heat stress affects the metabolism of lipids of epididymal epithelial cells”. Luquez JM, Oresti GM, Vallés AS, Aveldaño MI, Furland NE L Reunión Nacional de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular (SAIB), Rosario, 11 al 14 de Noviembre de 2014. Resumen publicado en Biocell vol. 38 (2014) ISSN 0327-9545. Presentación P21, pág. 126

- Luquez JM, Oresti GM, Aveldaño MI, Furland NE. “Ether-linked triglycerides of rat epididymis”. XLVII Reunión Nacional de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular (SAIB), Potrero de los Funes, San Luis, 30 de octubre al

2 de noviembre de 2011. Resumen publicado en BIOCELL vol.35 (2011) ISSN 0327-9545. Presentación p 07, pág. 100

- Luquez JM, Oresti GM, Aveldaño MI, Furland NE. "Lipids with long chain polyenoic fatty acids (PUFA) of the n-9 series in rat epididymal cells". XLVI Reunión Nacional de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular (SAIB), Puerto Madryn, Chubut, 30 de Noviembre al 3 de Diciembre de 2010. Resumen publicado en BIOCELL vol. 34 (2010) ISSN 0327-9545. Presentación p12, pág. 91

- Luquez J.M, Oresti GM, Osses N, Reyes JG, Aveldaño MI, Furland NE "Accretion of lipids with long and very long chain polyenoic fatty acids in rat developing testis". XLV Reunión Nacional de la Sociedad Argentina de Investigación Bioquímica y Biología Molecular (SAIB), San Miguel de Tucumán. Resumen publicado en BIOCELL, vol 33 suppl, Nov 2009.

- Luquez JM, Oresti GM, Osses N, Reyes JG, Aveldaño MI, Furland NE "El testículo en desarrollo y la formación de lípidos con ácidos grasos de larga y muy larga cadena". Primeras Jornadas Bioquímicas del Sudoeste Bonaerense, Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca (**2009**).

- Oresti GM, Luquez JM, Reyes JG, Pediconi MF, Aveldaño MI. "Glicerofosfolípidos y esfingolípidos con ácidos grasos poliinsaturados de larga y muy larga cadena en células germinales meióticas y posmeióticas. IV Jornadas de Lípidos. Univ. Nacional de Rosario-CONICET. Rosario, Santa Fe, 7 y 8 de Agosto de 2008.

- Oresti GM, Reyes JG, Luquez JM, Pediconi MF, Aveldaño MI. Lipids with very long chain fatty acids (VLCPUFA) in germ cells and residual bodies. XLIV Reunión anual-Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular (SAIB), Villa Carlos Paz, Córdoba. 8-11de noviembre de 2008. Resumen publicado en BIOCELL, vol 32 suppl. Nov. 2008.

- Furland NE, Luquez JM, Antollini SS y Aveldaño MI "Biophysical characteristics of testicular sphingomyelins with very long chain polyunsaturated fatty acids". XLIV Reunión Nacional de la Sociedad Argentina de Investigación Bioquímica y Biología Molecular (SAIB). Resumen publicado en BIOCELL, vol 32 suppl. Nov. 2008.