



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

TESIS

DOCTORA EN BIOLOGÍA

*“Localización en dominios de membrana y biosíntesis de los
esfingolípidos con ácidos grasos poliinsaturados de
muy larga cadena de células
espermatogénicas en diferenciación”*

FLORENCIA XIMENA SANTIAGO VALTIERRA

BAHÍA BLANCA

ARGENTINA

2019

PREFACIO

Esta Tesis se presenta como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Doctor en Biología de la Universidad Nacional del Sur y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad u otra. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el Instituto de Investigaciones Bioquímicas de 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 el 9 de septiembre de 2014 y el 8 de febrero de 2019, bajo la dirección de la Dra. Marta Isabel Aveldaño, Profesora Emérita de la Universidad Nacional del Sur e Investigadora Superior del CONICET, y la co-dirección del Dr. Gerardo Martín Oresti, Profesor Adjunto de la Universidad Nacional del Sur e Investigador Adjunto del CONICET.

8 de Febrero de 2019

Florencia Ximena Santiago Valtierra

Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR
Secretaría General de Posgrado y Educación Continua

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

A mis padres, María del Luján y Edgardo

*A la memoria de mi querida madre, cuyo amor
me acompaña en cada paso*

Agradecimientos

A mi directora de tesis, la Dra. Marta Aveldaño, le agradezco por haberme recibido tan generosamente en su grupo de trabajo y brindarme la oportunidad de concretar esta meta. Por inspirarme con su incansable dedicación y su ejemplo de vocación científica, por sus apreciados y relevantes aportes y críticas. Por su compromiso con este proyecto de tesis, por el tiempo dedicado para transmitirme sus notables conocimientos y brindarme su ayuda.

A mi co-director, el Dr. Martín Oresti, quien me guió sin descanso a lo largo de este trayecto, le agradezco por su constante preocupación y asistencia, por contagiarme de su espíritu de trabajo intenso y de perseverancia. Por todos los conocimientos transmitidos, sus consejos, críticas y su paciencia para enseñarme. Por su confianza en mi trabajo, su comprensión y sus palabras de aliento ante las dificultades, por atender en todo momento mis inquietudes y brindarme su ayuda siempre que lo necesitaba.

A ambos les agradezco infinitamente por acompañarme y formarme en mis primeros pasos en el trabajo científico en equipo, y por su trato respetuoso, humilde y generoso en todo momento.

A mis compañeros del "Lipidlab", gracias por su cariño y amistad, por hacer del laboratorio mi segunda casa, por su ayuda y comprensión diaria, y los momentos compartidos a lo largo de esta etapa. A los Dres. Natalia Furland, Jessica Luquez, Alejandro Peñalva y Sofía Vallés, agradezco por los aportes y colaboraciones científicas que hicieron posible este trabajo de tesis.

A la Dra. Melina Mateos, por su compromiso, conocimientos y valiosa ayuda al asistirme en mis inicios con la técnica de *Western blot*.

Al personal del LANAIS-PROEM, del Instituto de Química y Físicoquímica Biológicas (CONICET-UBA), le agradezco su valiosa contribución y experto asesoramiento en los análisis de espectrometría de masas.

Al Dr. Juan G. Reyes, de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso en Chile, le agradezco sus generosos aportes en los experimentos de PCR convencional.

A los grupos de trabajo vecinos, al grupo de la Dra. Norma Giusto y al grupo de los Dres. Nora Rotstein y Luis Politi, por su compañerismo de trabajo y su buena predisposición para brindarme ayuda y consejos en todo momento.

A mis compañeros de la cátedra de Estructura y Función del Cuerpo Humano, por acompañarme en los inicios de mi camino en la docencia y aportar a mi formación académica a lo largo de esta tesis.

A la UNS, el INIBIBB y el CONICET, les agradezco por facilitarme las instalaciones y los medios necesarios para realizar esta tesis y formarme profesionalmente.

A todos los integrantes del INIBIBB, que de algún u otro modo han colaborado en la realización de esta tarea, por los momentos compartidos y la ayuda brindada.

A mi familia, mi refugio y mi sostén. Gracias por su amor incondicional y por darme las fuerzas para enfrentar los desafíos de la vida. A mis padres, gracias a quienes hoy puedo concretar este sueño, por enseñarme los valores y principios que lo permitieron, por apoyarme y motivarme a lo largo de mi formación e involucrarse en todo momento. A mamá y papá, mis ángeles protectores ya sea en el cielo o en la tierra, y a mis hermanas, mis compañeras de fierro, por su presencia constante y sus palabras de aliento.

A mis amigos, los que tuve la suerte de conocer en la universidad, en el INIBIBB o en la vida, gracias por acompañarme siempre, por su cariño y su paciencia, por escucharme, por bancar mis ausencias este último tiempo, por ayudarme a transitar las dificultades a lo largo de estos años, por las risas y anécdotas compartidas. A cada uno de ellos le agradezco su apreciada amistad.

¡Gracias a todos por compartir conmigo la felicidad de la culminación de esta etapa!

Florencia

ÍNDICE GENERAL

	Página
<i>Índice temático</i>	1
<i>Resumen</i>	8
<i>Abstract</i>	13
<i>Abreviaturas</i>	18
<i>Introducción</i>	23
<i>Objetivos</i>	47
<i>Materiales y Métodos</i>	50
<i>Resultados - Capítulo I</i>	94
<i>Figuras y Tablas - Capítulo I</i>	120
<i>Resultados - Capítulo II</i>	152
<i>Figuras y Tablas - Capítulo II</i>	168
<i>Resultados - Capítulo III</i>	192
<i>Figuras y Tablas - Capítulo III</i>	206
<i>Discusión</i>	232
<i>Conclusiones</i>	261
<i>Referencias</i>	266
<i>Publicaciones y presentaciones a Congresos que surgieron como parte de esta tesis</i>	278

ÍNDICE TEMÁTICO

	Página
RESUMEN	8
ABSTRACT	13
ABREVIATURAS	18
INTRODUCCIÓN	23
1. ORGANIZACIÓN DEL TEJIDO TESTICULAR	24
2. ESPERMATOGÉNESIS	27
3. LÍPIDOS TESTICULARES Y SUS ÁCIDOS GRASOS	32
4. DISTRIBUCIÓN DE ESFINGOLÍPIDOS ENTRE DOMINIOS DE MEMBRANAS BIOLÓGICAS	35
5. ENZIMAS INVOLUCRADAS EN LA BIOSÍNTESIS DE PUFA Y VLCPUFA EN CÉLULAS ESPERMATOGÉNICAS	38
6. BIOSÍNTESIS DE ESFINGOLÍPIDOS EN CÉLULAS ESPERMATOGÉNICAS	42
OBJETIVOS	47
MATERIALES Y MÉTODOS	50
1. MATERIALES Y EQUIPAMIENTO	51
2. ANIMALES	51
3. MUESTRAS ESTUDIADAS Y PROCEDIMIENTOS PARA SU OBTENCIÓN	52
3.1. Obtención de túbulos seminíferos libres de células intersticiales (TS)	52
3.2. Obtención de las células del epitelio seminífero	52
3.3. Separación de diferentes poblaciones de células espermatoogénicas	54
3.4. Obtención de células de Sertoli	55
3.5. Testículos desprovistos de células germinales	56
4. OBTENCIÓN DE FRACCIONES DE MEMBRANAS DE CÉLULAS GERMINALES	56
4.1. Aislamiento de fracciones de membrana “resistentes a la solubilización en detergente” (DRM)	57
4.2. Aislamiento de fracciones de membranas por un método libre de detergente	57

• Obtención de homogenados celulares	58
• Ultracentrifugación en gradientes de sacarosa	59
• Lavado de las fracciones de membranas aisladas	59
5. CARACTERIZACIÓN DE LAS FRACCIONES DE MEMBRANA	60
5.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS- PAGE) y <i>Western blot</i> (WB)	60
• Preparación de las muestras	60
• Concentración de proteínas antes de su siembra	60
• Electroforesis	61
• Transferencia de las proteínas y su inmunodetección	61
5.2. Determinación del perfil proteico	62
5.3. Actividad de la 5' nucleotidasa	63
5.4. Determinación del contenido de proteínas	64
6. PROCEDIMIENTOS PREPARATIVOS Y ANALÍTICOS PARA EL ESTUDIO DE LOS LÍPIDOS	64
6.1. Extracción de los lípidos	64
6.2. Determinación de fósforo lipídico	65
6.3. Determinación de colesterol	66
6.4. Separación de lípidos en clases	66
• Separación de fosfolípidos	66
• Separación de lípidos neutros	67
• Separación de esfingomielinas	69
• Recuperación de los lípidos luego de su separación	69
• Purificación de esfingolípidos antes de su análisis	70
6.5. Análisis de los ácidos grasos de los lípidos	70
• Metanólisis de glicerofosfolípidos y de esfingolípidos	71
• Purificación de metil ésteres no hidroxilados y 2-hidroxilados	71
• Análisis cualitativo y cuantitativo de ácidos grasos	72
6.6. Análisis de especies moleculares de esfingomielinas y ceramidas	73
6.7. Medición de la radioactividad	73
7. ESTUDIOS SOBRE LA EXPRESIÓN DE GENES A NIVEL ARNm	74
7.1. Extracción de ARN	74
7.2. Transcripción reversa (RT)	74
7.3. PCR convencional (PCR)	75
7.4. PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR)	76
7.5. Validación de la qPCR y análisis de datos	77

8. INMUNOFLUORESCENCIA Y MICROSCOPIA	78
8.1. Inmunohistoquímica en cortes testiculares	78
• Obtención de criocortes	78
• Inmunodetección	79
9. IDENTIFICACION DE LAS PROTEÍNAS Elovl4 Y Fa2h	80
9.1. Obtención de extractos proteicos	80
9.2. Electroforesis e inmunodetección	81
10. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE ELONGASAS	82
10.1. Ensayos de incorporación de [³ H]20:4n-6	82
10.2. Medición de la incorporación y distribución del [³ H]20:4n-6	83
10.3. PUFA y VLCPUFA sintetizados a partir de [³ H]20:4n-6	83
11. ESTUDIOS SOBRE LA BIOSÍNTESIS DE ESFINGOLÍPIDOS	85
11.1. Ensayos con NBD-C6-ceramida	85
11.2. Ensayos con precursores radioactivos	85
• Precursores y suplementación del medio	85
• Inhibidores	86
• Soluciones de testosterona (Tes)	87
• Medio condicionado de células de Sertoli (MCS)	87
12. ENSAYOS DE VIABILIDAD Y FUNCIONALIDAD CELULAR	87
12.1. Exclusión del yoduro de propidio (IP)	87
12.2. Reducción del MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol--2-ilo)-2,5difeniltetrazol)	88
13. BIOSÍNTESIS DE Cer, SM Y GlcCer EN CÉLULAS GERMINALES A PARTIR DE [³H]16:0	89
13.1. Diseños experimentales empleados	89
13.2. Expresión de los genes <i>CerS3</i> , <i>SMS1</i> , <i>SMS2</i> y <i>GlcCerS</i>	91
• En células aisladas del epitelio seminífero	91
• En células tratadas con hormonas esteroidales y MCS	92
14. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	93
<u>RESULTADOS - CAPÍTULO I:</u>	94
FRACCIONES DE MEMBRANA DE CÉLULAS ESPERMATOGÉNICAS	
1. CARACTERÍSTICAS DE LAS CÉLULAS ESPERMATOGÉNICAS EN ESTUDIO	96

2. CARACTERIZACION DE LAS FRACCIONES DE MEMBRANA OBTENIDAS DE CT MEDIANTE EL MÉTODO QUE EMPLEA DETERGENTE EN FRÍO	97
2.1. Distribución de la proteína total	97
2.2. Distribución del fósforo lipídico total	97
2.3. Distribución de componentes lipídicos de membrana	98
2.4. Distribución de ácidos grasos de los glicerofosfolípidos	99
3. CARACTERIZACION DE LAS FRACCIONES DE MEMBRANA OBTENIDAS DE CÉLULAS ESPERMATOGÉNICAS MEDIANTE EL MÉTODO QUE EMPLEA HOMOGENIZACIÓN EN AUSENCIA DE DETERGENTE	99
3.1. Distribución de la proteína total	102
3.2. Recuperación y distribución del fósforo lipídico total	102
3.3. Actividad específica de la 5' nucleotidasa	104
3.4. Niveles y proporciones de componentes lipídicos en fracciones de membrana	105
3.5. Clases de fosfolípidos en, y su distribución entre, fracciones de membrana	108
3.6. Ácidos grasos de glicerofosfolípidos de fracciones de membrana	109
4. ESFINGOMIELINA, CERAMIDA Y SUS ÁCIDOS GRASOS	111
4.1. Ácidos grasos de SM y Cer en DRM y DSM	111
4.2. Ácidos grasos de SM y Cer en ML, MP y MEP	112
4.3. Cuantificación de SM y Cer en ML, MP y MEP	113
5. ESFINGOMIELINA, CERAMIDA Y SUS ESPECIES MOLECULARES	114
5.1. Especies de SM y Cer en DRM y DSM de CT	115
5.2. Especies de SM y de Cer en las ML, MP y MEP de CT	116
5.3. Especies de SM y Cer en membranas de EP, ER, y ET	116
FIGURAS Y TABLAS - CAPÍTULO I	120
<u>RESULTADOS - CAPÍTULO II:</u>	152
<i>EXPRESIÓN DE ELONGASAS Y DE 2-HIDROXILASA DE ÁCIDOS GRASOS EN EL TESTÍCULO DE RATA DURANTE EL DESARROLLO POSTNATAL Y LA DIFERENCIACIÓN CELULAR</i>	
1. EXPRESIÓN DE GENES DE LA FAMILIA DE LAS ELONGASAS (<i>Elov1</i>)	154
2. EXPRESIÓN CUANTITATIVA DEL ARNm DE LOS GENES <i>Elov15</i>, <i>Elov12</i>, <i>Elov14</i> Y <i>Fa2h</i>	154
2.1. <i>Elov15</i> , <i>Elov12</i> y <i>Elov14</i>	155
• Expresión durante el desarrollo postnatal	155

• Expresión en células del epitelio seminífero	155
2.2. <i>Fa2h</i>	157
2.3. Expresión de <i>Elovl5</i> , <i>Elovl2</i> , <i>Elovl4</i> , y <i>Fa2h</i> en testículos adultos desprovistos de células espermatogénicas	157
3. EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA <i>Elovl4</i> EN EL TEJIDO TESTICULAR	159
3.1. Expresión durante el desarrollo postnatal y la diferenciación celular	159
4. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE ELONGASAS EN CÉLULAS AISLADAS DEL EPITELIO SEMINÍFERO	161
4.1. Distribución del [³ H]20:4n-6 entre clases lipídicas	162
4.2. Elongación de [³ H]20:4n-6 y desaturación de los productos	163
5. EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA <i>Fa2h</i> EN EL TEJIDO TESTICULAR	165
5.1. Expresión de <i>Fa2h</i> durante el desarrollo postnatal y la diferenciación celular	165
FIGURAS Y TABLAS - CAPÍTULO II	168
<u>RESULTADOS - CAPÍTULO III:</u>	192
<i>BIOSÍNTESIS DE ESFINGOLÍPIDOS EN CÉLULAS ESPERMATOGÉNICAS</i>	
1. BIOSÍNTESIS DE SM Y GlcCer EN CÉLULAS GERMINALES AISLADAS A PARTIR DE NBD-C6-Cer	193
2. BIOSÍNTESIS DE Cer, SM Y GlcCer EN CÉLULAS GERMINALES AISLADAS A PARTIR DE [³H]16:0	194
2.1. Evaluaciones preliminares	194
2.2. Incorporación de [³ H]16:0 en lípidos neutros y polares	195
2.3. Biosíntesis de Cer, SM y GlcCer	197
2.4. Inhibición de la biosíntesis de Cer, SM y GlcCer	198
2.5. Influencia de la testosterona sobre la biosíntesis de Cer, SM y GlcCer	200
2.6. Influencia del medio de cultivo condicionado de células de Sertoli (MCS) en ausencia y en presencia de testosterona sobre la biosíntesis de Cer, SM y GlcCer	200
3. EXPRESIÓN DE LOS GENES <i>CerS3</i>, <i>SMS1</i>, <i>SMS2</i> Y <i>GlcCerS</i> EN CÉLULAS ESPERMATOGÉNICAS	202
3.1. Influencia de la diferenciación celular	202
3.2. Influencia de hormonas esteroidales	203
3.3. Influencia del medio MCS en ausencia y en presencia de hormonas esteroidales	204
FIGURAS Y TABLAS - CAPÍTULO III	206

DISCUSIÓN	232
I. ESFINGOMIELINAS Y CERAMIDAS CON n-V Y h-V: DISTRIBUCIÓN EN LAS MEMBRANAS DE CÉLULAS ESPERMATOGÉNICAS EN DIFERENCIACIÓN	233
II. EXPRESIÓN DE ELONGASAS DE ÁCIDOS GRASOS Y DE Fa2h DURANTE LA ESPERMATOGÉNESIS Y SU ASOCIACIÓN CON LOS PUFA Y VLCPUFA TÍPICOS DE LAS CÉLULAS ESPERMATOGÉNICAS	237
III. BIOSÍNTESIS DE ESFINGOLÍPIDOS EN CÉLULAS ESPERMATOGÉNICAS	244
CONCLUSIONES	261
REFERENCIAS	266
PUBLICACIONES Y PRESENTACIONES A CONGRESOS QUE SURGIERON COMO PARTE DE ESTA TESIS	278

RESUMEN

El objetivo general de esta tesis fue contribuir al conocimiento de la fisiología del sistema reproductor masculino a través del estudio de cómo esfingolípidos que son específicos de las células espermatogénicas (o células germinales, CG) cambian con el avance de la maduración sexual y la diferenciación celular. El foco estuvo sobre las especies moleculares de esfingomiélin (SM) y de ceramida (Cer) con ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) de muy larga cadena (VLCPUFA), que se presentan como VLCPUFA no hidroxilados (n-V) y 2-hidroxilados (h-V) de hasta 32 átomos de carbono en las CG de rata. Los objetivos específicos fueron i) investigar cómo se distribuyen estas especies moleculares entre las membranas de las CG, ii) determinar cómo cambia con el desarrollo testicular y la diferenciación celular la expresión de los *genes* que codifican a las enzimas responsables de la biosíntesis de los n-V y los h-V, iii) establecer si las CG aisladas son capaces de biosintetizar por sí mismas estas especies de Cer y de SM entre otras a través de la vía *de novo* y de expresar las correspondientes sintasas, y iv) inquirir sobre factores endocrinos y/o paracrinos capaces de modular dicha actividad y/o expresión.

Los efectos del desarrollo se estudiaron en testículos de animales de distintas edades postnatales (P), y los de la diferenciación en poblaciones de CG en los estadios de espermatocitos en paquiteno (EP), espermátidas redondas (ER), y espermátidas elongadas o tardías (ET), aisladas a partir de las células totales (CT) del epitelio seminífero de ratas adultas. En algunas mediciones se incluyeron a los cuerpos residuales (CR) y a las células de Sertoli (SC). Las poblaciones de CG se aislaron utilizando gradientes continuos de albúmina. Los estudios que requirieron separación, aislamiento e identificación de clases de lípidos y especies moleculares se hicieron por técnicas cromatográficas de alta resolución y sensibilidad. Las investigaciones sobre biosíntesis de n-V o de esfingolípidos (SL) se hicieron en CG mantenidas en cultivo primario, siguiendo las transformaciones biológicas de sustratos radioactivos. La expresión de genes a nivel ARNm se comparó aplicando PCR cuantitativa, y a nivel proteína se evaluó utilizando técnicas de *Western blot* seguida de inmunomarcación con anticuerpos, y en cortes de tejido por microscopía de inmunofluorescencia.

En la primera parte de la tesis se compararon la localización y la distribución de glicerofosfolípidos (GPL), colesterol y SM entre fracciones de membrana obtenidas de EP, ER y ET. El foco estuvo puesto en la distribución lateral de las especies moleculares de SM y Cer con VLCPUFA entre fracciones de membrana conteniendo dominios tipo *raft* y *no-raft*, partiendo de la hipótesis de que estas especies se verían *excluidas* de los primeros. Utilizando preparaciones de CT, inicialmente comparamos dos métodos, originalmente diseñados para estudiar la separación lateral de proteínas en membranas, para decidir cuál sería más apropiado para evaluar la distribución lateral de los lípidos. El método clásico, que

utiliza detergente en frío para obtener fracciones de membrana ricas en dominios tipo *raft*, mostró bajas recuperaciones de lípido y proteína, separación incompleta de los lípidos entre dominios, interferencia del detergente en los análisis, e hidrólisis parcial de GPL y SM. Se encontró preferible un método que usa gradientes de sacarosa para separar fracciones de membrana sobre la base de su densidad a partir de homogenados totales (HT), pues permitió separar fracciones de membrana livianas, pesadas, y extra-pesadas (ML, MP y MEP, respectivamente) además de una fracción aún más pesada en el *pellet* o sedimento de la homogenización. La recuperación, tanto del fósforo lipídico como de la proteína, alcanzó, en promedio, un 85% del originalmente presente en los HT. Proteínas marcadoras mostraron que las pequeñas ML contenían dominios tipo-*raft/caveolas*, y las abundantes MP dominios no-*raft*, principalmente derivados de la membrana plasmática, mientras las MEP eran ricas en membranas intracelulares. Consistente con su rol como precursoras de esfingolípidos con VLCPUFA, especies de Cer con n-V y h-V se hallaron más concentradas en las MEP. Como se esperaba, las ML contenían GPL y SM con AG saturados, mientras las MP eran ricas en GPL con PUFA y SM con VLCPUFA. Llamativamente, tal vez debido a la alta insaturación de esos ácidos grasos, la relación colesterol/fosfolípidos fue más alta en las MP que en las ML. Con el avance de la diferenciación, el contenido de Cer con VLCPUFA, especialmente h-V Cer, tendió a aumentar en las MP de las CG en el sentido EP→ER→ET. En el mismo sentido, mientras los ácidos grasos de los lípidos de ML no variaron, en los de las MP las relaciones 22:5n-6/20:4n-6 en GPL y h-V/n-V en SM y en Cer aumentaron en forma altamente significativa.

En la segunda parte, se determinó la expresión de enzimas que se espera jueguen un papel en la biosíntesis de los n-V y los h-V de SM y Cer. El foco estuvo puesto en la *Elovl4* y la *Fa2h*, con la hipótesis, basada en lo que habían mostrado los lípidos, de que sus expresiones aumentarían con el desarrollo postnatal en el testículo y que, en las CG de animales adultos, variarían en sentidos opuestos, la primera disminuyendo y la segunda aumentando con la diferenciación. Seis de los 7 miembros de la familia de genes *Elovl*, se expresaron a nivel ARNm en CG. Los genes *Elovl5* y *Elovl2* se incluyeron en el estudio por codificar elongasas cuya actividad parcialmente se superpone, colaborando en la biosíntesis de PUFA, y porque *Elovl2* es esencial en la formación de PUFA de 24 carbonos que sirven de sustrato a la *Elovl4*. Contrario a lo esperado, el nivel de ARNm de *Elovl4* se halló elevado en testículos que virtualmente carecían de CG (y de SM o Cer con n-V), como lo fueron los de animales en edades infantiles (P14) y los de adultos (P90) que habían sido despojados de CG por exposiciones repetidas a episodios de hipertermia. Esta aparente inconsistencia se debió a que el nivel de ARNm de *Elovl4* fue inesperadamente alto en las SC. Con la maduración sexual, los niveles de *Elovl4*-ARNm en el testículo *decrecieron* hasta

la adultez, para permanecer luego relativamente constantes. Entre las células espermatogénicas del adulto, los contenidos más altos de este ARNm aparecieron en las ET y en los CR. En contraste con *Elovl4*, *Fa2h* no se expresó como ARNm en el testículo hasta la edad de aparición de las ER (P26), y sus niveles *augmentaron* con el crecimiento y la diferenciación celular. Como proteínas, ni *Elovl4* ni *Fa2h* se expresaron en las SC. *Elovl4* estuvo más concentrada en EP que en ER, en las que mostró una localización perinuclear. En el citoplasma de las ET apareció concentrada en pequeñas estructuras esféricas que podrían ser CR en formación. Como proteína, *Fa2h* se encontró especialmente concentrada en las ET, asociada a una estructura supranuclear que juega un rol importante en dar la forma definitiva a la cabeza de los futuros espermatozoides. *Elovl4* y *Fa2h* no se detectaron en las gametas liberadas desde el epitelio seminífero. La actividad combinada de las elongasas en estudio (*Elovl5*, *Elovl2* y *Elovl4*) se evaluó comparando las conversiones sufridas por el [³H]20:4n-6 en cultivos de EP, ER y ET, así como de SC. Este PUFA fue elongado en las cuatro poblaciones celulares a [³H]22:4 y [³H]24:4, y estos productos fueron activamente desaturados a [³H]22:5 y [³H]24:5. Como se esperaba, se encontraron n-V tetraenoicos y pentaenoicos marcados con [³H] de 26 y hasta 32 carbonos sólo en las CG. La actividad de elongación de PUFA decreció en el sentido EP→ER→ET.

En la tercera parte, con la hipótesis de que las CG serían capaces de producir sus propios esfingolípidos, investigamos cómo espermatoцитos y espermátidas biosintetizan Cer, SM y GlcCer, y cómo dicha actividad, así como la expresión de los genes de las correspondientes sintasas, cambian con la diferenciación. Paralelamente evaluamos la posibilidad de que la biosíntesis y/o la expresión génica estuvieran afectadas por la testosterona (Tes) y por factores solubles liberados desde las SC. Empleando como precursor al [³H]16:0 y dos inhibidores específicos de la ruta biosintética *de novo* (L-cicloserina y fumonisina B1) hallamos que las CG, aisladas y en cultivo, son capaces de biosintetizar sus propias Cer y SM, incluyendo sus especies moleculares con VLCPUFA, además de GlcCer. Estas actividades biosintéticas fueron máximas en los EP, disminuyendo con la diferenciación (EP>>ER). La Tes estimuló la biosíntesis de [³H]SM sólo en las ER. La suplementación con el medio condicionado obtenido de cultivos de SC (MCS) estimuló significativamente la formación de [³H]Cer tanto en EP como en ER, la de [³H]SM sólo en ER, y la de [³H]GlcCer sólo en EP. La Tes y el MCS incrementaron a todas las especies moleculares de Cer y de SM, incluyendo las n-V. En comparación con el MCS sólo, la combinación Tes+MCS promovió significativamente la biosíntesis de [³H]SM en los EP, mientras la redujo en las ER, en las cuales incrementó la marcación de [³H]Cer y de [³H]GlcCer. El estímulo sobre la marcación de Cer y SM fue específico para las [³H]n-V Cer y [³H]n-V SM. El significativo fomento que sobre la biosíntesis *de novo* ejerció el MCS indica

que factores solubles (o transportados en microvesículas) provenientes de las SC (incluyendo tal vez distintas formas de ARN), juegan un rol en promover, en las CG, la biosíntesis de esfingolípidos destinados a sus membranas.

En esta tercera parte de la tesis también se investigó la expresión a nivel ARNm de genes que codifican para cuatro sintasas (S) clave implicadas en la biosíntesis de SL (*CerS3*, *SMS1*, *SMS2*, y *GlcCerS*), de tres elongasas de ácidos grasos (*Elovl5*, *Elovl2* y *Elovl4*), y de *Fa2h*. Se encontró que los niveles de ARNm de *CerS3* fueron máximos en EP y los de *SMS2* máximos en ER, ambos disminuyendo en las ET. Los de *GlcCerS* disminuyeron menos que éstos con la diferenciación, y los de *SMS1* no variaron. Los cuatro ARNm también aparecieron en los CR. Mientras *CerS3* no se expresó en las SC, los ARNm de las demás sintasas se encontraron en ellas, aunque en cantidades menores que en las CG. En la última parte de esta sección se estudiaron, en las células espermatoogénicas totales, los efectos de la Tes, del MCS, y de Tes+MCS sobre los niveles de ARNm de las enzimas mencionadas. Las expresiones como ARNm de *Elovl2* y *Elovl4* mostraron ser reguladas por el MCS, las de *SMS2* y *Elovl5* por MCS y Tes, y la de *Fa2h* sólo por Tes. La Tes y el MCS, tanto por separado como combinados, no afectaron los niveles de ARNm de *CerS3*, *SMS1*, o *GlcCerS*, mientras tendieron a reducir los de *SMS2*. La presencia de Tes no afectó el ARNm de *Elovl2* ni el de *Elovl4*, mientras tendió a aumentar el de *Elovl5*. El MCS, por su parte, redujo significativamente los ARNm de las tres elongasas. Cuando Tes y MCS se combinaron, el ARNm de *Elovl5* aumentó, y los de *Elovl2* y *Elovl4* continuaron bajos, recapitulando la influencia de Tes y del MCS, respectivamente. El efecto más significativo de la Tes, tanto sola como combinada con el MCS, fue el de estimular la expresión de *Fa2h*. Tomados en conjunto, estos resultados muestran por primera vez que factores que juegan roles fisiológicos en la espermatoogénesis, como lo son la testosterona y moléculas liberadas desde las células de Sertoli, son capaces de estimular la biosíntesis *de novo* de esfingolípidos en las células espermatoogénicas y de regular, en algunos casos a la alta y en otros a la baja, la expresión génica de algunas de las enzimas responsables de dicha biosíntesis.

ABSTRACT

The overall objective of this work was to contribute to the knowledge of the physiology of the male reproductive system by examining how molecular species of sphingolipids that are specific of spermatogenic cells (or germ cells, GC) change with the progress of sexual maturation and cell differentiation. The focus was on the sphingomyelins (SM) and ceramides (Cer) having polyunsaturated fatty acids (PUFA) with very long chains (VLCPUFA), which occur in their non-hydroxy (n-V) and 2-hydroxy (h-V) forms and have up to 32 carbon atoms in rat GC. The specific aims were i) to investigate how these molecular species distribute among the GC membranes, ii) to determine how the expression of genes that code for the enzymes responsible for the biosynthesis of n-V and h-V changes with testis maturation and GC differentiation; iii) to ascertain whether isolated GC are able to biosynthesize these species of Cer and SM among others through the *de novo* pathway and to express the corresponding synthases, and iv) to inquire into endocrine and/or paracrine factors that are capable of modulating such an activity and/or expression.

The effects of development were studied in testes at specific postnatal ages, and those of differentiation in GC populations at the stages of pachytene spermatocytes (PtS), round spermatids (RS), and elongated or late spermatids (LS) that were isolated from the total cells (TC) of the seminiferous epithelium of adult rats. In some analyses the residual bodies (RB) and the Sertoli cells (SC) were included. The GC populations were isolated using continuous gradients of albumin. The studies that required separation, isolation, and identification of lipid classes and molecular species were performed using chromatographic techniques of high resolution and sensitivity. The investigations about biosynthesis of n-V and of sphingolipids (SL) were done in GC maintained in primary culture by following the biological transformations of radioactive substrates. Gene expression at the mRNA level was compared by applying quantitative PCR, and at the protein level it was evaluated using Western blot followed by immunolabeling with antibodies, and in tissue sections by immunofluorescence microscopy.

In the first part of the thesis the localization and distribution of glycerophospholipids (GPL), cholesterol, and SM among membrane fractions obtained from PtS, RS, and LS were compared. The focus was on the lateral distribution of the molecular species of SM and Cer with VLCPUFA between membrane fractions containing raft-like and non-raft domains, with the hypothesis that these species would be excluded from the former. Using TC preparations, initially we compared two methods, originally designed to study the lateral separation of proteins in membranes, in order to decide which one would be most suitable to evaluate the lateral distribution of lipids. The classic method that uses detergent at low temperature to obtain fractions rich in raft-like domains showed poor recuperation of lipid and protein, incomplete separation of lipids between membrane fractions, interference of the

detergent in lipid analyses, and partial hydrolysis of GPL and SM. A method that employs sucrose gradients to separate membrane fractions from total homogenates (TH) on the basis of their densities was preferred, as it allows separation of light, heavy, and extra-heavy membrane fractions (LM, HM, and EHM, respectively) and an even heavier fraction in the pellet or sediment of homogenization. The recovery of lipid phosphorus and protein amounted, in average, to an 85% of that originally present in the TH. Protein markers showed that the small LM fractions contained raft-like/caveolae domains, and that the abundant HM had non-raft domains, mostly derived from cell plasma membranes, whereas the EHM were rich in intracellular membranes. Consistent with their role as precursors of sphingolipids with VLCPUFA, Cer species with n-V and h-V were found most concentrated in EHM. As expected, the LH contained GPL and SM with saturated fatty acids, whereas the HM fractions were rich in GPL with PUFA and SM with VLCPUFA. Interestingly, perhaps because of the high unsaturation of these fatty acids, the cholesterol/phospholipid ratio was higher in HM than in LH. The content of Cer with VLCPUFA, especially h-V Cer, tended to increase in the MP of GC with the progress of differentiation in the direction PtS→RS→LS. In the same direction, the fatty acids of LH lipids did not vary, while in those of MP the 22:5n-6/20:4n-6 ratio in GPL and the h-V/n-V ratio in SM and Cer increased in a highly significant form.

In the second part, the expression of enzymes that are expected to play a role in the biosynthesis of the n-V and h-V of SM and Cer was determined. The focus was placed on *Elovl4* and *Fa2h*, on the hypothesis, based on what lipids had shown, that their expressions would increase in testes with postnatal development and that, in adult animal GC, their expressions would vary in opposite directions, the former decreasing and the latter increasing with cell differentiation. Six of the 7 members of the *Elovl* gene family were expressed at the mRNA level in GC. The *Elovl5* and *Elovl2* genes were included in the survey as they code for elongases with partially overlapping activities, collaborating in the biosynthesis of PUFA, and because *Elovl2* is essential in the formation of the 24 carbons PUFA that serve as substrates to *Elovl4*. Against our expectations, the *Elovl4* mRNA level was found high in testes virtually lacking GC (and SM or Cer with n-V), as were those of animals in infantile ages (P14) and those of adults that had been deprived of their GC by repeated exposures to episodes of hyperthermia. This apparent inconsistency was due to the fact that the mRNA level of *Elovl4* was unexpectedly high in SC. With sexual maturation, the *Elovl4*-mRNA levels in testes *decreased* up to adulthood, then remaining relatively constant. Among adult spermatogenic cells, the highest content of this mRNA appeared in LS and RB. In contrast with *Elovl4*, *Fa2h* did not express itself as mRNA in testes until the appearance of RS (P26), and their levels *increased* with cell growth and differentiation. As proteins, *Elovl4*

and Fa2h were not expressed in SC. Elov14 showed a perinuclear localization, was more concentrated in PtS than in RS, and then appeared concentrated in small spherical structures in LS cytoplasm, which could be RB in formation. As a protein, Fa2h was found mainly concentrated in LS, associated to a supranuclear structure that plays an important role in giving the final shape to the heads of the sperm cells to-be. Elov14 and Fa2h were not detected in the gametes released from the seminiferous epithelium. The combined activity of the elongases under study (Elov15, Elov12 and Elov14) was evaluated by comparing the conversions undergone by [³H]20:4n-6 in cultures of PtS, RS and LS, as well as of SC. In the four cell populations this PUFA was elongated to [³H]22:4 and [³H]24:4, and these products were actively desaturated to [³H]22:5 and [³H]24:5. As expected, [³H]-labeled tetraenoic and pentaenoic n-V having 26 to 32 carbons were found only in GC. The activity of PUFA elongation decreased in the direction PtS→RS→LS.

In the third part, with the hypothesis that GC would be able to produce their own SL, we investigated how spermatocytes and spermatids biosynthesize Cer, SM and GlcCer, and how such an activity, as well as the expression of genes of the corresponding synthases, would change with cell differentiation. In parallel we evaluated the possibility that biosynthesis and/or gene expression would be affected by testosterone (Tes) and by soluble factors released from SC. Employing [³H]16:0 as precursor and two specific inhibitors of the *de novo* biosynthetic pathway (L-cycloserine and fumonisin B1), we found that GC, isolated and in culture, are able to biosynthesize their own Cer and SM, including their molecular species with VLCPUFA, and also GlcCer. These biosynthetic activities were maximal in PtS, decreasing with differentiation (PtS>>RS). Tes stimulated the biosynthesis of [³H]SM, only in RS. Supplementation with the conditioned medium obtained from SC cultures (CMS), significantly stimulated the formation of [³H]Cer in PtS and RS, that of [³H]SM only in RS, and that of [³H]GlcCer only in PtS. All the molecular species of Cer and SM were increased by Tes and CMS, including the n-V. In comparison with CMS, the combination Tes+CMS significantly promoted the biosynthesis of [³H]SM in PtS, while reducing it in ER, in which cells it increased the labeling of [³H]Cer y de [³H]GlcCer. The stimuli on Cer and SM labeling was specific on the [³H]n-V Cer and [³H]n-V SM. The significant enhancement that CMS exerted on the *de novo* biosynthesis indicates that factors that are soluble (or transported in microvesicles) coming from SC (perhaps including different forms of RNA), play a role in promoting in CG the biosynthesis of SL destined to their membranes.

In this third part of the thesis we also evaluated the expression, at the mRNA level, of genes that code for four key synthases (S) involved in the biosynthesis of SL (*CerS3*, *SMS1*, *SMS2*, and *GlcCerS*), of three fatty acid elongases (*Elov15*, *Elov12* y *Elov14*), and of *Fa2h*. We found that the mRNA levels of *CerS3* were maximal in PtS and those of *SMS2* maximal in

RS, while both decreased in LS. Those of *GlcCerS* varied less than these with differentiation and those of *SMS1* did not vary. The four mRNA also appeared in RB. Whereas *CerS3* was not expressed in SC, the mRNA of the other synthases was, although in lesser amounts than in GC. In the last part of this section the effects of Tes, CMS, and Tes+CMS on the mRNA levels of the above-mentioned enzymes were studied in total spermatogenic cells. The expressions as mRNA of *Elov2* and *Elov4* were regulated by CMS, those of *SMS2* and *Elov5* by CMS and Tes, and that of *Fa2h* only by Tes. Tes and CMS, either separately or in combination, did not affect the mRNA levels of *CerS3*, *SMS1*, or *GlcCerS*, while tended to reduce those of *SMS2*. The presence of Tes did not affect the mRNA of *Elov2* or *Elov4*, while tended to increase those of *Elov5*. The CMS reduced significantly the mRNA levels of the three elongases. When Tes and CMS were together, the mRNA of *Elov5* increased, and those of *Elov2* and *Elov4* continued low, recapitulating the influence of Tes and CMS, respectively. The most significant effect of Tes, either alone or combined with CMS, was to stimulate the expression of *Fa2h*. Taken together, these results show for the first time that factors that play physiological roles in spermatogenesis, as testosterone and molecules released from Sertoli cells do, are able to stimulate the *de novo* biosynthesis of sphingolipids in spermatogenic cells, and to regulate, in some cases positively and in others negatively, the gene expression of some of the enzymes responsible for such biosynthesis.

ABREVIATURAS

CÉLULAS Y TEJIDOS

CG: células germinales

CR: cuerpos residuales

CT: células intratubulares totales

EE: espermátidas elongadas

EP: espermátocitos en paquiteno

ER: espermátidas redondas

ET: espermátidas tardías

SC: células de Sertoli

TS: túbulos seminíferos

ENZIMAS Y PROTEÍNAS

Agps: *alquilglicerona fosfato sintasa* (del inglés *Alkylglycerone phosphate synthase*)

AR: receptor de andrógenos

BSA: albúmina de suero bovino

CerS: ceramida sintasa

DNasa: desoxirribonucleasa

Elovl (1-7): *elongasas de ácidos grasos de muy larga cadena* (del inglés *Elongation of very-long-chain fatty acids*)

Fa2h: ácido graso 2-hidroxilasa

FAS: ácido graso sintasa

GluCerS: glucosilceramida sintasa

GPR30: receptor de estrógeno acoplado a proteína G

Hprt: *hipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa* (del inglés *Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase*)

MCT4: transportador de monocarboxilatos 4

Pgk1: *fosfoglicerato quinasa 1* (del inglés *phosphoglycerate kinase 1*)

RNasas: ribonucleasas

SMS: esfingomielina sintasa

Tbp: *proteína de unión a TATA* (del inglés *TATA box-binding protein*)

TfR: receptor de transferrina

FRACCIONES DE MEMBRANA

DRM: *membranas resistentes a la solubilización en detergente* (del inglés *detergent-resistant membranes*)

DSM: membranas solubles en detergente (del inglés *detergent-soluble membranes*)

HT: homogenado total

MEP: membranas extra-pesadas

ML: membranas livianas

MP: membranas pesadas

Pe: *pellet*

HORMONAS

E2: 17- β -estradiol

FSH: hormona folículo estimulante

GnRH: hormona liberadora de gonadotrofinas

LH: hormona luteinizante

Tes: testosterona

INHIBIDORES

CS: L-cicloserina

FB1: fumonisina B1

LÍPIDOS

ADG: alquil-diacilglicéridos

AG: ácido(s) graso(s)

AGL: ácidos grasos libres

Cer: ceramida(s)

CGP: glicerofosfolípidos de colina

Col: colesterol

DAG: diacilgliceroles

DFA: ácidos grasos dienoicos

DPG: difosfatidilglicerol (cardiolipina)

EC: ésteres de colesterol

EGP: glicerofosfolípidos de etanolamina

FGSL: glucoesfingolípidos fucosilados

GlcCer: glucosilceramida(s)

GPL: glicerofosfolípidos

GSL: glucoesfingolípidos

LPC: lisofosfatidilcolina

LPE: lisofosfatidiletanolamina

ME: metil ésteres

MFA: ácidos grasos monoenoicos

O-TMS: O-trimetil-silil-derivados

HO-Cer: ceramida(s) con ácidos grasos 2-hidroxilados

HO-ME: metil ésteres con ácidos grasos 2-hidroxilados

P: fósforo lipídico

PA: ácido fosfatídico

PI: fosfatidilinositol

FL: fosfolípidos totales

PS: fosfatidilserina

PUFA: ácido(s) graso(s) poliinsaturado(s)

SFA: ácidos grasos saturados

SL: esfingolípidos

SM: esfingomielina(s)

TAG: triacilgliceroles

VLPUFA: ácidos grasos poliinsaturados de muy larga cadena (la abreviatura surge del inglés, *very-long-chain polyunsaturated fatty acids*). **n-V:** VLPUFA no hidroxilados; **h-V:** VLPUFA 2-hidroxilados.

MEDIOS

DMEM: medio Eagle modificado de Dulbecco (del inglés *Dulbecco's modified Eagle's medium*)

KHs: medio Krebs-Henseleit salino

MCS: medio condicionado de células de Sertoli

PBS: *buffer* fosfato salino (del inglés *Phosphate Buffer Saline*)

DMEM/F-12: medio usado para obtener el MCS

TÉCNICAS

GC: cromatografía en fase gaseosa (del inglés *gas chromatography*)

HPLC: cromatografía líquida de alta presión (del inglés *high performance liquid chromatography*)

LSC: conteo mediante centelleo líquido (del inglés *liquid scintillation counting*)

MALDI-TOF/MS: espectrometría de masas de desorción/ionización mediante láser asistida por matriz- tiempo de vuelo (del inglés *matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry*).

PCR: reacción en cadena de la polimerasa convencional (del inglés *polymerase chain reaction*)

qPCR: PCR cuantitativa en tiempo real

RT: transcripción reversa

SDS-PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecilsulfato de sodio (del inglés *sodium dodecyl sulfate- polyacrylamide gel electrophoresis*)

TLC: cromatografía en capa fina (del inglés *thin-layer chromatography*)

WB: *Western blot*

OTROS

ADNc: ácido desoxirribonucleico complementario

AMP: adenosina monofosfato o monofosfato de adenosina

ARNm: ácido ribonucleico mensajero

CNRQ: cantidades relativas normalizadas (del inglés *calibrated normalized relative quantity*)

Cq: ciclos de cuantificación (del inglés *quantification cycle*)

DCF: 2',7'-diclorofluoresceína

DMSO: dimetilsulfóxido

E: eficiencia de amplificación

IP: ioduro de propidio

MTT: bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5difeniltetrazol

NTC: control en ausencia del molde de ADN (del inglés *no template control*)

P: al referirse a la edad, día postnatal

pb: pares de bases

Pi: fosfato inorgánico

SFB: suero fetal bovino

INTRODUCCIÓN

1. ORGANIZACIÓN DEL TEJIDO TESTICULAR

El testículo de mamífero es un órgano complejo cuyas dos funciones principales son producir espermatozoides y secretar andrógenos. Presenta dos compartimentos funcionales: los **túbulos seminíferos**, en los cuales se producen los espermatozoides, y el intersticio que separa a dichos túbulos (**Figura 1**). Este último contiene a las células de Leydig, responsables de la producción y secreción de andrógenos, principalmente la testosterona. Entre muchas otras funciones, dicha hormona controla la iniciación y el mantenimiento de la espermatogénesis a partir de la pubertad (Holstein *et al.*, 2003). En el intersticio se encuentran además vasos sanguíneos y linfáticos, fibras nerviosas y macrófagos residentes.

Debido a su gran longitud, los túbulos seminíferos se encuentran replegados varias veces. Poseen una luz central que se encuentra tapizada por un complejo epitelio estratificado, el **epitelio seminífero**, en el que se hallan dos poblaciones básicas de células: las **células espermatogénicas**, de las cuales derivan los espermatozoides, y las **células de Sertoli**, células somáticas encargadas de sostener y regular la espermatogénesis en sincronía con las células intersticiales (Fig. 1). Los túbulos están delimitados por una membrana basal y rodeados por un tipo de células contráctiles, las células mioideas peritubulares (Russell y de França, 1995; Holstein *et al.*, 2003).

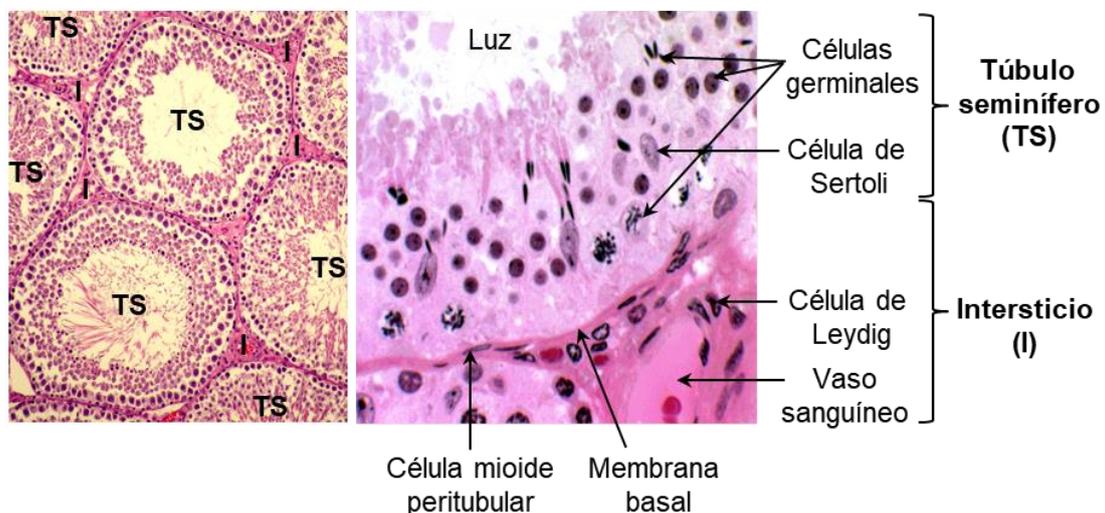


Figura 1. Organización del tejido testicular de rata. A la izquierda se muestran varios túbulos seminíferos (TS) adultos cortados transversalmente, rodeados por el intersticio (I). A la derecha se muestran en detalle los componentes celulares intra y extratubulares.

- Estructura del epitelio seminífero

En el epitelio seminífero del animal adulto, las células espermatogénicas o germinales se organizan en capas de diferentes estadios de diferenciación, y se ubican *entre* células de Sertoli vecinas (**Figura 2**). Las espermatogonias o células precursoras indiferenciadas (*stem cells*), descansan sobre la membrana basal. Por encima de ellas se ubican, sucesivamente,

los espermatoцитos meióticos, espermátidas redondas y espermátidas elongadas. Estas últimas se alojan en invaginaciones apicales profundas de las células de Sertoli, por lo que suelen aparecer entre los otros tipos de células germinales, mientras que sus colas se proyectan hacia la luz tubular. El movimiento de las células espermatoгénicas hacia la luz del túbulo a medida que se van diferenciando es custodiado por las células de Sertoli (Russell, 1990; de França *et al.*, 2016).

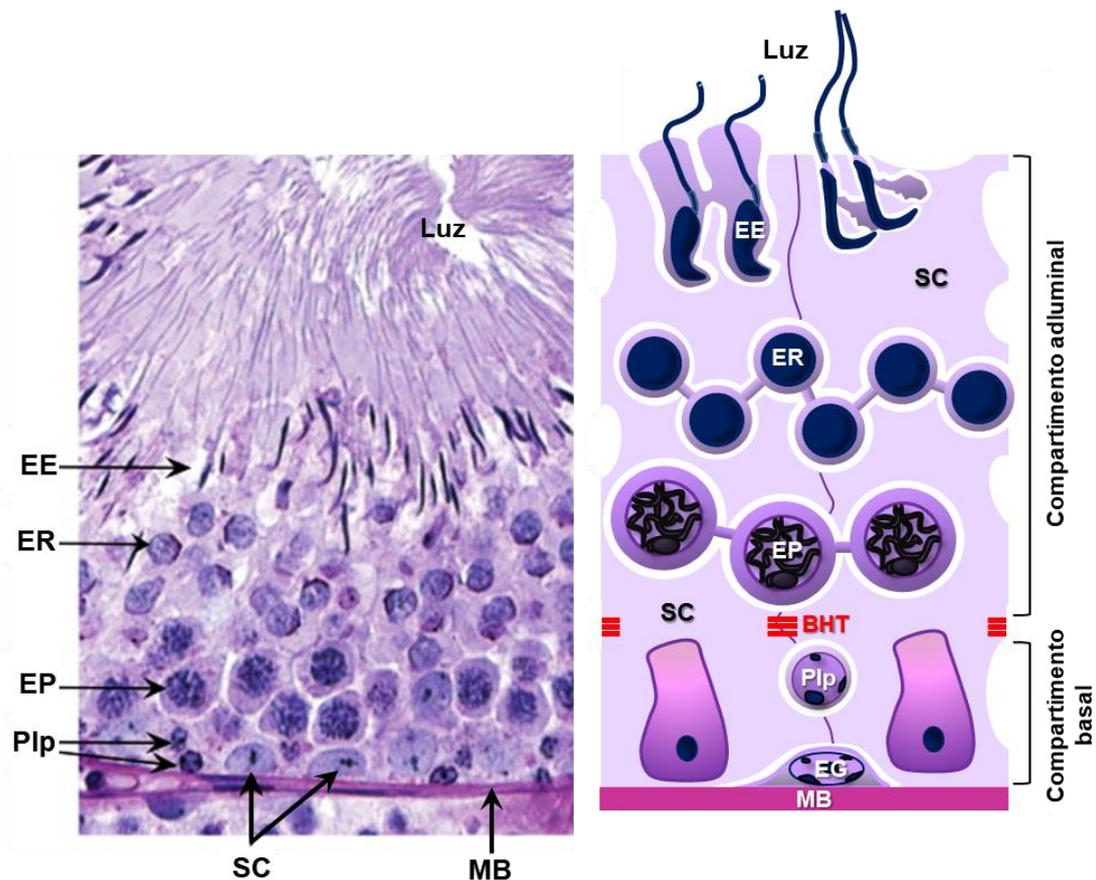


Figura 2. Estructura del epitelio seminífero de rata. Se muestran las relaciones entre las células de Sertoli (SC) y las células espermatoгénicas en diferenciación: EG, espermatoгонias; Plp, espermatoцитos en preleptoteno; EP, espermatoцитos en paquiteno; ER, espermátidas redondas; EE, espermátidas elongadas. Las SC y las EG son las únicas células que descansan sobre la membrana basal (MB). Con líneas rojas se indica la barrera hemato-testicular (BHT) que separa el epitelio seminífero en un compartimento basal y otro adluminal.

Las células de Sertoli son de tipo columnar arborescente y se extienden desde la membrana basal hasta el lumen tubular, interactuando con todas las células de la línea germinal (Griswold, 1998). Sus límites celulares no se distinguen al microscopio óptico, por lo que a este nivel se las puede identificar por su núcleo, muy grande y de forma irregular, con un nucléolo tripartito característico (Russell *et al.*, 1988). Son células somáticas con funciones esenciales en la inducción de la diferenciación del testículo en la vida fetal y postnatal, así como en el mantenimiento de la espermatoгénesis y la espermioгénesis en la

vida adulta, dado que son el principal sostén estructural, nutricional, y metabólico de las células germinales. Cada una de estas células es capaz de sostener 30-50 células germinales en diferentes estadios de su diferenciación (Weber *et al.*, 1983; Wong y Russell, 1983). Las células germinales que exceden este número mueren naturalmente por apoptosis y los cuerpos apoptóticos son fagocitados por las propias células de Sertoli.

Otra función de estas células es organizar la liberación de los espermatozoides desde el epitelio hacia el lumen tubular, proceso conocido como espermiación. También cumplen funciones catabólicas, ya que durante el proceso de elongación de las espermatidas, restos de materiales y de organelas en su citoplasma son concentrados en los así denominados **cuerpos residuales**, que también son eventualmente fagocitados por las células de Sertoli (Russell, 1990).

Las células de Sertoli adyacentes están conectadas entre sí a través de uniones estrechas basolaterales que separan el epitelio seminífero en un *compartimento basal* y un *compartimento adluminal* (Fig. 2). Estas uniones forman la barrera hemato-testicular (BHT) (Dym y Fawcett, 1970). Las espermatogonias y los espermatocitos se localizan en el compartimento basal hasta la fase temprana de leptoteno de la meiosis (Russell, 1977, 1978; Smith y Braun, 2012). Cuando los espermatocitos en preleptoteno se mueven desde el compartimento basal al adluminal a través de la BHT, se forma un compartimento intermedio en el que se alojan las células espermátogénicas más diferenciadas. Para tener acceso a éstas, las sustancias procedentes de la sangre o de las células del intersticio deben pasar primero a través de las células de Sertoli. De este modo, estas células controlan el pasaje de iones y biomoléculas a través de la barrera mediante varios transportadores, creando así un microambiente único, especialmente apropiado para el desarrollo de las células espermátogénicas (Mital *et al.*, 2011).

Las células germinales aparecen en el testículo mucho tiempo después de que se hubo establecido la tolerancia inmunológica central hacia los antígenos propios, por lo que muchas de las proteínas que ellas expresan podrían ser consideradas como antígenos “desconocidos”, resultando atacadas por el sistema inmune. Las células de Sertoli, a través de la BHT y de moléculas inmunomoduladoras, mantienen “secuestradas” a las células germinales en el compartimento adluminal y limitan el pasaje hacia el mismo de células y de moléculas inmunológicas incluyendo anticuerpos, que podrían atacar a los antígenos “nuevos” de las células espermátogénicas (Johnson y Setchell, 1968; Dym y Romrell, 1975; Wang *et al.*, 1994; Rival *et al.*, 2006).

2. ESPERMATOGÉNESIS

La **espermatogénesis** es el proceso de producción de espermatozoides a partir de espermatogonias. Se divide en 3 fases (**Figura 3**):

- 1) Una *fase proliferativa* en la cual las espermatogonias diploides ($2n$) presentan rápidas y sucesivas divisiones mitóticas. Mediante este proceso, dichas células se auto-renuevan por una parte, manteniendo su número, y por otra dan lugar a espermatocitos diploides que van a estar comprometidos con el desarrollo de espermatozoides maduros.
- 2) Una *fase meiótica* en la cual los espermatocitos recombinan y segregan el material genético a través de 2 divisiones meióticas sucesivas, dando lugar a la formación de espermatidas haploides (n).
- 3) Una *fase de diferenciación*, conocida como **espermiogénesis**, mediante la cual las espermatidas haploides se transforman en espermatozoides funcional y estructuralmente equipados para llevar a cabo la fertilización (Russell, 1990). En función de los cambios morfológicos que sufren las espermatidas durante la espermiogénesis, este proceso se divide en **pasos**, que son 19 en el caso de la rata, como se detalla más adelante.

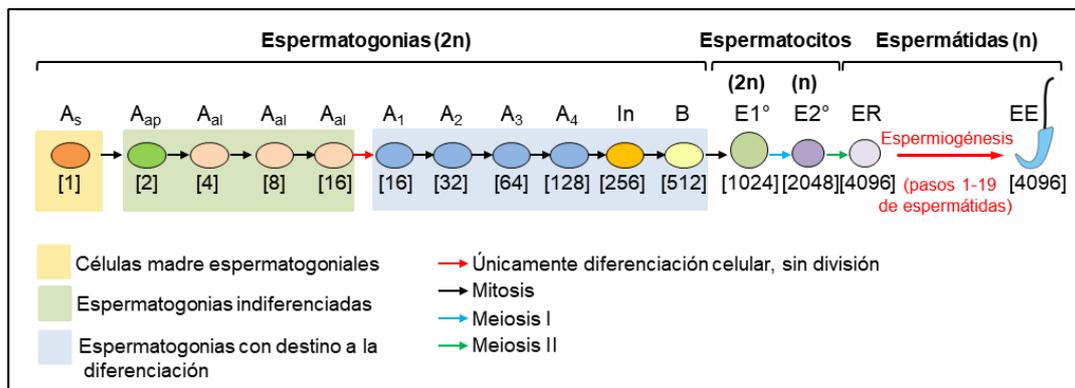


Figura 3. Esquema representativo de la espermatogénesis en la rata, donde se representan las tres fases del desarrollo (proliferativa, meiótica y espermiogénesis).

El número entre corchetes debajo de cada célula germinal representa el número de células hijas derivada de una célula progenitora temprana vía mitosis (flechas negras), meiosis [incluyendo meiosis I (flecha azul) y meiosis II (flecha verde)] o transformación/diferenciación sin implicar división celular (flechas rojas). En teoría, 4096 espermatidas elongadas (EE), y por lo tanto espermatozoides, se forman a partir de una única espermatogonia desapareada (A_s). Sin embargo, más del 75% de las células germinales (espermatogonias, espermatocitos y espermatidas) sufren apoptosis y degeneración, siendo mucho menor el número de espermatozoides derivado de una única espermatogonia. A , espermatogonia tipo A ; In , espermatogonia intermedia; B , espermatogonia tipo B ; $E1^\circ$, espermatocito primario; $E2^\circ$, espermatocito secundario; ER , espermatida redonda; EE , espermatida elongada, la cual se diferencia en un espermatozoide previo a la espermiación; A_s , espermatogonia $A_{desapareada}$; A_{ap} , espermatogonia $A_{apareada}$; A_{al} , espermatogonia $A_{alineada}$; A_1 - A_4 , espermatogonias destinadas a la diferenciación. Adaptado de *The Blood-Testis Barrier and Its Implications for Male Contraception*, Cheng y Mruk, *Pharmacological Reviews*, 2012.

La Fig. 3 muestra una representación esquemática de la espermatogénesis en la rata. La citocinesis es incompleta durante estas divisiones mitóticas y meióticas, de modo que las células hijas permanecen unidas entre sí mediante puentes citoplasmáticos, formando un sincicio de clones celulares. Se cree que estos puentes intercelulares promueven el desarrollo sincrónico de los clones de los distintos tipos de células de la línea germinal (Holstein *et al.*, 2003).

-Ciclo espermatogénico

A lo largo de un túbulo seminífero adulto, los diferentes tipos de células espermatogénicas no se distribuyen al azar en el epitelio seminífero durante la espermatogénesis, sino que se organizan en *asociaciones celulares* bien definidas denominadas **estadios**. Cada uno de estos estadios tiene una duración fija durante la espermatogénesis, y cada área del epitelio atraviesa todos estos estadios en forma ordenada y sucesiva, lo que constituye un **ciclo espermatogénico**, así denominado porque a partir de otra célula progenitora se repite muchas veces a lo largo de toda la vida fértil. En la rata un ciclo espermatogénico *completo* dura entre 55 y 60 días, lo cual quiere decir que este es el tiempo que transcurrirá entre dos apariciones sucesivas de la *misma* asociación de células espermatogénicas en un área específica del epitelio seminífero (Russell, 1990). De este modo, el desarrollo de distintas generaciones de células germinales está *sincronizado* para que pueda ser atendido simultáneamente por las células de Sertoli presentes en un dado segmento del túbulo. Esto es posible gracias a las complejas comunicaciones celulares existentes entre las células de Sertoli y entre éstas y las células germinales (Russell, 1990; de França *et al.*, 2016). En la **Figura 4** se ha esquematizado el ciclo espermatogénico de la rata. Sobre la base de la estructura del acrosoma y de la morfología del núcleo de las espermátidas, el ciclo espermatogénico consta de 14 **estadios** (I a XIV, Fig. 4) y 19 **pasos** (1-19, Fig. 4).

A lo largo de los túbulos seminíferos los estadios están organizados en **segmentos** secuencialmente ordenados. En la rata, cada segmento está ocupado por un estadio específico. Esta disposición determina que al analizar al microscopio secciones de testículo (donde túbulos en distintos estadios han sido cortados transversalmente) se observe a cada túbulo pasando por un estadio en particular, es decir, con una asociación específica entre células germinales (Russell, 1990; Knobil y Neill, 2006).

En términos generales, los **pasos** de la espermiogénesis involucran:

- Cambios en la morfología nuclear: condensación de la cromatina y disminución del volumen del núcleo, el cual adopta una forma falciforme en el espermatozoide de rata.

- Formación del acrosoma: esta vesícula rodeada de membrana se forma a partir del aparato de Golgi en la región anterior de la cabeza de las espermátidas, y se fusiona al núcleo por su parte posterior. Contiene gránulos de glucoproteínas y enzimas líticas que participan en los eventos de la fecundación.
- Desarrollo del flagelo y su implantación: se ubica en el polo opuesto al del acrosoma, orientado hacia la luz tubular.
- Eliminación de citoplasma y organelas excedentes: las espermátidas disminuyen su volumen eliminando líquido y compactando en forma de cuerpos residuales aquellas estructuras y materiales que no serán necesarios para el funcionamiento del espermatozoide, entre ellos ARN, proteínas, lípidos (en el interior de gotas lipídicas), restos de mitocondrias, peroxisomas y otras membranas intracelulares.

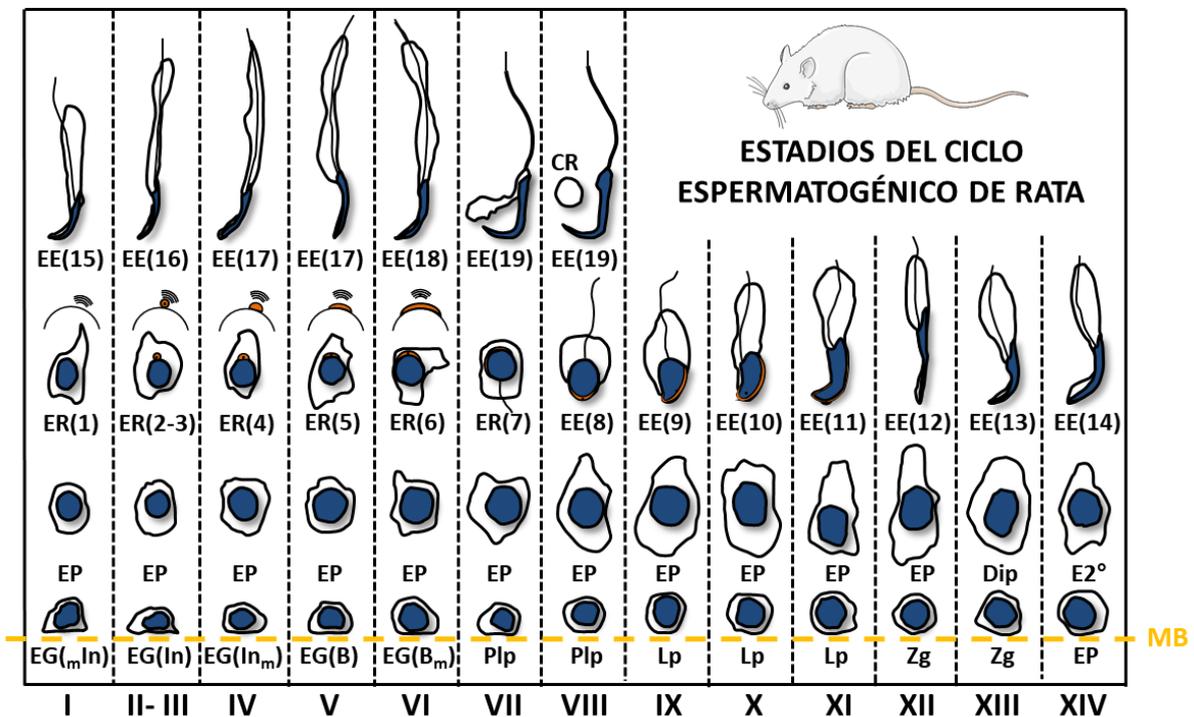


Figura 4. Mapa del ciclo espermatogénico completo en la rata. Las columnas verticales indicadas con números romanos muestran las asociaciones celulares características de cada estadio tubular. El ciclo finaliza con la culminación de todos los pasos de la espermiogénesis indicados con números arábigos. Esquema dibujado a partir del material publicado por Lonnie D. Russell en *Histological and Histopathological Evaluation of the Testis*, Cache River Press, 1990. EG, espermatogonias (In, intermedias; B, tipo B; m, mitóticas); Plp, espermatocitos en preleptoteno; Lp, espermatocitos en leptoteno; Zg, espermatocitos en zigoteno; EP, espermatocitos en paquiteno; Dip, espermatocitos en diploteno; E2°, espermatocitos meióticos secundarios; ER, espermátidas redondas; EE, espermátidas elongadas; CR, cuerpos residuales. Se indica la membrana basal (MB) con líneas punteadas amarillas.

- Desarrollo postnatal en el testículo

En la rata macho, la madurez sexual se alcanza entre las 9 y 10 semanas de edad (Lanning *et al.*, 2002; Ojeda y Skinner, 2006). A partir del nacimiento, y durante este tiempo,

se van produciendo cambios en la estructura del testículo en desarrollo que pueden dividirse en 6 períodos, indicados en días postnatales (DPN, que en esta tesis hemos abreviado P, seguido del día). Estos estadios del desarrollo postnatal son: el neonatal (P0-P7), infantil temprano (P8-P14), infantil tardío (P15-P20), juvenil (P21-P32), peripuberal (P33-P55) y adulto o pubertad tardía (P56-P70 en adelante) (Picut *et al.*, 2015). En la rata el comienzo de la pubertad (inicio de la capacidad reproductora) ocurre entre P40 y P50, en la mitad del período peripuberal (Stoker *et al.*, 2000) y corresponde al tiempo de liberación de los primeros espermatozoides (Ez) maduros en el epidídimo (Korenbrodt *et al.*, 1977). Después del período peripuberal, el proceso puberal continúa durante aproximadamente 2 semanas a partir de entonces hasta que el tamaño del testículo y la cantidad de espermatozoides alcanza su máximo en el adulto, generalmente alrededor de P70 (madurez sexual). En la **Figura 5** se resumen los principales eventos que ocurren en el epitelio seminífero de rata durante el desarrollo postnatal.

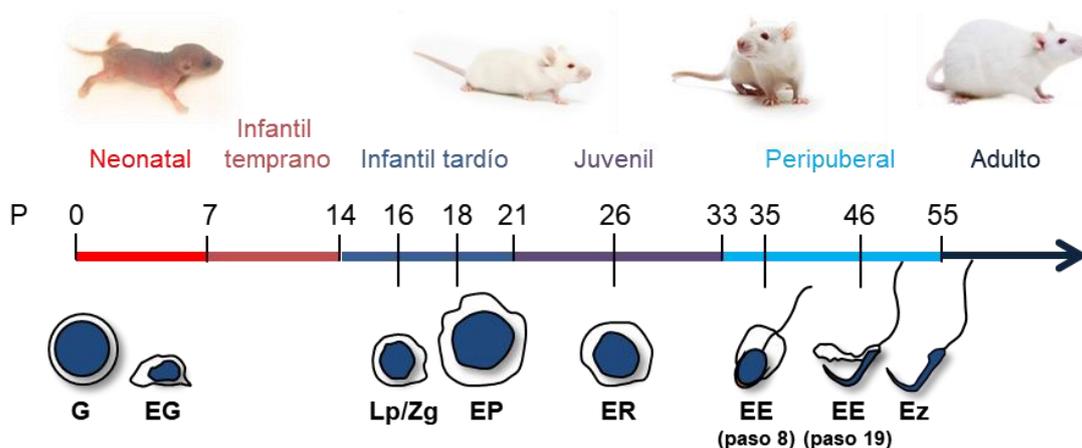


Figura 5. Diagrama mostrando la primera onda espermatogénica en el testículo de rata durante los diferentes períodos del desarrollo postnatal. Las células de Sertoli (no mostradas aquí) están presentes en el epitelio seminífero a lo largo de toda la vida. Las abreviaturas de los tipos celulares se corresponden a las mencionadas en la Fig. 4. G, gonocitos; Ez, espermatozoides.

En el período neonatal, los pequeños túbulos seminíferos se encuentran formados únicamente por gonocitos (G, células germinales fetales) en transición hacia espermatogonias (EG) tipo A y células de Sertoli mitóticamente activas. El período infantil temprano se caracteriza por una alta tasa de división mitótica en las células de Sertoli y espermatogonias (tipo A y B), que se observan en gran número dispuestas en una capa pseudoestratificada en el epitelio seminífero. La proliferación de las espermatogonias disminuye notablemente en el período infantil tardío, tiempo en el que alcanzan su máxima densidad celular en el epitelio seminífero al mismo tiempo que se las puede observar sufriendo apoptosis en la luz tubular. En este momento del desarrollo cesa por completo la actividad mitótica de las células de Sertoli, que permanecerán sin dividirse a lo largo del

resto de la vida del animal. Simultáneamente, comienza la primera onda de espermatogénesis, con la aparición de la primera generación de espermatoцитos meióticos en leptoteno (Lp) y zigoteno (Zg). Hacia el final de este período (entre P18 y P21) aparecen los primeros espermatoцитos en paquiteno (EP) en la región adluminal de los túbulos. En este punto, las espermatogonias y las células de Sertoli transitan hacia una disposición en doble fila, con una ronda externa de espermatogonias (tipo A, intermedias y tipo B) y una ronda más interna formada por las células de Sertoli.

En el período que va desde el comienzo del período juvenil (P21) hasta la adultez, hay un marcado aumento en el diámetro de los túbulos seminíferos, acompañado por la retracción de las células de Sertoli y las espermatogonias a una sola capa de localización basal, para dar espacio a las nuevas células espermatogénicas en desarrollo. El período juvenil se caracteriza por un aumento en el número de EP y la aparición de las primeras espermátidas redondas (ER) alrededor del P26. En cortes tubulares juveniles se pueden observar también EP apoptóticos en la luz tubular debido a los niveles relativamente bajos de testosterona de esta edad (Picut *et al.*, 2015).

Durante el período peripuberal (P33 a P55), hay una activa espermiogénesis, a medida que el diámetro tubular continúa expandiéndose, y las espermátidas transitan los 19 pasos de su desarrollo. Alrededor del P35 surgen las primeras espermátidas elongadas (EE) (paso 8 de la espermiogénesis) que se continuarán transformando hasta alcanzar el paso 19 en el P46. Durante el período puberal tardío, hay un continuo crecimiento del testículo hasta alcanzar el tamaño y la morfología típicos del adulto. Los túbulos presentan diámetros mayores y una gran densidad de espermátidas elongadas, y es posible reconocer los estadios tubulares por sus asociaciones celulares características (Picut *et al.*, 2015).

- Regulación de la espermatogénesis

La espermatogénesis normal en el testículo es un complejo proceso mantenido por hormonas y factores de crecimiento que actúan a través de caminos endocrinos, paracrinos y autocrinos, tanto *in vivo* como *in vitro* (Sofikitis *et al.*, 2008). Depende de la acción sincronizada del eje hipotálamo-hipófisis-testículo. La hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH) secretada por el hipotálamo, actúa sobre las células hipofisarias liberando FSH y LH, las cuales actúan como factores endocrinos de regulación extrínseca estimulando la espermatogénesis (Russell, 1990). La LH actúa indirectamente estimulando la producción de testosterona (Tes) en las células de Leydig. La Tes y la FSH, que son las principales reguladoras hormonales de la espermatogénesis, se unen a receptores específicos en las células de Sertoli, desencadenando señales paracrinas que tienen una influencia clave en el destino de las células germinales (Heckert y Griswold, 1993; Johnston *et al.*, 2004; Sofikitis

et al., 2008). A su vez, los niveles de estas hormonas en el testículo son regulados por las células de Sertoli. Estas secretan la hormona inhibina que actúa en la hipófisis inhibiendo la secreción de gonadotrofinas por retroalimentación negativa (Russell, 1990).

Por otra parte, las células de Sertoli secretan factores de crecimiento, citoquinas y metabolitos necesarios para la progresión exitosa de la espermatogénesis (Sofikitis *et al.*, 2008). En adición a las señales paracrinas, las células germinales también dependen de señales derivadas del contacto directo con la membrana de las células de Sertoli. A través de receptores específicos, las células germinales responden a la intrincada red de señales externas activando vías de señalización intracelular que determinarán en última instancia su destino (supervivencia o muerte, proliferación o diferenciación).

Estudios de co-cultivos entre espermatoцитos en paquiteno y células de Sertoli han demostrado inter-dependencia entre estas células en cuanto a la producción, e inhibición de la producción, de proteínas como la inhibina (Clifton *et al.*, 2002). Co-cultivos similares fueron útiles para establecer que FSH y Tes tienen un efecto estimulador, que en parte se superpone, sobre las divisiones meióticas y sobre la expresión post-meiótica de un gen específico de la línea germinal, el de la topoisomerasa 1 (Vigier *et al.*, 2004). En co-cultivos espermátidas redondas/ células de Sertoli, la suplementación con FSH y Tes estimula la normal diferenciación de las primeras en espermátidas elongadas, capaces de activar oscilaciones de Ca^{2+} en ovocitos (Hasegawa *et al.*, 2010).

3. LÍPIDOS TESTICULARES Y SUS ÁCIDOS GRASOS

- Ácidos grasos poliinsaturados de larga cadena

Se conoce desde hace varias décadas que los glicerofosfolípidos (GPL) testiculares de mamíferos adultos son muy ricos en **ácidos grasos (AG) poliinsaturados (PUFA)** de larga cadena, principalmente polienos de 20 y 22 átomos de carbono de las series n-6 y/o n-3, dependiendo de la especie. En el humano (Coniglio *et al.*, 1975), el mono (Connor *et al.*, 1998) y el cerdo (Paulenz *et al.*, 1995), el PUFA mayoritario es el docosahexaenoico (22:6n-3), mientras que en los roedores y en especial en la rata el PUFA mayoritario es el docosapentaenoico (22:5n-6), seguido del araquidónico (20:4n-6) (Bieri y Prival, 1965; Beckman *et al.*, 1978). El 22:5n-6 y el 22:6n-3, de vital importancia para el desarrollo y la diferenciación de las células germinales (Evans *et al.*, 1934), derivan de los AG esenciales linoleico (18:2n-6) y α -linolénico (18:3n-3), respectivamente. La relación entre estos PUFA de larga cadena y la espermatogénesis se manifiesta en el hecho de que son muy minoritarios en el testículo del animal sexualmente inmaduro y en que numerosos factores que afectan adversamente la síntesis de estos polienos en el testículo del animal adulto causan deficiencias en la espermatogénesis (Coniglio *et al.*, 1977; Marzouki y Coniglio,

1982, 1984; Gunasekar *et al.*, 1991). En la rata, las células germinales contienen proporciones significativamente mayores de 22:5n-6 que las células de Sertoli en las mismas clases lipídicas (Beckman *et al.*, 1978). Además, la proporción 22:5n-6/20:4n-6 aumenta con el avance de la diferenciación de las células espermatogénicas (Oresti *et al.*, 2010b). En la biosíntesis de estos AG participan las elongasas y desaturasas que se mencionan más adelante (Fig. 7).

- Ácidos grasos poliinsaturados de muy larga cadena

Los **esfingolípidos** (SL), particularmente las esfingomielinas (SM) (Poulos *et al.*, 1987; Robinson *et al.*, 1992) y las ceramidas (Cer) (Furland *et al.*, 2007a) presentes en testículos y espermatozoides de varias especies de mamíferos tienen la particularidad de estar enriquecidos en **PUFA de muy larga cadena** de entre 26 y 36 átomos de carbono (**VLCPUFA**, del inglés *Very-Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acids*). El tipo de ácido graso que predomina en los SL dependen de la especie: en el humano poseen hasta 32 átomos de carbono di-, tri- y tetraenoicos, los de cerdo, carnero y toro presentan AG de hasta 34 carbonos, pentaenoicos y hexaenoicos. Asimismo, mientras los VLCPUFA de origen porcino y humano son principalmente de la serie n-6, en los de ovino predominan los de la serie n-3, y los de bovino presentan tanto VLCPUFA de la serie n-3 como n-6 (Poulos *et al.*, 1986). En los roedores, estos VLCPUFA corresponden a tetraenos y pentaenos de la serie n-6 de hasta 32 átomos de carbono, siendo 28:4n-6 y 30:5n-6 las especies mayoritarias, seguidos de 32:5n-6 (Furland *et al.*, 2007a).

-Esfingomielinas y ceramidas con VLCPUFA

Además de poseer los típicos AG saturados y monoenoicos de 16 y 24 átomos de carbono (principalmente 16:0, 24:0 y 24:1), los SL testiculares contienen importantes proporciones de VLCPUFA. En la rata, tanto la SM (Robinson *et al.*, 1992) como la Cer (Zanetti *et al.*, 2010), además de VLCPUFA “normales” o **no-hidroxiados** (n-V) contienen VLCPUFA **2-hidroxiados** (h-V) (**Figura 6**).

Todos ellos pertenecen a la serie n-6, es decir que derivan de elongaciones sucesivas del 20:4n-6 y del 22:5n-6. El porcentaje de ambos tipos de VLCPUFA es aún mayor en la Cer que en la SM (Oresti *et al.*, 2010b; Zanetti *et al.*, 2010; Capítulo I de esta tesis). La presencia de especies de SM con h-V no es una característica general de los mamíferos, ya que si bien abundan en la rata y en el cerdo, no se detectan en el toro ni el carnero (Robinson *et al.*, 1992).

Los inusuales h-V fueron descritos también por Sandhoff y colaboradores como componentes de una serie de glucoesfingolípidos (GSL) complejos que contienen fucosa entre los varios glúcidos de su cabeza polar, otra peculiaridad de las células testiculares de

rata y ratón (Sandhoff *et al.*, 2005). En el ratón, estos SL son requeridos para completar apropiadamente la meiosis (Rabionet *et al.*, 2008).

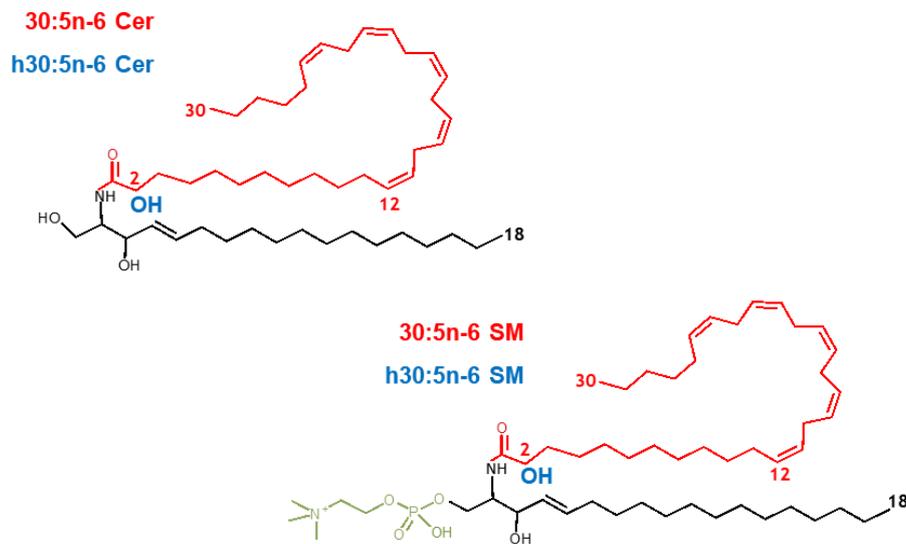


Figura 6. Esquema (en el plano) de esfingomielinas (SM) y ceramidas (Cer) con VLCPUFA. Para ambos esfingolípidos se muestran especies conteniendo el VLCPUFA 30:5n-6, en su versión no-hidroxilada (rojo) y 2-hidroxilada (azul). La esfingosina aparece en negro, y el grupo fosforilcolina de la SM en verde.

En los túbulos seminíferos de ratas adultas, las SM y Cer con VLCPUFA son componentes exclusivos de las células espermatogénicas, como lo demuestra el hecho de que al someter al tejido testicular de ratas adultas fértiles a situaciones de estrés que destruyen selectivamente las células espermatogénicas pero que mantienen viables a las células de Sertoli, las especies de SM y Cer con VLCPUFA ya no pueden ser detectadas. Esto ocurre luego del criptorquidismo experimental (Furland *et al.*, 2007b), la administración de drogas quimioterapéuticas (Zanetti *et al.*, 2007), la irradiación con rayos X (Oresti *et al.*, 2010a) y la hipertermia moderada (Furland *et al.*, 2011).

En los testículos de animales neonatos e infantiles, la SM y Cer están compuestas únicamente por ácidos grasos saturados, seguidos de cantidades menores de monoenoicos y dienoicos, indicando que no sólo las células de Sertoli sino también las espermatogonias indiferenciadas carecen de las inusuales especies de SM y Cer con VLCPUFA (Robinson *et al.*, 1992). En el testículo de rata estas especies no son detectadas hasta el P25 y aumentan notablemente su cantidad con la maduración sexual. En función del tiempo de desarrollo, las especies con n-V aparecen antes que las especies con h-V, las primeras en coincidencia temporal con la primera generación de EP, y las segundas en asociación con la primera generación de espermátidas (Zanetti *et al.*, 2010). Lo opuesto ocurre cuando las células germinales incluyendo espermatogonias son dañadas irreversiblemente en el testículo de rata adulta, por ejemplo por la administración repetida de

una droga antineoplásica (Zanetti *et al.*, 2007) o por la irradiación con rayos X (Oresti *et al.*, 2010a), situación en la que la *desaparición* de los espermatoцитos precede a aquella de las espermátidas, lo que se asocia con el hecho de que las especies de SM y Cer con n-V desaparecen antes que aquellas con h-V.

Investigaciones paralelas confirmaron que las especies de SM y Cer con VLCPUFA son características de las células espermatoгénicas, y que las proporciones entre n-V y h-V en ambos lípidos se modifican significativamente con la diferenciación de las células germinales (Oresti *et al.*, 2010b). Así, en los EP meióticos se encuentran los n-V como componentes principales de la SM y la Cer, mientras que en las ER postmeióticas los h-V se encuentran incrementados con respecto a los primeros.

Los VLCPUFA testiculares no son componentes exclusivos de los SL de las membranas de las células intratubulares. En 2003, Furland y colaboradores describieron en tres lípidos neutros de túbulos seminíferos de rata la presencia de AG tetraenoicos de 20 a 28 carbonos y pentaenoicos de 22 a 32 carbonos de la serie n-6, muy abundantes en ésteres de colesterol (EC), y en menor proporción en triacilgliceroles (TAG) y alquil-diacilglicéridos (ADG) (Furland *et al.*, 2003). Los EC contienen predominantemente 22:5n-6 y VLCPUFA, entre los que se destacan el 28:5n-6 y el 30:5n-6, mientras que los TAG y los ADG, además de ser también muy ricos en 22:5n-6, lo son en PUFA de 24 carbonos y contienen VLCPUFA en menor proporción que los EC. Estudios ulteriores demostraron que la mayor parte de los EC y los ADG se encuentran asociados a las células de Sertoli, mientras la mayor parte de los TAG se forma en las células germinales (Oresti *et al.*, 2010b).

4. DISTRIBUCIÓN DE ESFINGOLÍPIDOS ENTRE DOMINIOS DE MEMBRANAS BIOLÓGICAS

Los SL son moléculas estructural y funcionalmente diversas, que comparten una base esfingoidea, en mamíferos la esfingosina, como esqueleto común. Se los puede encontrar formando parte de las membranas de diferentes organelas intracelulares, incluyendo el núcleo, así como de la membrana plasmática. Los SL que se encuentran en esta última, incluyendo a la SM, se localizan particularmente en la hemicapa externa de la bicapa lipídica junto con la fosfatidilcolina, contribuyendo a la asimetría de lípidos en la misma (Van Meer *et al.*, 2008).

En la superficie celular, algunos SL complejos sirven como sitios de reconocimiento y adhesión para las proteínas del tejido extracelular (Hakomori e Igarashi, 1995). Además de poseer diversas funciones estructurales, en las últimas décadas se hizo evidente que los SL y sus metabolitos desempeñan un papel importante en la transducción de señales implicadas en varios procesos celulares (Chakraborty y Jiang, 2013). Algunos de ellos

incluyen la proliferación celular, diferenciación, migración, apoptosis y autofagia (Spiegel y Milstien, 2002; Zheng *et al.*, 2006; Tani *et al.*, 2007; Young *et al.*, 2013).

Típicamente, tanto la SM como otros SL tienden a encontrarse asociados con el colesterol (Col) formando microdominios discretos comúnmente conocidos como “*rafts*” o “balsas lipídicas” en la membrana plasmática (Simons e Ikonen, 1997; Slotte, 2013). Se trata de regiones segregadas lateralmente que se forman como resultado de afinidades selectivas entre SL, Col y algunas proteínas de la membrana. Se cree que estas estructuras funcionan como plataformas para la unión de proteínas específicas durante el tráfico de membranas y la señalización intracelular. Se ha hecho evidente que tales *rafts* no representan una sola estructura o forma, sino que existe una colección heterogénea de dominios de este tipo que difieren tanto en sus composiciones de proteínas y lípidos como en su estabilidad a lo largo del tiempo. En un encuentro internacional que reunió a biofísicos, bioquímicos y biólogos celulares para elaborar un consenso sobre los *rafts*, estas estructuras fueron definidas como “pequeños (10–200 nm) dominios heterogéneos y altamente dinámicos enriquecidos en esteroides y esfingolípidos que compartimentan procesos celulares” (Pike, 2006).

Las estrechas interacciones entre el Col y los SL hacen que los *rafts* se caractericen como dominios cuyos lípidos están más “ordenados” que los del resto de la membrana plasmática. Esta propiedad biofísica aparentemente hace que estos dominios sean resistentes a la solubilización en detergentes no iónicos (Brown y Rose, 1992). La solubilización en Tritón X-100 es el método clásico para obtener membranas resistentes a detergentes (DRM) de baja densidad (Brown y London, 2000).

Esta metodología, ampliamente utilizada para determinar la distribución lateral de proteínas entre dominios tipo *raft* y no-*raft* de membranas, involucra la extracción de esta fracción de membrana a 4°C para minimizar la degradación enzimática, mientras que el detergente genera una separación de fases que favorece la agregación de los *rafts* (Heerklottz *et al.*, 2003).

- Distribución de especies de SM y Cer entre fracciones de membrana de células germinales

Hasta el momento de comenzar esta tesis, no existía información disponible sobre la localización *subcelular* de las especies de SM y Cer conteniendo n-V y h-V y menos aún sobre la distribución *lateral* entre dominios de membrana “tipo *raft*” de las células espermatogénicas. Al respecto, estudios previos realizados por Peñalva y colaboradores en sistemas modelo de membranas permitieron demostrar, tanto en bicapas (Peñalva *et al.*, 2013) como en monocapas de Langmuir (Peñalva *et al.*, 2014), que las especies de SM con VLCPUFA presentan diferencias en sus propiedades biofísicas en comparación con las

conocidas especies de SM conteniendo AG saturados, como la 16:0 SM o la 24:0 SM. Además de mantener un estado fluido en un amplio rango de temperaturas (Peñalva *et al.*, 2013), estas inusuales SM no tienden a formar dominios ordenados segregados lateralmente al interactuar con el Col en vesículas unilamelares gigantes. Esto sugería la posibilidad de que las SM con VLCPUFA presentes en las membranas de las células espermatoogénicas no estarían incluidas en los clásicos dominios denominados *rafts* enriquecidos en Col y SM.

Es por ello que en el **Capítulo I** nos propusimos investigar cómo las especies de SM y Cer con VLCPUFA se distribuyen en las membranas de las células espermatoogénicas en relación con el Col y los GPL, con un foco especial en los dominios tipo *raft*, y determinar si esa distribución cambia durante la diferenciación celular.

En nuestros trabajos iniciales, utilizamos el método que emplea detergente (Brown y London, 2000) para aislar DRM representativos de los dominios tipo *raft* a partir de las células espermatoogénicas, pero nos encontramos con una serie de dificultades técnicas a la hora de analizar la composición lipídica de los mismos, que se expondrán en el Capítulo I. Buscando un método que no requiriera del uso de detergentes, decidimos comparar los resultados con los obtenidos, a partir de las mismas células, al utilizar un método libre de detergente, que previamente había sido descrito para timocitos (Monneron y D'Alayer, 1978a, b) y luego aplicado con modificaciones a ovocitos de anfibios (Luria *et al.*, 2002).

Teniendo en cuenta las poco convencionales propiedades biofísicas de las SM con VLCPUFA, nuestra hipótesis era que éstas no se localizarían en, sino que estarían ausentes de, fracciones de membrana del tipo de las conocidas como dominios “resistentes a la solubilización en detergente (DRM)” equivalentes a dominios “tipo *raft*”, ubicándose en cambio en regiones de las membranas de alta fluidez y desorden de las cadenas hidrofóbicas de sus lípidos, ricas también en GPL con PUFA, que, por simplicidad, en el Capítulo I hemos denominado “tipo no-*raft*”.

Dado que el método “libre de detergente” nos permitía obtener también membranas intracelulares, decidimos incluir a las Cer con VLCPUFA en el estudio. Al ser las Cer precursoras biosintéticas de las SM, esperábamos encontrarlas en la fracción de endomembranas, donde se colectan membranas del retículo endoplásmico y el Golgi. Preveíamos también que encontraríamos variaciones en la distribución de las SM y Cer con n-V y h-V entre células en distinto estadio de su diferenciación.

5. ENZIMAS INVOLUCRADAS EN LA BIOSÍNTESIS DE PUFA Y VLCPUFA EN CÉLULAS ESPERMATOGÉNICAS

- Elongasas de ácidos grasos de larga cadena

Un pre-requisito para la biosíntesis de los SL en células de mamífero es la disponibilidad de AG. Uno de nuestros objetivos al comenzar esta tesis era averiguar en qué células del epitelio seminífero se sintetizan AG tan largos como el 28:4n-6 o el 30:5n-6 presentes en la SM y la Cer del testículo.

El ácido palmítico (16:0) sintetizado *de novo* por la ácido graso sintasa (FAS), puede ser convertido intracelularmente en otros AG mediante elongaciones sucesivas de a dos átomos de carbono. En la biosíntesis de PUFA de 20 y 22 carbonos a partir de los AG esenciales obtenidos de la dieta (18:2n-6 y 18:3n-3), también intervienen pasos que involucran elongaciones, además de desaturaciones. La elongación de AG de 18 carbonos en adelante es catalizada por complejos enzimáticos embebidos en el retículo endoplásmico (Cinti *et al.*, 1992). Se trata de un proceso cíclico, con una serie de reacciones similares a las llevadas a cabo por la FAS, e involucra cuatro pasos: condensación, reducción, deshidratación y una segunda reducción. En el primer paso, el limitante de la elongación, un acil-CoA derivado de 16 o más átomos de carbono es condensado con el malonil-CoA para producir 3-cetoacil-CoA. Esta reacción es catalizada por enzimas de la familia de las “elongasas de ácidos grasos de muy larga cadena”, las denominadas “Elovl” (del inglés *Elongation of very-long-chain fatty acids*). Actualmente se conocen 7 isoformas de estas Elovl (Elovl1-7) en mamíferos, cada una de ellas presentando especificidad de sustrato hacia acil-CoAs de determinado largo de cadena y grado de insaturación (**Tabla 1**) (Jakobsson *et al.*, 2006).

Tabla 1. Especificidad de sustrato de las elongasas 1-7.

Elongasa	Sustrato
Elovl1	C18-C26 SFA/ C20-C22 MFA (principalmente C22)
Elovl2	C20-C22 PUFA
Elovl3	C16-C22 (principalmente C18) SFA y MFA
Elovl4	≥C24 SFA y PUFA
Elovl5	C18-C20 PUFA
Elovl6	C12-C16 SFA y MFA
Elovl7	C16-C22 (principalmente C18) SFA y MFA

SFA, saturados; MFA, monoenoicos; PUFA, poliinsaturados.

- Elongasas testiculares

Evidencias sobre la *actividad* de elongasas de PUFA y de $\Delta 6$ desaturasa en el testículo de rata y ratón provienen de múltiples experiencias de incorporación realizadas décadas atrás con AG radioactivos. Entre aquellas que observan la formación de PUFA de más de 24 carbonos, se encuentra una realizada en el testículo de ratón *in vivo*, donde a partir de [^{14}C]20:4n-6 se formaron pequeñas cantidades de PUFA de hasta 30 carbonos (Grogan *et al.*, 1984) y otra realizada con [^{14}C]20:4n-6 y [^{14}C]24:4n-6 en túbulos seminíferos aislados de rata en los que se formaron proporciones importantes de 24:5n-6, seguido de 26:5n-6 y 28:5n-6 radioactivos (Aveldaño *et al.*, 1993). En este último artículo se propuso que los PUFA de 24 carbonos 24:4n-6 y 24:5n-6 testiculares de rata podrían convertirse, no sólo en polienos más largos a través de elongación, sino también en tetraenos y pentaenos más cortos, como el 22:4n-6 y especialmente el mayoritario 22:5n-6, a través de desaturación y un paso de β -oxidación similar al que había sido propuesto en el hígado de rata para los PUFA de la serie n-3 (Voss *et al.*, 1991) y ulteriormente para los de la serie n-6 (Sprecher *et al.*, 1995). En la retina de bovino, donde se habían caracterizado VLCPUFA de las series n-6 y n-3, se obtuvieron resultados y conclusiones similares utilizando como sustrato al [^{14}C]24:5n-3 (Rotstein *et al.*, 1996).

- Elovl5, Elovl2, y PUFA

Para comprender cómo se forman los PUFA presentes en el tejido testicular de mamíferos, aún falta caracterizar qué elongasas se expresan en el mismo. En este sentido, se han encontrado niveles elevados de expresión del ARNm de **Elovl2** y **Elovl5** en tejido testicular humano y murino (Leonard *et al.*, 2002), así como en células espermatogénicas (EP y ER) aisladas de rata (Oresti *et al.*, 2010b). Ambas enzimas colaboran en la síntesis de los abundantes PUFA de 20 y 22 carbonos de las series n-6 y n-3 presentes en los GPL testiculares. Elovl2 sintetiza además PUFA de hasta 24 carbonos de las series n-6 y n-3, incluyendo 24:4n-6 y 24:5n-3. Estos PUFA pueden ser sometidos a $\Delta 6$ desaturación para producir 24:5n-6 y 24:6n-3, y éstos pueden ser posteriormente elongados para dar lugar a varios n-V de hasta 32 carbonos, incluyendo el 28:4n-6, 30:5n-6 y 32:5n-6 (**Figura 7**).

La importancia de la Elovl2 en la fisiología reproductiva masculina y su papel en la síntesis de VLCPUFA quedó demostrada con el hallazgo de que ratones *knockout* para el gen *Elovl2* son infértiles. Estos animales, cuyos testículos carecen de PUFA de 24 o más átomos de carbono, presentan un completo arresto de la espermatogénesis, con espermatogonias y espermatocitos primarios, pero con ausencia total de células germinales más diferenciadas y de espermatozoides (Zadravec *et al.*, 2011). Resulta llamativo el hecho

de que, en contraste con los ratones carentes o deficientes de *Elovl2*, los deficientes en *Elovl5* sean fértiles (Moon *et al.*, 2009).

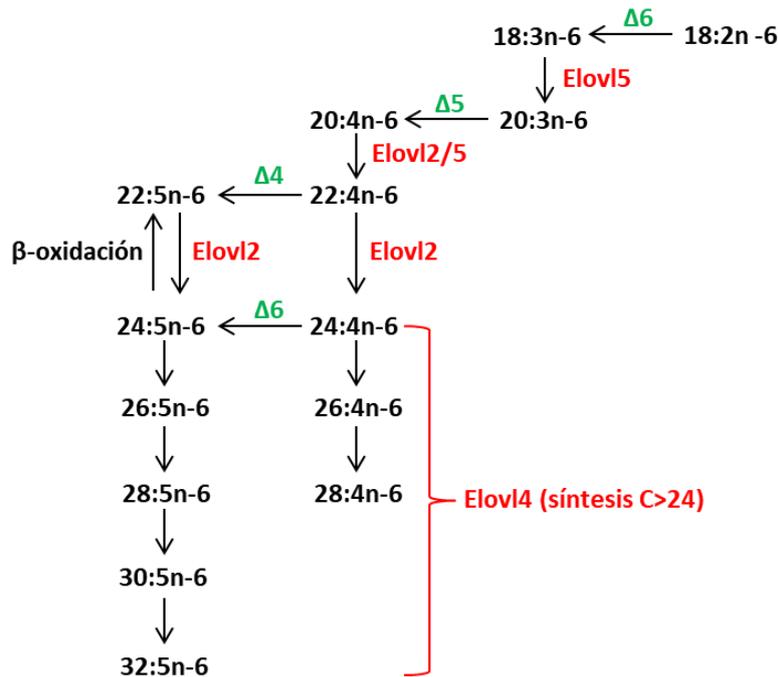


Figura 7. Vía de biosíntesis de ácidos grasos poliinsaturados de la serie n-6 a partir del ácido linoleico (18:2n-6). Se indican las elongasas (rojo) y las desaturasas (verde) involucradas en cada paso.

- Elovl4 y VLCPUFA

En la retina de varios vertebrados, también abundan VLCPUFA de hasta 34 átomos de carbono y entre 3 y 6 dobles enlaces de las series n-6 y n-3. A diferencia de los VLCPUFA testiculares, éstos se encuentran esterificados en la fosfatidilcolina presente en los bastones retinales, más específicamente en los discos de membrana de estas células fotorreceptoras, en estrecho contacto con la rodopsina (Aveldaño, 1987; Aveldaño y Sprecher, 1987). Se ha identificado a la **Elovl4** como responsable de la biosíntesis de los VLCPUFA retinales (Agbaga *et al.*, 2008). Consistentemente, el ARNm del gen que codifica para esta enzima se encuentra altamente expresado en la retina de primates (Zhang *et al.*, 2001; Umeda *et al.*, 2003) y ratón (Mandal *et al.*, 2003). Desde invertebrados a especies de mamíferos, los ortólogos de *Elovl4* muestran homología en su secuencia con el gen *ELOVL4* en el humano, lo cual sugiere que este gen ha sido conservado funcionalmente durante la evolución (Zhang *et al.*, 2003).

El gen *ELOVL4* de humano y la proteína que éste codifica han sido objeto de investigación debido a que mutaciones específicas en dicho gen están asociadas con diversas formas de degeneración macular de la retina. Entre estos desórdenes causantes de pérdida progresiva de la visión y ceguera se encuentra la enfermedad de *Stargardt* tipo 3 (Zhang *et al.*, 2001; Grayson y Molday, 2005; Vasireddy *et al.*, 2010). En conjunto, ensayos

de ganancia de función en células en cultivo (Agbaga *et al.*, 2008) y la generación de ratones *knockout* de *Elovl4* condicionales para células fotorreceptoras (Harkewicz *et al.*, 2012), demostraron que *Elovl4* es requerida para las síntesis de los VLCPUFA de la retina.

Mientras los ratones deficientes en *Elovl2* o *Elovl5* crecen normalmente, los deficientes en *Elovl4* son inviábiles y mueren a las pocas horas de haber nacido (Cameron *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2007; Vasireddy *et al.*, 2007). Esto se debe a que la enzima *Elovl4* se requiere también para la biosíntesis de AG saturados de muy larga cadena típicos de las Cer que forman parte del estrato córneo, responsable de la barrera de permeabilidad de la piel, por lo que en su ausencia los animales mueren por deshidratación. Por lo tanto, para determinar si *Elovl4* es esencial o no para la reproducción masculina, aún se requiere desarrollar deleciones específicas en testículo de este gen. La retina y el testículo, además de ser los dos tejidos que típicamente poseen lípidos con VLCPUFA, comparten una expresión importante del gen *Elovl4* (Mandal *et al.*, 2003), por lo que creemos que esta enzima debe jugar un rol importante en la biosíntesis de los VLCPUFA testiculares, y que mutaciones con pérdida de función o deleciones de este gen afectarán adversamente a la fertilidad masculina.

En este contexto, en el **Capítulo II** nos propusimos determinar la expresión, a nivel ARNm, de los siete genes conocidos como miembros de la familia de las elongasas en células germinales y de Sertoli. Nos centramos especialmente en el estudio de *Elovl4*, basándonos en nuestra hipótesis de que esta enzima participa en la biosíntesis de los n-V. También se incluyó el estudio de la expresión de *Elovl5* y *Elovl2*, dado que estos genes codifican elongasas cuya actividad en parte se superpone, cooperando para biosintetizar los muy mayoritarios PUFA de 20 y 22 carbonos del testículo. La *Elovl2* en particular, es importante como responsable de la formación de los PUFA de 24 carbonos que serán posteriormente elongados por la *Elovl4*. Ello explica por qué “sin *Elovl2* no hay VLCPUFA” en el testículo murino, como detallábamos más arriba (Zadravec *et al.*, 2011).

- Fa2h testicular

Considerando la presencia en el testículo de roedores de SL con VLCPUFA 2-hidroxiados (h-V) (Rabionet *et al.*, 2008; Oresti *et al.*, 2010a, Oresti *et al.*, 2010b; Zanetti *et al.*, 2010), hipotetizamos que la biosíntesis de los mismos requeriría de la actividad de una ácido graso 2-hidroxilasa (**Fa2h**) actuando sobre los n-V. El ARNm de esta enzima se encuentra expresado en cerebro (Eckhardt *et al.*, 2005; Alderson *et al.*, 2006), nervios periféricos (Maldonado *et al.*, 2008) y piel (Hamanaka *et al.*, 2002; Uchida *et al.*, 2007) de mamíferos. En la mielina, Fa2h es la responsable de la 2-hidroxilación de AG saturados y monoinsaturados de muy larga cadena (24:0 y 24:1), que abundan en sus típicos

galactoesfingolípidos. En la piel, Fa2h actúa para producir los AG saturados de 26 a 34 carbonos de las glucosilceramidas (GlcCer), precursoras de las abundantes Cer. La observación de que un gen homólogo de *Fa2h* también se encuentra expresado en el testículo de ratón adulto (Eckhardt *et al.*, 2005) es consistente con nuestra hipótesis de que este gen podría codificar la enzima, o una isoforma de la misma, responsable de la 2-hidroxiación de los n-V presentes en SL de las células germinales.

En el Capítulo II de esta tesis presentamos resultados cualitativos y cuantitativos sobre la expresión, a nivel ARNm, de los genes de tres elongasas, concentrándonos en la de *Elovl5*, *Elovl2* y *Elovl4* (las citamos en ese orden debido a la importancia de la *Elovl2* para la síntesis de PUFA de 24 carbonos, 24:4n-6 y 24:5n-6 en la rata, los eventuales sustratos de la *Elovl4*) (Fig. 7). También se compara la expresión, a nivel proteína, de *Elovl4* y *Fa2h* durante el desarrollo postnatal testicular y en células aisladas del epitelio seminífero (germinales y de Sertoli). Sobre la base de lo que conocíamos sobre la abundancia relativa de n-V en la SM y la Cer de espermatozoides y de h-V en la SM y la Cer de espermátidas (Oresti *et al.*, 2010b, y Resultados del Capítulo I), nuestra hipótesis era que la expresión de *Elovl4* sería mayor en espermatozoides que en espermátidas y que lo opuesto ocurriría con la de *Fa2h*.

6. BIOSÍNTESIS DE ESFINGOLÍPIDOS EN CÉLULAS ESPERMATOGÉNICAS

La síntesis *de novo* de los SL comienza con la condensación del palmitoil-CoA y la L-serina para formar 3-cetoesfingánina, reacción que es catalizada por la *serina palmitoiltransferasa* y es la limitante de la velocidad de esta vía. La 3-cetoesfingánina es luego reducida a dihidroesfingosina, la cual sirve de sustrato, junto con un ácido graso, a la *(dihidro)ceramida sintasa* para formar *(dihidro)ceramida*. La *dihidroceramida desaturasa* finalmente reduce a ésta última para producir la *ceramida* (**Figura 8**).

La síntesis *de novo* de la Cer tiene lugar en el retículo endoplásmico, desde donde es transportada al Golgi, ya sea mediante vesículas o mediante la proteína de transferencia de Cer (CERT). En el Golgi, la Cer puede ser usada a su vez como sustrato por la *SM sintasa* (SMS) dando lugar a la SM, o por la *GlcCer sintasa* (GlcCerS), conduciendo a la formación de GlcCer.

La *ceramida sintasa* (CerS) es la enzima responsable del paso de biosíntesis de la *(dihidro)ceramida*. Existen seis isoformas de esta enzima en mamíferos (CerS1 a CerS6), cada una de las cuales posee especificidad de sustrato hacia acil-CoAs de determinado número de átomos de carbono (Mizutani *et al.*, 2009). La CerS3 se expresa en niveles elevados en la piel y en el testículo (Mizutani *et al.*, 2006), ambos tejidos donde abundan las *ceramidas* con AG de muy larga cadena (24 a más de 32 carbonos). La Cer de la piel es

extracelular, sus AG son predominantemente saturados, y es sintetizada en los queratinocitos por hidrólisis de la GlcCer previamente sintetizada para tal fin. Los ratones *knockout* para *CerS3* presentan un fenotipo letal a los pocos días del nacimiento debido a defectos en la barrera que protege permeabilidad de la piel (Jennemann *et al.*, 2012).

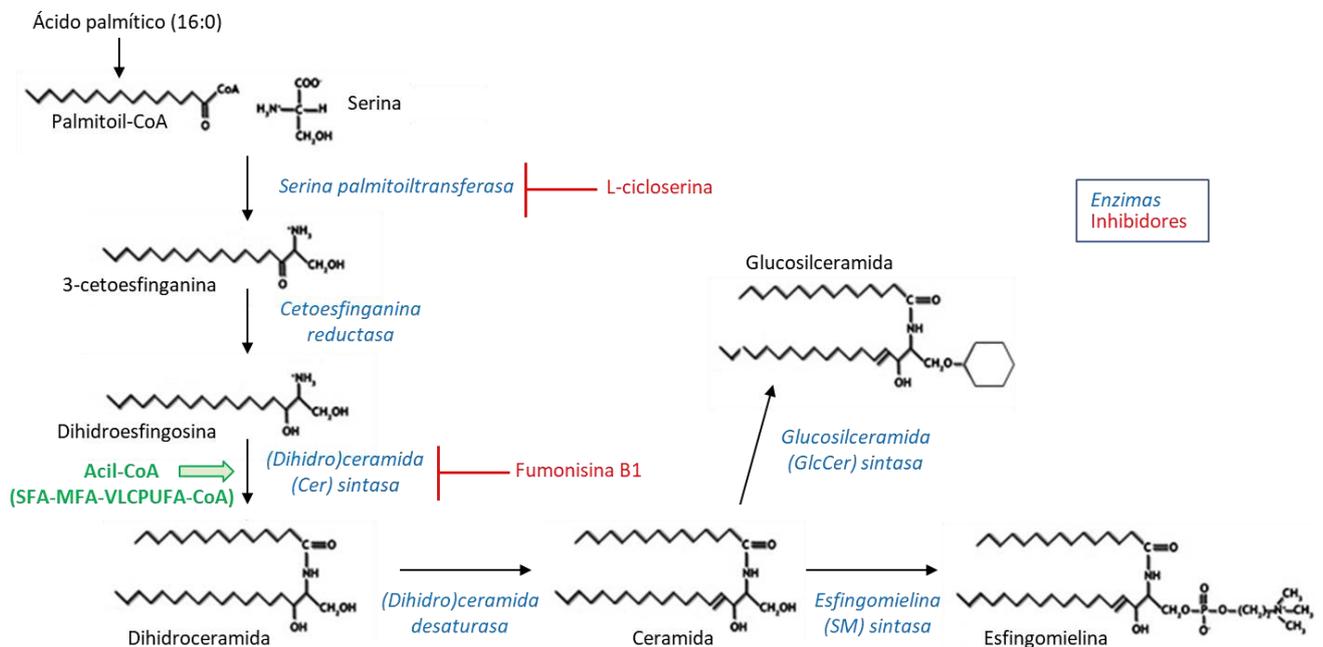


Figura 8. Vía de biosíntesis de novo de esfingolípidos.

Más recientemente, en ratones *knockout* condicionales para *CerS3* en células germinales, la ausencia tanto de especies de Cer con VLCPUFA, como de SL derivados de ella (SM y GSL fucosilados) confirmaron el rol clave de esta enzima en la síntesis de los SL con VLCPUFA del testículo (Rabionet *et al.*, 2015). En el mismo trabajo, estos autores mostraron además que en el tejido testicular la *CerS3* se expresa únicamente en las células germinales del compartimento adluminal (espermatoцитos y espermátidas), y que su expresión varía durante la progresión de la diferenciación. Los ratones con delección del gen *CerS3* en las células germinales presentaron un fenotipo mutante con arresto de la espermatogénesis, ausencia de espermátidas y espermatozoides, además de atrofia y desorganización del epitelio tubular. También se observaron en los testículos de estos animales células multinucleadas gigantes anormales, debido a la pérdida de los puentes intercelulares que conectan los clones de células espermatogénicas (Rabionet *et al.*, 2015).

Muchos aspectos del metabolismo de estos lípidos en el complejo microambiente del epitelio seminífero aún no han sido dilucidados. Un interrogante que nos propusimos responder en el presente trabajo fue si las células germinales aisladas, esto es, sin el sostén estructural y nutricional que *in vivo* les es provisto por las células de Sertoli, son capaces de

sintetizar por sí mismas Cer, SM y GlcCer a partir de precursores de la vía de biosíntesis *de novo* (palmitato y serina), y de ser así, si dicha capacidad variaba en función del estadio de diferenciación celular. Sobre la base de los antecedentes previos que se tenían sobre la distribución diferencial de SM y Cer con n-V y con h-V en espermatoцитos y espermátidas, y su virtual ausencia de las células de Sertoli, nuestra hipótesis era que estos lípidos serían sintetizados *de novo* en las propias células espermatoгénicas, y que dicha capacidad variaría con la diferenciación celular.

Existe el antecedente en la bibliografía de que es posible estudiar partes de las vías de síntesis de SM en células de Sertoli en cultivo, aisladas de ratas prepúberes, las cuales incorporan en su SM precursores radioactivos como [¹⁴C]colina y ácido [¹⁴C]palmitico (Ziulkoski *et al.*, 2001a). Sin embargo, hasta la actualidad no existen datos sobre la biosíntesis de SL en células germinales aisladas. Tanto en el testículo entero como en los túbulos seminíferos, los estudios sobre biosíntesis de SL y marcación de lípidos se complican por el hecho de que las células de Sertoli, además de contribuir con un nivel basal de síntesis de sus propios lípidos, tienen entre sus múltiples tareas la de fagocitar células germinales (defectuosas, apoptóticas o supernumerarias) y catabolizar sus componentes (Pineau *et al.*, 1991), entre ellos, materiales biológicos que incluyen a los lípidos y a los ARNm que éstas últimas pudieran haber sintetizado.

En esta tesis doctoral, el hecho de poder aislar las células germinales a partir de testículos de ratas adultas con un alto grado de pureza y viabilidad, tanto las células totales (CT) como poblaciones celulares en diferentes estadios de su diferenciación (EP y ER), nos alentó a emplearlas para investigar su capacidad de biosíntesis *de novo* de SL. Para ello, establecimos cultivos primarios, utilizamos [³H]palmitato ([³H]16:0) como precursor, y empleamos como herramienta dos inhibidores específicos ampliamente reportados en este tipo de estudios biosintéticos: la L-cicloserina (CS), inhibidor de la serina palmitoiltransferasa, y la fumonisina B1 (FB1), inhibidor de la ceramida sintasa (Merrill, 2002) (Fig. 8).

De acuerdo con nuestra hipótesis, esperábamos que la biosíntesis *de novo* fuese más activa en los espermatoцитos que en las espermátidas, puesto que los primeros deben “preparar” una buena cantidad de lípidos cuyo destino es formar las *membranas* requeridas para la inminente y prolongada división meiótica. En cambio, creemos que en células más diferenciadas como las espermátidas, ocurre una “remodelación” de dichos lípidos, con eliminación o modificación de parte de sus AG (por ej., conversión de n30:5n-6 en h30:5n-6).

-Regulación de la biosíntesis de esfingolípidos en células espermatogénicas

La vía de síntesis *de novo* de SL incluye la formación de varios intermediarios bioactivos, como Cer y bases esfingoideas (esfingosina y esfinganina), que de por sí poseen efectos específicos en las funciones celulares. Por lo tanto, en adición a las enzimas involucradas en la transformación de SL (por ej., ceramidasa, esfingomielinasas y glucosilceramidasa catabólicas), los niveles intracelulares de estos lípidos se encuentran bajo el control estricto de las enzimas implicadas en la vía de biosíntesis *de novo*, mostradas previamente en la Fig. 8. Sin embargo, en la actualidad prácticamente no existe información acerca de la regulación de esta vía en células animales, y menos aún en células espermatogénicas. Por ejemplo, no existen estudios que indiquen si la biosíntesis de SL está regulada hormonalmente.

En este contexto, la administración de FSH a animales hipofisectomizados estimula la síntesis de fosfolípidos testiculares, entre ellos la de SM (Yokoe y Hall, 1970). Células de la granulosa en cultivo y expuestas a la FSH aumentan la síntesis de los GSL más complejos, como los gangliósidos involucrados en las interacciones célula-célula (Kwak *et al.*, 2011), importantes también en las interacciones entre las células de Sertoli y las espermatogénicas. Estudios en riñón e hígado demostraron que la presencia de testosterona (Tes) o de 17- β -estradiol (E2) resulta en incremento de la actividad de enzimas involucradas en la síntesis de GSL aumentando los niveles de GlcCer y estimulando la proliferación celular (Shukla *et al.*, 1992; Anić y Mesarić, 1998).

En las células germinales la Tes puede ser metabolizada por aromatización a E2 debido a que los espermatoцитos, y en mayor medida las espermátidas elongadas, poseen una aromatasa funcional (Nitta *et al.*, 1993; Carreau y Hess, 2010). Esta aromatasa parece jugar un papel crucial en la homeostasis de los niveles de Tes y E2 en el epitelio seminífero. Actualmente los estrógenos son considerados biológicamente relevantes en la espermatogénesis y esenciales para una completa maduración y diferenciación de las células germinales (Carreau *et al.*, 2011). Este hecho ha quedado demostrado utilizando animales *knockout* para la aromatasa (ArKO) y para el receptor de estrógenos alfa (ER α KO), donde se observa un arresto de la espermatogénesis y la incapacidad de diferenciarse de las células germinales (Robertson *et al.*, 1999, 2002). Sumado a este hecho, los estrógenos modulan la vías de señalización que tienen notoria relevancia en la proliferación y la diferenciación celular (Sukocheva *et al.*, 2009).

En Capítulo III, presentamos resultados que sugieren un posible rol de la Tes y de factores solubles liberados desde las células de Sertoli, solos y en conjunto con Tes y E2, como posibles reguladores de la transcripción de los genes de enzimas claves involucradas

tanto en la vía de biosíntesis *de novo* de SL (CerS3, SMS y GlcCerS), como en la vía de formación de los VLCPUFA que ellos contienen (Elovl4 y Fa2h). Un antecedente en células germinales es la demostración de que la FSH y la Tes tienen un efecto estimulador de la meiosis en los espermatoцитos y que regulan la expresión de genes específicos en las ER (Clifton *et al.*, 2002; Vigier *et al.*, 2004; Hasegawa *et al.*, 2010).

OBJETIVOS

Objetivo general

Contribuir al conocimiento de la fisiología del sistema reproductor masculino a través del estudio de los cambios que tienen lugar en las células espermatogénicas de rata durante el desarrollo sexual y la diferenciación celular, con el foco sobre los esfingolípidos ricos en VLCPUFA, investigando cómo se distribuyen en sus membranas, cómo se biosintetizan, y cómo se expresan y se regulan los genes que codifican a varias de las enzimas responsables de dicha biosíntesis.

-Capítulo I: Estudiar la localización de las especies moleculares de SM y Cer con n-V y h-V en membranas de células espermatogénicas en tres estadios de su diferenciación, con el foco en la distribución lateral de estas especies entre dominios tipo *raft* y *no-raft*, partiendo de la hipótesis de que se verán excluidas de los dominios tipo *raft*.

-Capítulo II: Determinar la expresión de enzimas que se espera jueguen un papel protagónico en la biosíntesis de los n-V y los h-V, con el foco en la Elov14 y la Fa2h, con la hipótesis, basada en las peculiaridades de los lípidos, de que se expresarán en distintos niveles y proporciones en cada estadio de la diferenciación de las células germinales, tanto a nivel ARNm como proteína.

-Capítulo III: Determinar cómo espermatoцитos y espermátidas biosintetizan Cer, SM y GlcCer, y cómo se modifica dicha actividad en presencia de inhibidores específicos, así como la expresión génica de las correspondientes sintetas, con la hipótesis de que estas células serán capaces de sintetizar sus propios esfingolípidos por la vía *de novo*.

Objetivos específicos

Capítulo I:

- ✓ Comparar un método clásico que emplea detergente con un método libre de detergente para determinar cuál sería preferible para estudiar la distribución de los *lípidos* de las células espermatogénicas totales (CT) entre fracciones conteniendo dominios tipo *raft* y *no-raft*, con un foco especial en el contenido y distribución de las especies de SM y Cer.
- ✓ A partir de células espermatogénicas en tres estadios específicos de su diferenciación (EP, ER y ET), separar fracciones de membrana (membrana plasmática, intracelulares, etc.) y caracterizarlas mediante proteínas marcadoras, incluyendo proteínas específicas de dominios tipo *raft*.
- ✓ Investigar la distribución de clases lipídicas (glicerofosfolípidos, colesterol, SM y Cer) así como la de especies moleculares de SM y Cer, entre las fracciones de membrana obtenidas.

- ✓ Determinar cómo se modifica la composición y la distribución lateral de las especies moleculares de SM y Cer con n-V y h-V entre las fracciones tipo *raft* y *no-raft* de membranas con el avance de la diferenciación celular.

Capítulo II:

- ✓ Determinar la expresión, a nivel ARNm, de los 7 genes conocidos como miembros de la familia de las elongasas de ácidos grasos, en túbulos seminíferos de rata y células aisladas a partir de ellos.
- ✓ Caracterizar y comparar cuantitativamente los niveles de ARNm de elongasas implicadas en la síntesis de PUFA (Elovl5 y Elovl2) y de VLCPUFA (Elovl4 y Fa2h):
 - durante el desarrollo testicular postnatal;
 - en células aisladas del epitelio seminífero: SC, EP, ER y ET, así como en los CR;
 - en testículos adultos *in vivo* luego de haber sido desprovistos experimentalmente de sus células espermatogénicas.
- ✓ Estudiar cambios en la expresión, a nivel proteína, de Elovl4 y Fa2h durante el desarrollo postnatal testicular y con el avance de la espermatogénesis.
- ✓ Evaluar en SC, EP, ER y ET en cultivo el resultado de la actividad enzimática combinada de las elongasas en estudio (Elovl5, Elovl2 y Elovl4) sobre un PUFA radioactivo para comparar los cambios asociados a la diferenciación celular.

Capítulo III:

- ✓ Evaluar cómo varía dicha capacidad biosintética en función de la diferenciación celular (EP, ER y ET).
- ✓ Caracterizar y cuantificar la expresión, a nivel ARNm, de los genes que codifican cuatro sintasas clave implicadas en dicha biosíntesis (Cer sintasa 3, SM sintasas 1 y 2, y GlcCer sintasa).
- ✓ Investigar si las células espermatogénicas sintetizan los esfingolípidos Cer, SM y GlcCer por la vía *de novo*, utilizando como precursor al ácido palmítico marcado e inhibidores específicos de dicha ruta biosintética.
- ✓ Investigar los efectos de la testosterona tanto sobre la biosíntesis de Cer, SM y GlcCer, como sobre los niveles de ARNm de las mencionadas sintasas, en paralelo con los de Elovl4 y Fa2h.
- ✓ Indagar acerca de la posible influencia de factores solubles liberados por las SC, sólo o en combinación con testosterona o estradiol, sobre la *regulación* de la biosíntesis de Cer, SM y GlcCer en las células germinales en estudio.

***MATERIALES Y
MÉTODOS***

1. MATERIALES Y EQUIPAMIENTO

Los reactivos químicos, sales, proteínas, enzimas y marcadores fluorescentes utilizados en los diferentes experimentos que componen este estudio, así como los medios de cultivo celular, se adquirieron en su mayor parte a representantes de las firmas Sigma Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA) y a Gibco® (Grand Island, NY, USA), respectivamente. Los reactivos de PCR fueron adquiridos a representantes en el país de Kapa Biosystems Inc. y BioSystems. Los anticuerpos utilizados fueron de Abcam, Santa Cruz Biotechnology y Thermo Fisher Scientific (USA). Los solventes empleados para la cromatografía en capa fina y cromatografía líquida, de grado HPLC, fueron de laboratorios J.T.Baker, Merck, UVE y Dorwill. La sílica gel (G y H) y las placas finas de alta resolución para la cromatografía en capa fina fueron adquiridas a representantes de la firma Merck (Alemania). Los gases utilizados fueron provistos por las firmas locales Air Liquid y BB-Industrias. El agua utilizada en la preparación de soluciones, medios y reactivos en todos los casos fue de grado ultrapuro. Las columnas para cromatografía en fase gaseosa se obtuvieron de Supelco a través de la firma OmniLab, de Argentina, y las columnas de HPLC se adquirieron en Agilent Technologies. El equipamiento utilizado constó de homogeneizadores, disruptores de tejidos y células, baños termostatzados, colector de fracciones, centrifugas de mesa y ultracentrifugas equipadas con rotores de ángulo fijo y móvil, agitadores, micrótopo y criostato, microscopios ópticos de fluorescencia, microscopio confocal, sistema de evaporación de solventes bajo nitrógeno, campanas, lámparas de luz UV, estufas, espectrofotómetro, Picodrop, lector de placas, contador de centelleo líquido, incubadores, flujo laminar, termociclador para PCR, cromatógrafo de gases, cromatógrafo líquido de alta presión y fluorímetro. Otros materiales incluyendo reactivos y piezas de equipamiento se detallan en apartados específicos de esta sección.

2. ANIMALES

Se utilizaron ratas macho, cepa Wistar, de 90 ó 120 días para los estudios en animales adultos y de entre 14 y 60 días para los estudios en función de la edad postnatal. Los roedores fueron obtenidos en el Bioterio del Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Bahía Blanca (INIBIBB), donde se mantuvieron en condiciones estándar de temperatura y ciclos de luz-oscuridad, con provisión de alimentos y agua *ad libitum*. Los procedimientos utilizados para la manipulación de los animales y los protocolos experimentales fueron oportunamente aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Experimentación (CICUAE) de la Universidad Nacional del Sur, Argentina. Los órganos a estudiar se extrajeron rápidamente luego del sacrificio de los animales por procedimientos quirúrgicos establecidos.

3. MUESTRAS ESTUDIADAS Y PROCEDIMIENTOS PARA SU OBTENCIÓN

Se utilizaron testículos enteros de animales de distintas edades postnatales y de adultos, y túbulos seminíferos (TS) aislados a partir de estos últimos. A partir de estos TS se obtuvieron por disociación las células totales intratubulares (CT), y a partir de estas CT se separaron poblaciones de células espermatogénicas en diferentes estadios de su diferenciación: espermátocitos en paquiteno (EP), espermátidas redondas (ER) y espermátidas tardías (ET). En algunos casos se incluyeron por comparación también células de Sertoli (SC) y cuerpos residuales (CR). Las células se emplearon enteras para los estudios en que se las mantuvo en cultivo por distintos períodos, o se las homogeneizó para los estudios sobre fracciones subcelulares y partes de sus membranas.

3.1. Obtención de túbulos seminíferos libres de células intersticiales (TS)

Los testículos se extrajeron realizando dos incisiones en la bolsa escrotal, se decapsularon cuidadosamente, y se retiraron los vasos sanguíneos principales percibidos a simple vista. El tejido resultante, consistente principalmente en los túbulos seminíferos y el correspondiente intersticio testicular, se enjuagó con solución fisiológica.

El material biológico procedente de 2 testículos por muestra se incubó en 20 mL de medio Krebs-Henseleit salino (KHS) pH 7.4, de composición NaCl 144 mM; KCl 4.2 mM; MgCl₂ 1.6 mM; KH₂PO₄ 1.6 mM; HEPES 10 mM, suplementado con 0.5 mM de CaCl₂ y 10 mM de DL(+)-Lactato (Sigma Aldrich, L-1375). Para la digestión del tejido de sostén se utilizó un cóctel enzimático conteniendo colagenasa tipo II (Gibco[®], 17101015) 0.5 mg/mL y DNasa (Sigma Aldrich, DN-25) 20 µg/mL. Los túbulos se expusieron a este medio durante 20 minutos a un baño termostático a 33°C, con agitación constante de 120 revoluciones/minuto en un ambiente de 95% O₂: 5% CO₂.

Luego de la incubación, los túbulos seminíferos se decantaron y se descartó el sobrenadante (que contenía acúmulos de células del intersticio testicular y pequeños vasos sanguíneos). Se realizaron tres lavados con 20 mL de medio KHS, para obtener los túbulos seminíferos libres del resto de las células extra-tubulares (células intersticiales de Leydig, macrófagos, y células presentes en capilares sanguíneos y linfáticos).

3.2. Obtención de las células del epitelio seminífero

Los túbulos seminíferos, rodeados de sus células mioideas incluidas en la túnica propia (fibrillas de colágeno en contacto con la membrana basal del epitelio seminífero) fueron incubados durante 3 minutos en un baño termostático a 33°C, con agitación constante de 120 revoluciones/minuto en 20 mL de medio KHS conteniendo tripsina 0.4 mg/mL (Sigma Aldrich, T-7409) y DNasa 20 µg/mL. A continuación se realizó su disgregación mecánica con pipeta Pasteur plástica, evitando la formación de burbujas, y agregando DNasa (10 µg/mL)

para facilitar la desintegración de acúmulos de ADN. Una vez que los túbulos se disgregaron completamente, las células obtenidas se filtraron a través de mallas de nylon de 250 y 70 μm y los filtrados se centrifugaron durante 5 minutos a 1000 rpm en centrífuga clínica (225 g). El sedimento obtenido (*pellet* conteniendo células) se lavó 3 veces con medio KHs en presencia de inhibidor de tripsina mediante centrifugaciones de 5 minutos a 1000 rpm, obteniendo finalmente un *pellet* conteniendo las células intratubulares (germinales y de Sertoli), además de espermatozoides testiculares. Para eliminar estos espermatozoides, el *pellet* de células se resuspendió en 10 mL de medio KHs y se filtró a través de algodón humedecido con el mismo medio y de dos mallas de nylon de 250 y 70 μm . Se obtuvo así el conjunto de células intratubulares totales, que a lo largo de este trabajo denominamos abreviadamente **células totales (CT)**. Esta fracción está compuesta mayoritariamente por células germinales (en promedio, un 97% de células germinales y un 3% de células de Sertoli). Los pasos descritos hasta aquí en esta sección se resumen gráficamente en la **Figura 1**.

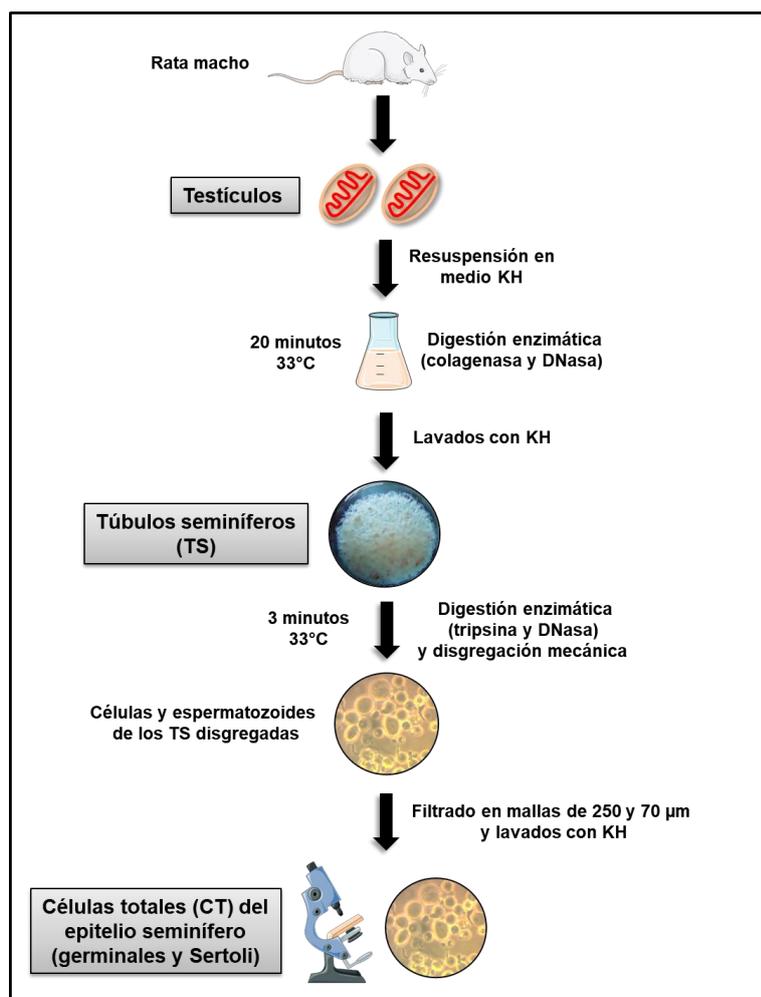


Figura 1. Los túbulos seminíferos (TS) se separaron de las células del intersticio testicular mediante el empleo de colagenasa. Los TS contienen el epitelio seminífero, compuesto por células de Sertoli en estrecho contacto con células espermatogénicas en distintos estadios de su diferenciación, y espermatozoides testiculares, que se encuentran en la luz central de los túbulos. Las células intratubulares se separaron entre sí por disgregación mecánica en presencia de tripsina. Finalmente, los espermatozoides tubulares se separaron por filtración, obteniendo así la preparación, rica en células germinales totales, que aquí denominamos células totales (CT).

3.3. Separación de diferentes poblaciones de células espermatogénicas

Las poblaciones de células de la línea germinal estudiadas en esta tesis fueron los espermatoцитos en paquiteno (EP), las espermátidas redondas (ER) y las espermátidas tardías (ET). Para separarlas, se aplicó a las CT obtenidas como recién se describió el procedimiento STA-PUT (Romrell *et al.*, 1976), cuyos pasos se ilustran esquemáticamente en la **Figura 2**.

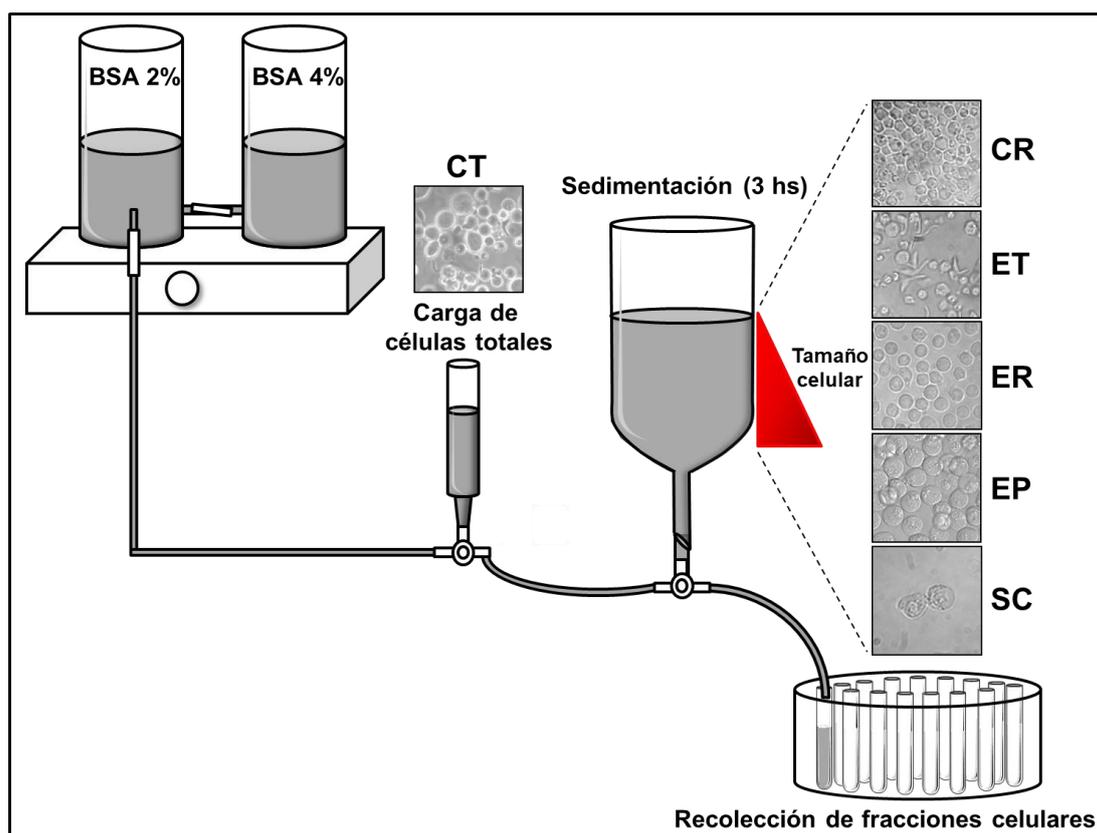


Figura 2. Esquema del procedimiento STA-PUT para la obtención de poblaciones de células germinales en diferentes estadios de su diferenciación. Se parte de la preparación rica en células intratubulares totales (CT) obtenida del epitelio seminífero adulto. Las diferencias de tamaño entre los tipos celulares permiten separarlas, mediante sedimentación a gravedad unitaria, en las siguientes fracciones celulares: SC, células de Sertoli; EP, espermatoцитos en paquiteno; ER, espermátidas redondas; ET, espermátidas tardías; CR, cuerpos residuales.

El filtrado de CT obtenido por la disgregación enzimática de 4 testículos adultos se cargó en un gradiente de 350 mL de albúmina de suero bovino (BSA) fracción V (Sigma Aldrich, A - 7906) de 2-4% en KHs, y se dejó sedimentar durante 3 horas a gravedad unitaria y a temperatura ambiente. Una vez transcurrido ese tiempo, se colectaron 90 fracciones de aproximadamente 3-4 mL cada una en tubos de ensayo a una velocidad de 3 mL/minuto en un colector de fracciones Pharmacia LKB FRAC-100®. Mediante reconocimiento de los diferentes tipos celulares por tamaño y morfología a través del microscopio óptico de

transmisión, se seleccionaron y combinaron las fracciones enriquecidas en SC, EP, ER, ET y CR. Las fracciones celulares enriquecidas se lavaron con medio KHS.

El foco central de estudio en esta tesis doctoral fueron los EP, encontrados frecuentemente en las fracciones 5 a 25; las ER, presentes en las fracciones 50 a 70 y las ET, que se colectan en las fracciones 70 a 80. En las fracciones 80-90 se concentran los CR, estructuras acelulares compuestas por material de desecho provenientes de las espermatidas más avanzadas en su diferenciación. La concentración celular por fracción se determinó por conteo, utilizando una cámara de Neubauer.

La pureza de las fracciones de las células aisladas se evaluó mediante microscopía de fluorescencia luego de la tinción nuclear con Hoechst 33342 (Sigma Aldrich, 14533) 5 μM (Reyes *et al.*, 1997) (ver Figura 1 y Tabla 1 en la sección Figuras y Tablas- Capítulo I). La viabilidad de las células se determinó por su capacidad de excluir la sonda fluorescente no permeable yoduro de propidio, como se detalla más adelante en esta sección.

3.4. Obtención de células de Sertoli

Para obtener cultivos de células de Sertoli (SC) libres de células germinales se siguieron procedimientos estándares (Karl y Griswold, 1990) utilizando testículos de animales prepúberes (ratas de 14-16 días postnatales). El tejido procedente de 2 testículos decapsulados fue incubado en 10 mL de *buffer* fosfato salino (PBS) (del inglés *Phosphate Buffer Saline*) 1X, esterilizado, pH 7.4, en presencia de colagenasa tipo II 0.5 mg/mL y digerido mediante agitación manual vigorosa a temperatura ambiente. Los túbulos se dejaron decantar durante 10 minutos y se retiró el medio sobrenadante conteniendo principalmente células extratubulares. Se hicieron 3 lavados con PBS 1X dejando decantar nuevamente los túbulos y descartando los sobrenadantes. El material decantado se resuspendió en 10 mL de medio DMEM/ F-12 libre de suero (Gibco®, 12400024; 1:1, v/v) y se pasó suavemente a través de una aguja 21G (0.8 mm de diámetro) varias veces para la disgregación de los fragmentos tubulares. La suspensión de células así obtenida se filtró a través de una malla de nylon de 70 μm y se colectó en un tubo estéril. Éste se centrifugó durante 10 minutos a 900 rpm, se descartó el sobrenadante y el *pellet* celular obtenido se resuspendió en 5 mL de medio DMEM/ F-12 libre de suero conteniendo penicilina (100 U/ mL) y estreptomina (100 U/ mL). La ausencia de suero permite evitar la proliferación de posibles células mioideas contaminantes. Las células fueron incubadas en dicho medio en placas de cultivo de 60 mm de diámetro durante 2 semanas a 37°C bajo atmósfera de 5% CO_2 / 95% aire. El medio se renovó cada dos días. Durante este periodo las SC alcanzan la confluencia y fagocitan las espermatogonias remanentes que inicialmente pudieran haber permanecido asociadas a ellas, obteniéndolas con un alto grado de pureza, lo cual se

corroboró como se detalla en Oresti *et al.*, 2013. Además, los cultivos primarios así obtenidos mostraban una alta expresión del gen *MCT4* que codifica para el transportador de monocarboxilatos 4, específico de las SC dentro del epitelio seminífero.

3.5. Testículos desprovistos de células germinales

A partir de ratas macho adultas, la exposición de sus testículos durante episodios cortos (15 minutos) a temperaturas moderadas (43°C), una única vez por día, repetida durante 5 días consecutivos, resulta, 2 semanas después, en un tejido testicular en el que sobreviven las células de Sertoli pero está desprovisto de la mayor parte de sus células germinales (Furland *et al.*, 2011) salvo espermatogonias. Seis semanas después del último de estos episodios de hipertermia moderada, a partir de estas espermatogonias, se encuentran en gran parte recuperadas las poblaciones de células espermatogénicas. En este trabajo empleamos este modelo experimental para observar la expresión (ARNm) *in vivo* de enzimas vinculadas a la biosíntesis de PUFA y VLCPUFA típicos de los lípidos de estas poblaciones.

Para ello, contando con el asesoramiento y colaboración de las Dras. N. Furland y J. Luquez, ratas macho de 3 meses de edad fueron sometidas a 5 episodios consecutivos, uno por día, de 15 minutos por día, de hipertermia moderada como se describe en Furland *et al.* (2011). La exposición a la hipertermia se localizó en el testículo, pues se realizó sumergiendo la parte caudal de los animales previamente anestesiados en un baño de agua termostatzado a 43°C. Ratas controles de la misma edad fueron tratados en todos los aspectos de la misma forma, excepto por la temperatura del baño (22-25°C). Luego del último episodio de hipertermia, los animales experimentales y controles volvieron a sus hábitats, donde permanecieron durante 2 y 6 semanas. Cumplidos esos tiempos, los animales se sacrificaron para obtener los testículos, desde los cuales, en el presente trabajo, extrajimos el ARNm para evaluar la expresión génica de las enzimas *Elovl2*, *Elovl4*, *Elovl5* y *Fa2h* mediante RT-qPCR como se describe en el **apartado 7** de la presente sección. Una parte de las muestras se destinó a observación histológica, por lo que fueron fijadas en formaldehído al 10% en *buffer* PBS, deshidratadas e incluidas en parafina. Se hicieron cortes de tejido de 3 μ m de espesor en micrótopo tipo Minot Leica®, que se tiñeron con hematoxilina-eosina (H-E) y se observaron en un microscopio óptico de campo claro con objetivos 20X y 40X.

4. OBTENCIÓN DE FRACCIONES DE MEMBRANAS DE CÉLULAS GERMINALES

Para obtener fracciones de membranas a partir de estas células en tres diferentes estadios de su diferenciación (EP, ER y ET) se compararon dos métodos: uno clásico, que incluye la presencia de detergente y otro libre de detergente. Ambos fueron objeto de una

amplia caracterización a fin de compararlos y decidir cuál era el más adecuado para ser aplicado a los lípidos.

4.1. Aislamiento de fracciones de membrana “resistentes a la solubilización en detergente” (DRM)

A partir de células germinales totales (CT), preparaciones conteniendo los dominios de membranas resistentes a la solubilización en detergente (**DRM**, del inglés *detergent-resistant membranes*) se obtuvieron mediante el ampliamente utilizado método descrito por Brown y Rose (1992) esquematizado en la **Figura 3A**. Luego de 2 lavados con 1 mL de medio KHs, las CT se lisaron durante 30 minutos a 4°C con el *buffer* de lisis TNE, pH 7.4, de la siguiente composición: Tris-HCl 50 mM, NaCl 70 mM y EDTA 5 mM con el agregado de Tritón X-100 (Sigma Aldrich, 9002-93-1) 1% en presencia de 15 µL de inhibidor de proteasas completo (Sigma Aldrich P-8340) por mL de *buffer* de lisis para evitar la degradación enzimática. Las células lisadas se homogeneizaron como se describe más adelante para el otro método. El lisado celular se mezcló con un volumen igual de sacarosa al 80% en TNE para obtener un **homogenado total (HT)** en *buffer* TNE con una proporción final de sacarosa al 40%, parte del cual se guardó para la extracción de lípidos y proteínas. Se cargaron 3 mL del HT en el fondo de tubos de ultracentrífuga de 12 mL, y se agregaron por encima, sucesivamente, 6 mL de sacarosa 36% y 3 mL de sacarosa 5%, formando así un gradiente discontinuo de sacarosa. Los tubos se centrifugaron durante 20 horas a 250000 g (34200 rpm) y 4°C en un rotor Beckman SW41 utilizando una ultracentrífuga Beckman Coulter Optima L-90K. De la interfase de sacarosa 5% / 36%, se recuperó una única banda correspondiente a la fracción conteniendo las membranas *resistentes* a la solubilización en detergente (**DRM**). La fracción que quedó por debajo de la anterior (aproximadamente 6 mL de sacarosa 36% y 3 mL de sacarosa 40%), conteniendo las membranas *solubles* en detergente (**DSM**, del inglés *detergent-soluble membranes*) y el *pellet (Pe)* insoluble también se colectaron con fines comparativos.

4.2. Aislamiento de fracciones de membranas por un método libre de detergente

Para este fin se empleó el protocolo descrito por Luria y colaboradores (2002). Éste se aplicó tanto a las células germinales totales (CT), como se esquematiza en la **Figura 3B**, como a cada una de las tres poblaciones de células espermatoogénicas a estudiar, esto es, a EP, ER y ET.

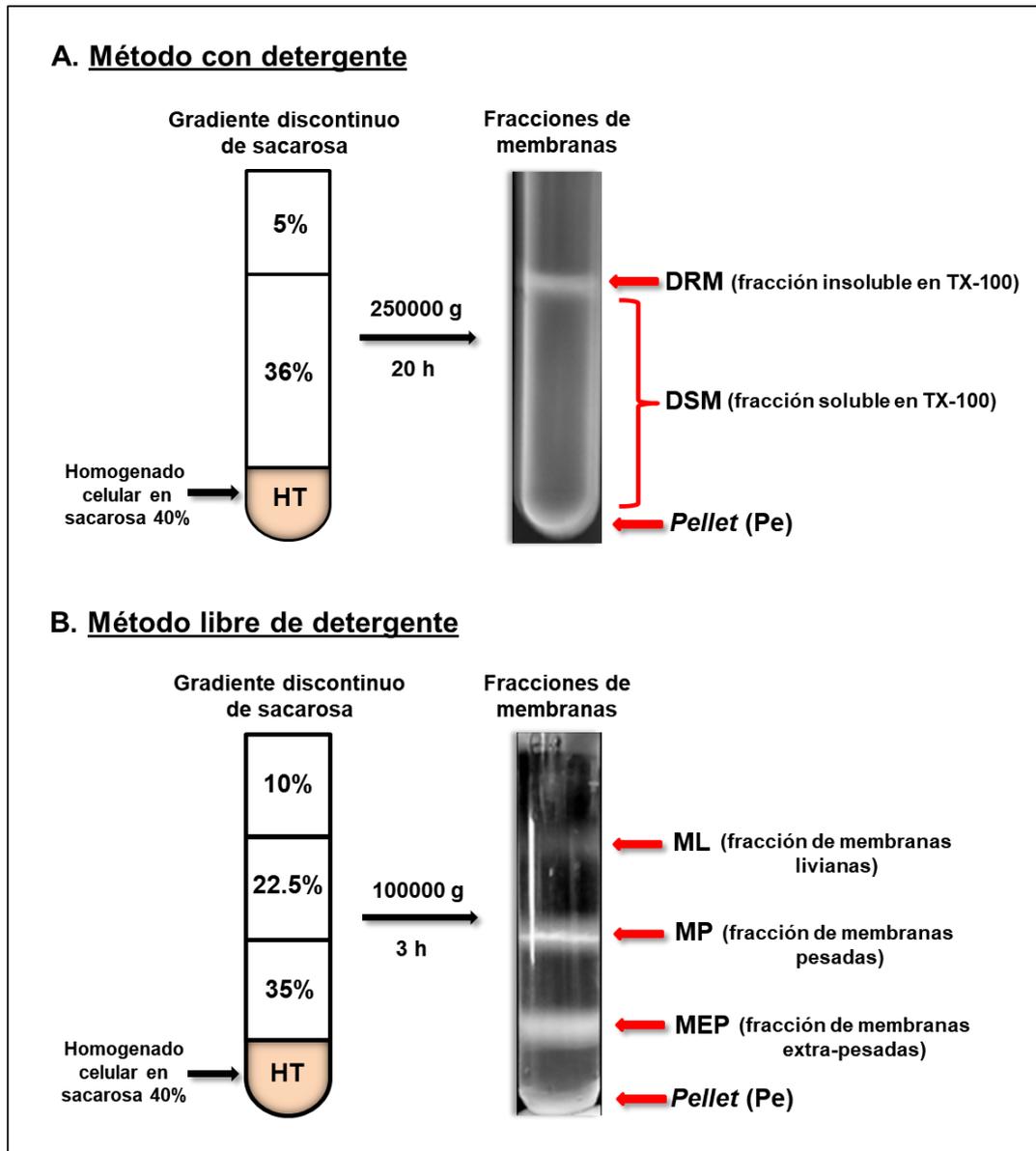


Figura 3. Aislamiento de fracciones de membranas a partir de un homogenado total (HT) de células germinales totales (CT) aisladas del epitelio seminífero de rata por cada uno de los procedimientos descritos, mediante ultracentrifugación en un gradiente discontinuo de sacarosa. En **(A)** se ilustra el método que utiliza detergente siguiendo el clásico protocolo descrito por Brown y Rose (1992), y en **(B)** se detallan las condiciones del método libre de detergente publicado por Luria y colaboradores (2002). En cada caso, el HT se obtuvo a partir de las mismas CT, lisadas con el mismo *buffer*, conteniendo (o no) el detergente Tritón X-100 (TX-100). Se indican las concentraciones de sacarosa y las bandas correspondientes a las diferentes fracciones de membranas obtenidas para cada método. Teniendo en cuenta su mayor resolución, y otras ventajas descritas en Resultados, el procedimiento ilustrado en **(B)** para CT se eligió para la obtención de fracciones de membrana livianas, pesadas y extra-pesadas a partir de las poblaciones de células espermatogénicas en distintos estadios de diferenciación.

- **Obtención de homogenados celulares**

Las CT, y los tres tipos celulares mencionados (aislados mediante el STA-PUT como ya se describió), se lavaron 2 veces con 1 mL de medio KHS. Inicialmente, el *pellet* celular

obtenido se trató de lisar durante 1 hora a 4°C en hielo con dos *buffers* diferentes: 1) TKM pH 7.4 compuesto por Tris-HCl 50 mM, KCl 25 mM y MgCl₂ 5 mM, y 2) TNE pH 7.4 de la misma composición que el empleado en el método anterior (salvo por la ausencia del detergente), en ambos casos en presencia de 15 µL de inhibidor completo de proteasas (Sigma Aldrich, P-8340) por mL de *buffer* de lisis. Si bien a simple vista no se detectaron diferencias en las bandas correspondientes a las fracciones de membranas, las observaciones cuantitativas iniciales mostraron que cuando se utilizaba TNE como *buffer* de lisis se conservaban mejor los lípidos (especialmente la esfingomiélin y los glicerofosfolípidos) (ver Figura 9 en Figuras y Tablas- Capítulo I), por lo que se decidió utilizar este último. Las células lisadas fueron homogeneizadas y pasadas repetidas veces a través de jeringa de tuberculina, manteniéndolas en el hielo y luego sometiéndolas a ultrasonido durante 3 minutos en un baño sonicador a 50 Hz a 4°C (Branson Sonifier B-220, Smithkline Co.) para favorecer al máximo la lisis celular. Al **homogenado total (HT)** obtenido se le agregó el mismo volumen de sacarosa 80% en TNE para alcanzar una concentración final de 40% de sacarosa.

- **Ultracentrifugación en gradientes de sacarosa**

Antes de fraccionarlo, parte del HT conteniendo membranas de cada tipo celular se reservó para la extracción de lípidos y proteínas con fines comparativos. Para formar un gradiente discontinuo de sacarosa, se cargaron 3 mL de cada homogenado celular (en sacarosa al 40%) en el fondo de tubos de ultracentrífuga *ultraclear* de 12 mL y se agregaron por encima y sucesivamente porciones de 3 mL de concentraciones decrecientes de sacarosa: 35%, 22.5% y 10%. Los tubos se centrifugaron durante 3 horas a 100000 g (28400 rpm) y 4°C en un rotor Beckman SW41 utilizando una ultracentrífuga Beckman Coulter Optima L-90K. Se obtuvieron 3 bandas, correspondientes a fracciones de membrana que se separaron sobre la base de sus diferencias de densidad. Éstas se denominaron como sigue: **membranas livianas (ML)** (interfase sacarosa 10- 22.5%), **membranas pesadas (MP)** (interfase sacarosa 22.5- 35%) y **membranas extra-pesadas (MEP)** (interfase sacarosa 35- 40%). En adición, se recuperó un *pellet* (**Pe**) del fondo de cada tubo.

- **Lavado de las fracciones de membranas aisladas**

Los HT conteniendo membranas sin fraccionar, y las fracciones de membrana ML, MP, y MEP obtenidas, tanto a partir de CT como de cada población celular en estudio, se colectaron por separado en tubos de ultracentrífuga de 4 mL y se lavaron con *buffer* TNE sin detergente para eliminar la sacarosa, pues ésta interfiere en el análisis lipídico y proteico. Para ello las muestras con las fracciones se sometieron a ultracentrifugación en un rotor Beckman 90Ti a 200000 g (54000 rpm) y 4°C durante 45 minutos utilizando una

ultracentrífuga Beckman Coulter Optima L-90K. Se descartó el sobrenadante, y los *pellets* de membranas resultantes fueron resuspendidos en 1 mL de *buffer* TNE. De allí, previo agregado de 3 μ L de inhibidor de proteasas completo (Sigma Aldrich, P-8340), se tomaron alícuotas de 200 μ L para la cuantificación y análisis de proteínas y para ensayos enzimáticos. La mayor parte (800 μ L) de las muestras se destinó al estudio de sus lípidos.

5. CARACTERIZACIÓN DE LAS FRACCIONES DE MEMBRANA

Para determinar la identidad de las fracciones de membrana aisladas a partir de las células germinales, luego de su separación por electroforesis, se evaluó la expresión de proteínas marcadoras específicas de diferentes dominios de membrana, mediante su inmunodetección con anticuerpos específicos.

5.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS- PAGE) y *Western blot* (WB)

- **Preparación de las muestras**

Antes de su separación y análisis, se determinó la concentración de proteínas de las alícuotas de HT y de las fracciones ML, MP y MEP de cada tipo celular que habían sido reservadas para tal fin (200 μ L de 1000 μ L) según se describe en el **punto 5.4** de esta sección. Para determinar la concentración de proteínas requerida para la electroforesis, las mencionadas alícuotas se desnaturalizaron agregando un volumen apropiado de *buffer* Laemmli 5X (Tris-HCl 1.5 M pH 6.8, glicerol 40%, β -mercaptoetanol 20%, SDS 8% y azul de bromofenol 2% como indicador del frente de corrida) en una proporción de 4:1 (muestra: Laemmli). Antes de su siembra en los geles, las muestras se incubaron durante 5 minutos en un baño a 100°C de acuerdo con el protocolo descrito por (Laemmli, 1970). Los lisados que no se sembraron enseguida se conservaron a -20°C hasta el momento de su siembra, y se incubaron durante 1 minuto en agua hirviendo previo a la misma.

- **Concentración de proteínas antes de su siembra**

En el caso de extractos proteicos de baja concentración (0.5- 0.9 μ g/ μ L), como fue el caso de la fracción de membranas livianas (ML), sus volúmenes resultaron ser demasiado grandes para su siembra en el gel. Para sortear este inconveniente, se aplicó el siguiente procedimiento que permite concentrar proteínas mediante precipitación de las mismas.

A partir de alícuotas de extractos proteicos conteniendo la cantidad específica de proteína que se deseaba precipitar, se hicieron particiones con diferentes volúmenes de solventes en relación al volumen de partida del extracto. Así, para cada 1 volumen de cada extracto proteico a precipitar, se agregó el equivalente a 4 volúmenes de metanol más 1 volumen de cloroformo y se agitó vigorosamente con vórtex obteniendo una única fase. Luego se hizo una partición en dos fases agregando 3 volúmenes de agua y se centrifugó

durante 1 minuto a 16000 g (13000 rpm) a temperatura ambiente. Se descartó la fase superior, conservando la banda proteica en la interfase. Esas proteínas quedaron suspendidas en una sola fase mediante el agregado de 3 volúmenes de metanol, y después de una agitación vigorosa se recuperaron en forma de un *pellet* proteico por centrifugación durante 2 minutos a 16000 g (13000 rpm) a temperatura ambiente. Luego de retirar el sobrenadante, el *pellet* conteniendo las proteínas se dejó secar al aire y se resuspendió en el volumen adecuado de *buffer* Laemmli 1X previo a la desnaturalización y siembra de las muestras.

En el caso del método de fraccionamiento de membranas por detergente, el presente procedimiento resultó ser además muy útil para eliminar posibles interferencias de la sacarosa en los pasos de desnaturalización y cuantificación de las proteínas extraídas de la fracción DSM. En este caso, las proteínas precipitadas se resuspendieron en 50 μ L de *buffer* de lisis TNE conteniendo 0.75 μ L de inhibidor de proteasas completo, de donde se tomaron alícuotas de 5 μ L para determinar el contenido proteico previo al agregado del *buffer* Laemmli 5X.

- **Electroforesis**

La separación de proteínas por peso molecular se realizó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato de sodio (**SDS-PAGE**, del inglés *sodium dodecyl sulfate- polyacrylamide gel electrophoresis*). El gel de resolución estaba formado por acrilamida al 10% ó al 12% (según la proteína de interés) y bisacrilamida 0.26% en Tris-HCl 375 mM pH 8.8 conteniendo SDS 0.1%, persulfato amónico 0.05% y TEMED 0.05%. El gel de *stacking* o de empaquetamiento estaba constituido por acrilamida 3.8% y bisacrilamida 0.1% en Tris- HCl 125 mM pH 6.8 conteniendo SDS, persulfato amónico y TEMED en las mismas concentraciones que para el gel de resolución. En este gel se sembraron cantidades equivalentes de proteínas (25 μ g/calle) provenientes de los lisados del HT y de las distintas fracciones de membrana, además de 10 μ L de marcadores preteñidos de peso molecular conocido.

La corrida electroforética se llevó a cabo en *buffer* de electroforesis de composición Tris 5mM, glicina 40 mM y SDS 0.2% (pH 8.3), a voltaje variable y amperaje constante de 20 mA durante aproximadamente 2 horas hasta observar la salida del indicador del frente de corrida en el extremo del gel opuesto al de siembra.

- **Transferencia de las proteínas y su inmunodetección**

Las bandas proteicas separadas por electroforesis se transfirieron desde los geles a membranas de polivinilideno difluoruro (PVDF) Immobilon (Millipore, Bedford, MA, USA) utilizando una cámara de transferencia (modelo Mini Trans-Blot cell electroblotter, BIO-RAD

Life Science Group, CA, USA) colocada dentro de una cuba de hielo. La transferencia se realizó durante 90 minutos a voltaje variable y amperaje constante de 250 mA. Las membranas de PVDF habían sido activadas previamente en metanol puro. El *buffer* de transferencia estaba compuesto por Tris 250 mM pH 8.3, glicina 1.92 M y SDS 0.5%.

A continuación, las membranas fueron bloqueadas por exposición a BSA (Sigma Aldrich, A - 7906) al 5% en *buffer* TBS-T [Tris-HCl 20 mM (pH 7.4), NaCl 100 mM, Tween 20 0.1% (p/v)] (TBS-T/BSA), durante 2 horas a temperatura ambiente y agitación constante. Después de tres lavados de 5 minutos cada uno con TBS-T, se procedió a incubar la membrana durante la noche a 4°C con el anticuerpo primario específico, diluido en la solución de bloqueo, y en agitación suave constante. Se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios policlonales de conejo para la detección de las proteínas de interés: anti-flotilina-1 (a una concentración 1:1000 en TBS-T/BSA; sc-25506), anti-caveolina-1 (1:1000; sc-894), anti-calnexina (1:1000; sc-11397) y anti-receptor de estrógeno acoplado a proteína G (anti-GPR30) (1:500; sc-48524), todos adquiridos en Santa Cruz Biotechnology, INC. (Santa Cruz, CA, USA), y el anticuerpo primario policlonal de ratón anti-receptor de transferrina (anti-TfR) (1:1000; H68.4, 13-6800) de Thermo Fisher Scientific (Rockford, IL, USA). El anticuerpo para caveolina fue gentilmente donado por la Dra. Lorena Milanesi, y el anti-TfR por el Dr. José Luis Daniotti.

Posteriormente las membranas fueron sometidas a tres lavados de 5 minutos cada uno con TBS-T para eliminar el exceso del anticuerpo primario, e incubadas durante 2 horas a temperatura ambiente con una dilución del anticuerpo secundario correspondiente conjugado con la enzima peroxidasa de rábano (HRP), diluido en solución de bloqueo (1:2000 en el caso del anti-inmunoglobulina de ratón sc-2005, usado para TfR, y 1:5000 del anti-inmunoglobulina de conejo sc-20049, usado para las demás proteínas en estudio, y ambos de Santa Cruz Biotechnology). Luego de 3 lavados de más de 5 minutos cada uno con TBS-T a temperatura ambiente, las membranas fueron incubadas finalmente con los reactivos de quimioluminiscencia del *kit* comercial Clarity™ Western ECL (Amersham Biosciences) y posteriormente expuestas a placas autorradiográficas (Kodak X-Omat AR) para visualizar las proteínas de interés. Para cuantificar las bandas inmunoreactivas, se utilizó el programa de análisis de imágenes Image J (Image J 1.47h, Wayne Rasband National Institute of Health, Bethesda, MD, USA).

5.2. Determinación del perfil proteico

Para obtener los perfiles proteicos de los HT de células y de las fracciones de membranas se resolvieron 20 µg de proteínas en geles de poliacrilamida 12% mediante SDS-PAGE. Previo a la siembra, cantidades conocidas de proteína de cada muestra se

concentraron mediante el procedimiento de precipitación antes descrito. Paralelamente a las muestras, se sembraron en los geles 10 μL de un estándar de pesos moleculares conocidos de origen comercial para estimar el tamaño de las bandas proteicas presentes en cada fracción. Una vez resueltas, las proteínas se visualizaron mediante tinción del gel con el colorante Comassie Blue.

5.3. Actividad de la 5' nucleotidasa

Para determinar el origen de las distintas fracciones de membrana aisladas con los dos procedimientos empleados, dado que el foco principal del estudio estaba puesto sobre las fracciones ML y MP provenientes de la membrana plasmática de las células, se midió la actividad de la 5' nucleotidasa, enzima considerada marcadora de la misma. Las mediciones se realizaron en el HT, en las fracciones DRM y DSM del método que emplea detergente, y en las fracciones ML, MP, MEP, y Pe del método libre de detergente, de acuerdo al protocolo descrito por Widnell y Unkeless (1968), resumido en la **Figura 4**. Este método mide la liberación de fosfato inorgánico (Pi) a partir del sustrato de la 5' nucleotidasa, adenosina monofosfato (AMP).

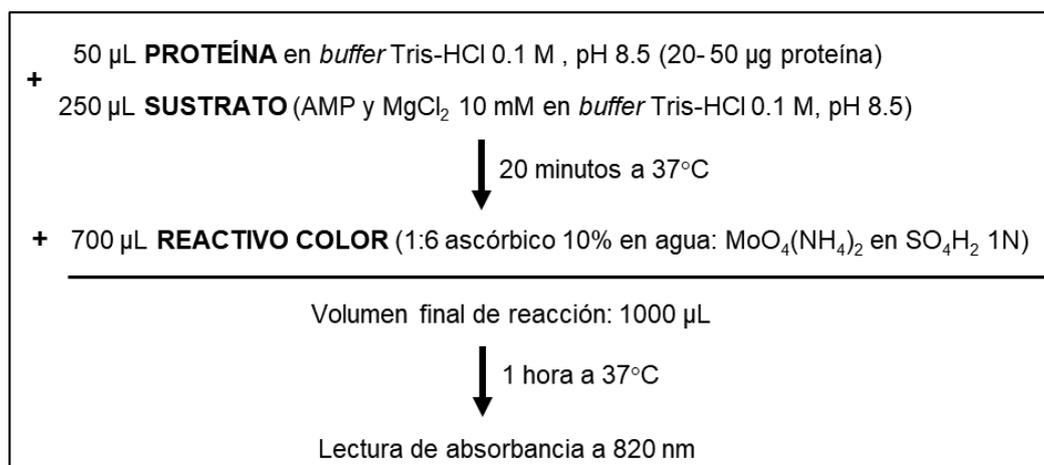


Figura 4. Protocolo para la determinación de la actividad de la 5' nucleotidasa según el método descrito por Widnell y Unkeless (1968).

De cada muestra se tomaron alícuotas de 20 μg de proteína, resuspendidas en el *buffer* Tris-HCl 0.1 M (pH 8.5) y se completó el volumen hasta 50 μL con este mismo *buffer*. Luego se agregaron 250 μL del sustrato (AMP 10 mM y MgCl_2 10 mM en *buffer* Tris-HCl 0.1 M, pH 8.5) y se incubó la mezcla por 20 minutos a 37°C con agitación suave. La reacción terminó con el agregado de 700 μL del reactivo de coloración (consistente en una parte de ácido ascórbico 10% en agua en 6 partes de molibdato de amonio 0.42% en ácido sulfúrico 1 N). El color, cuya intensidad es proporcional a la cantidad de Pi liberado, se desarrolló

incubando las muestras durante 1 hora a 37°C con agitación suave constante y la absorbancia se leyó en espectrofotómetro a 820 nm. Paralelamente se prepararon blancos y una curva estándar, utilizando concentraciones conocidas de una solución de 8 µg/mL de KH₂PO₄. Los resultados se presentan como actividad específica de la enzima (nmol Pi/mg proteína/minuto).

5.4. Determinación del contenido de proteínas

La cuantificación de la cantidad total de proteína en las muestras, ya sea para sembrar cantidades específicas en las electroforesis o para expresar resultados sobre la base del nivel de proteína en tejidos, células o membranas, se realizó utilizando el DC Protein Assay (BIO-RAD Life Science Group, Florida, CA, USA). La absorbancia de las muestras luego de la reacción se leyó en un espectrofotómetro Jasco V-630 a 750 nm. Se utilizó un estándar de BSA de 2 mg/mL en agua para construir las curvas de calibrado.

6. PROCEDIMIENTOS PREPARATIVOS Y ANALÍTICOS PARA EL ESTUDIO DE LOS LÍPIDOS

Los procedimientos que se describen a continuación se aplicaron tanto para muestras con lípidos no marcados como aquellas con lípidos marcados con [³H]. Todos tienen en común que se desarrollaron utilizando solventes orgánicos y agua de la mayor pureza disponible a fin de minimizar la interferencia de contaminantes en los análisis, y bajo atmósfera de nitrógeno (N₂) en la mayor parte de los pasos, a fin de preservar la integridad de los PUFA y VLCPUFA contenidos en los lípidos motivo del presente estudio.

6.1. Extracción de los lípidos

Para extraer los lípidos a partir de tejidos, células, homogenados o fracciones de membrana, las muestras se homogeneizaron en volúmenes conocidos de cloroformo: metanol 1:2 (v/v) (Bligh y Dyer, 1959) en un homogenizador tipo Potter-Elvehjem con pistón de Teflón® accionado con un motor eléctrico. Los homogenados se dejaron durante toda la noche a 4°C en dicho solvente. Luego se les agregó un volumen de cloroformo y 1.8 volúmenes de agua, alcanzando una proporción final de cloroformo: metanol: agua 2:2:1.8 (v/v). Los tubos se agitaron vigorosamente en vórtex y se centrifugaron durante 20 minutos a 2000 rpm en una centrífuga de mesa Beckman TJ-6 para separar las fases. Luego de separar la fase superior metanólica-acuosa, se recuperó la fase inferior clorofórmica conteniendo los lípidos. La interfase de proteínas desnaturalizadas se lavó dos veces con la misma mezcla de solventes, recuperando nuevamente la fase inferior y combinándola con el extracto clorofórmico previo para asegurar una buena recuperación de los lípidos. Los extractos lipídicos así obtenidos se llevaron a sequedad bajo corriente de N₂, se

resuspendieron en volúmenes conocidos de cloroformo: metanol (2:1, v/v) y se conservaron a -20°C hasta el momento de su uso.

Alícuotas de volúmenes específicos de los extractos fueron utilizadas para:

- Determinar el contenido de fósforo lipídico total.
- Determinar el contenido de colesterol.
- Separar los lípidos en diferentes clases mediante cromatografía en capa fina (**TLC**, del inglés *thin-layer chromatography*).
- Determinar la composición de diferentes clases de lípidos, tanto neutros como polares.
- En el caso de extractos de muestras con lípidos marcados, cuantificar la radioactividad total incorporada en ellos.

6.2. Determinación de fósforo lipídico

Los fosfolípidos (FL) totales recuperados de los tejidos, células o membranas, así como las distintas clases de FL una vez separadas por TLC, se cuantificaron por determinación de su contenido en fósforo mediante el método descrito por Rouser y colaboradores (1970). Éste se basa en liberar el fosfato inorgánico de los FL por digestión en presencia de ácido perclórico concentrado a alta temperatura, y hacer reaccionar dicho fosfato con molibdato de amonio (para formar fosfomolibdato de amonio) el cual es reducido por exposición al ácido ascórbico a 100°C. Tanto las alícuotas de extractos llevadas a sequedad, como la sílica gel conteniendo las clases de FL separadas por TLC se colocaron en tubos de vidrio, que se trataron similarmente. Se agregaron 260 µL de ácido perclórico por tubo y se colocó a éstos en un bloque de aluminio a 170°C durante 1 hora y media para la digestión ácida. Luego se adicionaron 920 µL de agua, 400 µL de molibdato de amonio al 1.25% (p/v) y finalmente 400 µL de ácido ascórbico al 5% (p/v) por tubo. En simultáneo se realizaron los correspondientes blancos y las curvas de calibrado utilizando tubos con concentraciones crecientes de KH_2PO_4 (8 µg/mL). El calentamiento de los reactantes en baño de agua durante 5 minutos a 100°C resultó en la formación de un complejo estable de color azul con un máximo de absorción a 800 nm. Las absorbancias se leyeron en espectrofotómetro Jasco. En el caso de los tubos que contenían sílica, luego de dejar la mayor parte de ésta en los tubos de reacción, se pasó el sobrenadante azul a tubos de centrífuga. Los remanentes de sílica se separaron por centrifugación a 3000 rpm durante unos 5 minutos y se tomaron cuidadosamente los sobrenadantes con pipeta Pasteur para medir su absorbancia. El contenido de FL se expresó en relación al contenido de *proteína* de cada fracción para cada tipo celular. Luego de separar los FL en clases y cuantificar el

fósforo de cada una de éstas, la *composición* en FL de las distintas muestras se expresó en porcentajes.

6.3. Determinación de colesterol

El colesterol (Col) contenido en las distintas muestras se cuantificó mediante un método enzimático-colorimétrico empleando el *kit* Colestat enzimático AA provisto por Laboratorios Wiener (Argentina). A partir de los extractos lipídicos, se tomaron alícuotas correspondientes a 5 µg de fósforo y se llevaron a sequedad bajo N₂. El lípido seco se resuspendió en 100 µL de alcohol isopropílico, se mezcló con 1 mL del reactivo y se incubó esta solución a temperatura ambiente durante 20 minutos, luego de lo cual se procedió a leer la absorbancia del producto coloreado en espectrofotómetro a 505 nm. Se realizaron curvas de calibrado utilizando un estándar de Col (2 g/L) provisto por el mismo *kit*. El contenido de Col, como el de FL, se expresó en relación al contenido de *proteína* de cada fracción para cada tipo celular.

6.4. Separación de lípidos en clases

- **Separación de fosfolípidos**

Para determinar la composición en FL, tanto de las células como de las fracciones de membranas, se utilizaron placas comerciales de alta performance (HPTLC) de 20 x 10 cm, pre-cubiertas con sílica gel (Merck), empleando cloroformo: metanol: ácido acético: agua (50:37.5:3.5:2, v/v/v/v) como sistema de solventes (Holub y Skeaff, 1987). Luego de su localización en las placas, las bandas conteniendo cada una de las clases lipídicas se rasparon a tubos de vidrio y se les determinó el contenido de fósforo por el método descrito anteriormente para los extractos lipídicos (Rouser *et al.*, 1970).

Por otra parte, para determinar en diferentes tipos celulares la incorporación de precursores radioactivos entre las clases lipídicas y sus respectivos ácidos grasos (como por ejemplo en esta tesis ácido araquidónico, o palmitato trititados) se aplicó TLC bidimensional, pues permite resolver adecuadamente a los FL, incluyendo a la SM, y sobre todo a los ácidos grasos libres (AGL), como se ilustra en la **Figura 5**. Para ello se sembraron alícuotas del extracto de lípidos totales sobre un ángulo de placas de 20 x 20 cm, preparadas en el laboratorio a partir de una suspensión de sílica gel H (Merck) en una solución de acetato de Mg²⁺ al 3%, secas y activadas durante media hora antes de su uso. Las corridas se desarrollaron utilizando dos fases móviles: la primera compuesta por cloroformo: metanol: amoníaco (65:25:5, v/v/v), y la segunda, corrida a 90° de la primera luego de evaporar completamente el primer solvente bajo N₂, compuesta por cloroformo: acetona: metanol: ácido acético: agua (30:40:10:10:4, v/v/v/v/v) (Rouser *et al.*, 1970). En algunos casos, dada la escasa masa pero alta marcación de algunos de los lípidos de interés, para localizarlos

adecuadamente sobre las placas se decidió añadir como *carrier* una cantidad conocida de un extracto lipídico no marcado del mismo origen (habitualmente lípidos totales de muestras de CT).

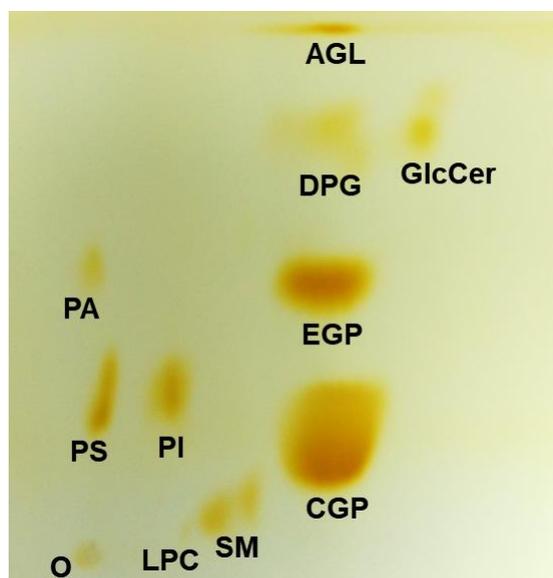


Figura 5. Cromatografía en capa fina bidimensional para la separación de clases de fosfolípidos. Se muestra una placa de sílica gel H en la que se desarrolló un extracto lipídico de células espermatozoides totales (CT) de rata. La muestra se sembró en el origen (O), se desarrolló con los 2 sistemas de solventes mencionados en el texto, y se reveló por exposición a vapores de yodo. LPC, lisofosfatidilcolina; SM, esfingomielina; CGP y EGP, glicerofosfolípidos de colina y etanolamina, respectivamente; PS, fosfatidilserina; PI, fosfatidilinositol; PA, ácido fosfatídico; DPG, difosfatidilglicerol; GlcCer, glucosilceramida; AGL, ácidos grasos libres.

- **Separación de lípidos neutros**

Para separar FL totales de lípidos neutros de interés, los extractos lipídicos de células o membranas se sembraron en placas preparadas en el laboratorio por suspensión de sílica gel G (Merck) en agua. Mientras los FL totales permanecen en el origen, las diferentes clases de lípidos neutros pueden resolverse con distintas mezclas de solventes.

Como eran de especial interés las Cer, para resolverlas adecuadamente se emplearon para la TLC dos sistemas de solventes, desarrollados en este caso en forma sucesiva. El primero, cloroformo: metanol: amoníaco (90:10:2, v/v/v), desarrollado hasta la mitad de las placas, asegura una buena resolución de las subclases no hidroxiladas e hidroxiladas de Cer. El segundo, conteniendo distintas proporciones de hexano y éter, corrido hasta el frente de las placas, permite resolver otros lípidos neutros de interés. En el ejemplo mostrado en la **Figura 6**, después de secar las placas, para esta segunda corrida se empleó hexano: éter etílico (80:20, v/v). Utilizando esta combinación de solventes para el caso de las muestras de fracciones de membranas obtenidas de CT, las Cer aparecen en forma de dos bandas

bien definidas: una superior correspondiente a la subclase de Cer que contiene ácidos grasos no hidroxilados (de distinto largo de cadena incluyendo a los VLCPUFA) y otra inferior correspondiente a las Cer que contienen ácidos grasos 2-hidroxilados (HO-Cer). También se obtuvo una separación aceptable entre colesterol libre (Col), diacilgliceroles (DAG), ácidos grasos libres (AGL), triacilgliceroles (TAG), alquil-diacilglicéridos (ADG), y ésteres de colesterol (EC) (Fig. 6). En el presente trabajo, este sistema cromatográfico en dos pasos se aplicó tanto con fines preparativos para separar las Cer de las membranas celulares y analizar sus ácidos grasos, como con fines analíticos, en los experimentos de incorporación de precursores radioactivos, para separar lípidos en clases y determinar la marca incorporada en ellos.

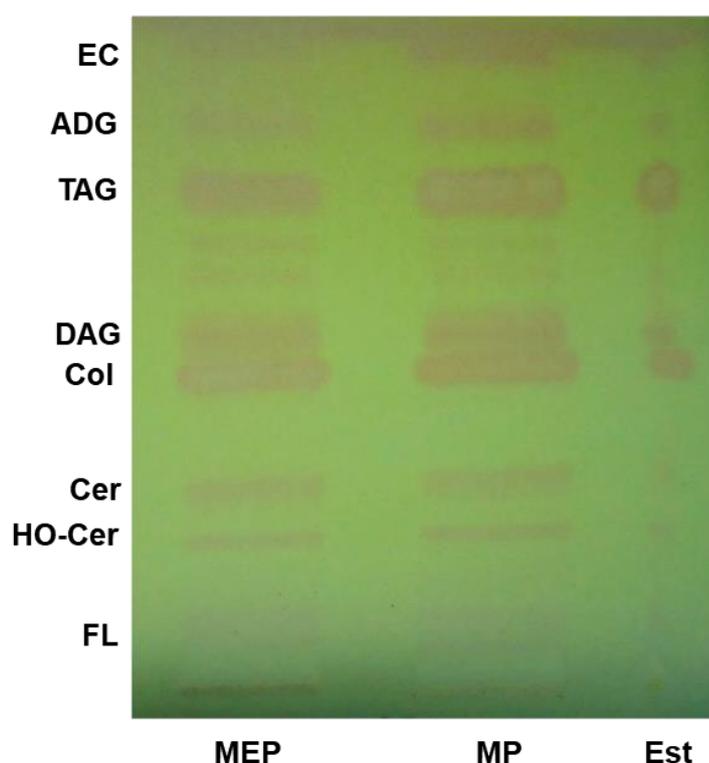


Figura 6. Cromatografía en capa fina monodimensional para la separación de clases de lípidos neutros. Se muestra una placa de sílica G preparativa en la que se sembraron 100 μ g de fósforo lipídico de las fracciones de membranas MEP y MP obtenidas de células espermatogénicas totales (CT). A la derecha se colocó una alícuota de un extracto lipídico de dichas CT antes de su fraccionamiento (Est). Los lípidos se resolvieron con los 2 sistemas de solventes mencionados en el texto, y se revelaron bajo luz UV luego de rociar con diclorofluoresceína. FL, fosfolípidos; HO-Cer, ceramidas con VLCPUFA 2-hidroxilados; Cer, ceramidas; Col, colesterol; DAG, diacilgliceroles; TAG, triacilgliceroles; ADG, alquil-diacilglicéridos; EC, ésteres de colesterol.

Los lípidos polares que permanecen en el origen de las placas (mayoritariamente FL) pueden recuperarse por elución cuantitativa desde la sílica como se describe más adelante y utilizarse para estudios ulteriores (por ej. separación preparativa de SM y/ o de clases o subclases de los GPL de interés).

- **Separación de esfingomielinas**

Para separar la SM del resto de los FL con fines preparativos, éstos últimos pueden provenir, o bien de un extracto lipídico directo o bien de los FL eluidos desde el origen de las placas de lípidos neutros como recién se menciona. En este estudio, para obtener cantidades aceptables de SM, se sembraron FL en placas de sílica gel H (20 x 20 cm) y se corrieron en una dimensión empleando cloroformo: metanol: amoníaco (65:25:5, v/v/v). Tal como ocurre con la Cer, la SM de células germinales (por las características únicas de sus ácidos grasos) también tiende a separarse en dos bandas (**Figura 7**), la superior enriquecida en especies con VLCPUFA no hidroxilados y la inferior conteniendo las especies con ácidos grasos 2-hidroxilados. Sin embargo, dada la alta polaridad que le confiere la cabeza polar, esta separación es bastante más difícil para la SM que para la Cer, en especial cuando se analizan muestras de SM que además de VLCPUFA contienen AG saturados, en especial 16:0. Estas últimas tienden a co-migrar con las SM que contienen 2-hidroxi VLCPUFA.

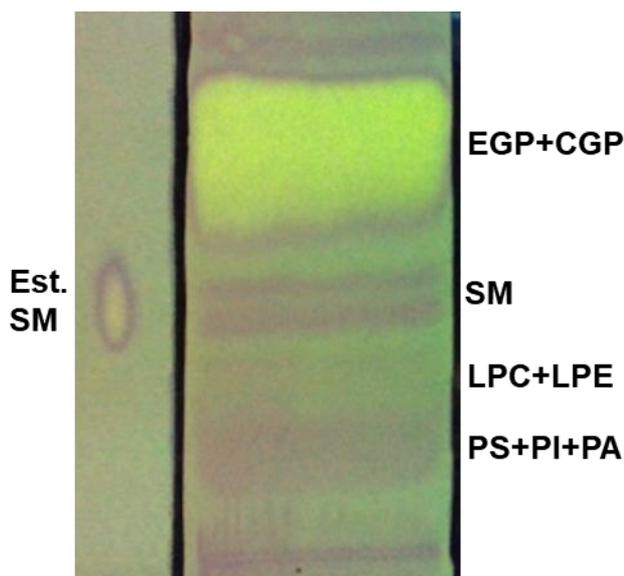


Figura 7. Cromatografía en capa fina preparativa para la resolución de esfingomielina (SM) de células espermatogénicas. Se muestra una placa preparativa de sílica gel H donde se sembró un extracto lipídico de CT, con cloroformo:metanol:amoníaco (65:25:5 v/v/v), revelada bajo luz UV luego de rociar con diclorofluoresceína. Las abreviaturas se corresponden con las definidas en la Fig. 5. LPE, lisofosfatidiletanolamina.

- **Recuperación de los lípidos luego de su separación**

Para localizar los lípidos sobre las placas cromatográficas, cuando el objetivo fue identificar clases lipídicas o realizar determinaciones analíticas como por ej., cuantificación de fósforo lipídico, las placas se expusieron a vapores de yodo (Fig. 5). Cuando el objetivo fue aislarlos para análisis ulteriores, como por ej., para determinar su composición de ácidos grasos, las placas se rociaron con 2',7'-diclorofluoresceína (DCF) (Sigma Aldrich, D6665) al

0.05% en metanol seguido de inspección bajo luz UV (Figs. 6 y 7). Para identificar los lípidos separados en las distintas TLC, habitualmente se sembraron paralelamente en las placas lípidos de referencia.

Luego de su resolución preparativa, las bandas conteniendo los lípidos de interés se rasparon y transfirieron a tubos de vidrio, luego de lo cual los lípidos se extrajeron de la sílica mediante 3 eluciones sucesivas con una mezcla de cloroformo: metanol: agua (5:5:1, v/v/v), agitación y posterior centrifugación a 2000 rpm durante 5 minutos. Al volumen de elución final se le agregó agua (0.4 mL por cada 1 mL de eluido) y se agitó vigorosamente, con lo que se formaron 2 fases que se separaron netamente al centrifugar a 2000 rpm por 5 minutos. Luego de separar la fase superior acuosa, se recuperó la fase inferior clorofórmica conteniendo los lípidos, la cual se llevó a sequedad por evaporación bajo corriente de N₂. Los lípidos se concentraron en el fondo de los tubos mediante lavados de las paredes con cloroformo: metanol 2:1 (v/v) y evaporación bajo N₂.

- **Purificación de esfingolípidos antes de su análisis**

Como es sabido, los ácidos grasos unidos por enlace amida son estables al tratamiento alcalino suave, mientras los unidos por enlace éster son lábiles. Es por ello que una vez separadas, eluidas y llevadas a sequedad bajo N₂, las muestras conteniendo SM y Cer provenientes del tejido testicular de rata, sus células y sus membranas, se sometieron a un tratamiento alcalino suave, consistente en el agregado de una solución de NaOH 0.5 N en metanol, seguido de incubación durante 10 minutos a 50°C bajo N₂ (Kates, 1972, con modificaciones). Al finalizar éste, se agregó un volumen igual de cloroformo, se neutralizó el álcali con HCl 0.5 N utilizando indicador, y luego de agitar y centrifugar se recuperó la fase inferior clorofórmica conteniendo los SL en estudio. Ésta se llevó de inmediato a sequedad y se cromatografió nuevamente. Este procedimiento, si bien es laborioso, asegura que se metanolicen los AG unidos a lípidos a través de enlaces éster que pudieran haber co-migrado con los SL de interés en la primera cromatografía, lo que permite que se separen de éstos últimos en la segunda. En el caso de los experimentos en que se incorporaron AG marcados con [³H] a los lípidos de las células, este paso es importante para asegurar que la radioactividad que se detecte en SM y Cer corresponda únicamente a estos lípidos.

6.5. Análisis de los ácidos grasos de los lípidos

Para estudiar la composición en AG de lípidos de tejidos, células o membranas, antes o después de su separación en clases, así como para cuantificar las clases o subclases lipídicas una vez separadas sobre la base de sus AG, éstos se convirtieron en metil ésteres (ME), los cuales se purificaron mediante TLC y se analizaron mediante cromatografía en fase gaseosa (GC, del inglés *gas chromatography*).

- **Metanólisis de glicerofosfolípidos y de esfingolípidos**

Luego de separar los FL totales en sus clases principales a partir de los extractos lipídicos por TLC, éstas se eluyeron de la sílica, se secaron bajo N₂ y se sometieron a tratamiento alcalino suave como se describió antes para la obtención de ME a partir de los AG de los glicerofosfolípidos totales (GPL) (Kates, 1972, con modificaciones). En presencia de metanol en medio alcalino, los AG unidos por enlaces *ésteres* al glicerol de los GPL, glicerolípidos neutros o ésteres de colesterol, se convierten en ME, que se recuperaron para su purificación y análisis. Como ya se dijo, por ser las uniones *amidas* más estables que las uniones *ésteres* ello no afecta a los ácidos grasos unidos a la esfingosina en el caso de los esfingolípidos. Para obtener ME a partir de éstos últimos se utilizó metanólisis en medio ácido, como se explica a continuación para la SM y la Cer.

Una vez aisladas y purificadas como se explica en el apartado anterior (6.4) las SM y Cer se transfirieron a tubos con tapa a rosca con cubierta interna de Teflon[®], se secaron y se mantuvieron a 45°C durante la noche en presencia de metanol *anhidro* conteniendo un 2% de H₂SO₄ bajo atmósfera de N₂ (Christie, 2012) en los tubos cerrados. Los ME así obtenidos, estando en solución metanólica, se extrajeron mediante partición, agregando 1 volumen de cloroformo y 1 volumen de agua. Luego de agitar y separar las fases mediante centrifugación, la fase inferior clorofórmica conteniendo los ME se llevó rápidamente a sequedad bajo N₂ y se retomó con éter.

- **Purificación de metil ésteres no hidroxilados y 2-hidroxilados**

La purificación de los ME obtenidos por metanólisis alcalina o ácida es importante 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, especialmente cuando las muestras son pequeñas. Para ello, las muestras con ME se sometieron a TLC utilizando placas de sílica gel G previamente lavadas con metanol: éter 75:25 (v/v).

Las bandas de ME de ácidos grasos *no hidroxilados* se separaron utilizando hexano:éter (95:5, v/v) como solvente ($R_f \approx 0.5$), se localizaron bajo luz UV luego de rociar

con DCF, se rasparon y se eluyeron de la sílica por partición en un sistema de dos fases entre agua, metanol y hexano (1:1:1 v/v/v). Luego de agitar y centrifugar durante 5 minutos a 2000 rpm, se recuperó la fase superior hexánica conteniendo los ME en viales de vidrio. Se realizaron en total 3 extracciones sucesivas con hexano, agitando y centrifugando cada vez, las cuales se combinaron, se secaron bajo N₂, se concentraron en la parte inferior de los tubos, y se resuspendieron, ya sea en volúmenes conocidos de hexano para su conservación, o bien en volúmenes pequeños de disulfuro de carbono para la inyección de alícuotas en el cromatógrafo.

Las bandas de ME de ácidos grasos 2-hidroxiados (HO-ME), debido a la mayor polaridad conferida por el grupo 2-hidroxilo, se purificaron por TLC utilizando hexano: éter 80:20 (v/v). Se eluyeron de la sílica mediante extracciones con cloroformo:metanol:agua, 5:5:1, en volumen. Por cada volumen del eluido final, se agregaron 4 volúmenes de agua. Luego de la partición, se recuperó la fase clorofórmica, que se llevó a sequedad bajo N₂ en tubos cónicos. Previo a su estudio por GC, los HO-ME así purificados se convirtieron en O-trimetil-silil-derivados (O-TMS). Para esta derivatización se adaptó el procedimiento descrito por (Ramstedt *et al.*, 1999) para el análisis de bases esfingoideas. Los HO-ME secos se disolvieron en 50 µL de hexano y 100 µL de una mezcla de bis-trimetilsilil-trifluoroacetamida (BSTFA) + 5% de trimetilclorosilano (TMCS). Los tubos, gaseados con N₂ y cerrados herméticamente, se expusieron durante la noche a 45°C. Los reactantes se evaporaron bajo N₂, los TMS-derivados de los HO-ME se redisolviaron en volúmenes conocidos de hexano, y se inyectaron alícuotas de esta solución en el cromatógrafo.

- **Análisis cualitativo y cuantitativo de ácidos grasos**

Para los análisis de AG por GC se contó con un cromatógrafo Varian 3700 provisto de 2 columnas de vidrio (2 m de longitud x 2 mm de diámetro) empaquetadas con una fase estacionaria polar, 10% SP2330 (Supelco, CA, USA), y se empleó N₂ como gas portador (a un flujo de 30 mL/ minuto). 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 de 220°C y 230°C, respectivamente.

Las separaciones se realizaron sometiendo el horno de las columnas a gradientes de temperatura, con incrementos lineales de 5°C por minuto. En el caso de los ME de ácidos grasos no hidroxiados, las temperaturas inicial y final de dichos gradientes fueron de 150°C y 230°C, respectivamente, mientras que para los TMS-derivados de los HO-ME las correspondientes temperaturas fueron 193°C y 240°C, respectivamente. La temperatura final se mantuvo constante durante el tiempo necesario para permitir la elución completa

desde la columna de todos los ME componentes de las muestras (unos 45 minutos en el caso de los VLCPUFA).

La identificación de los AG por GC se hizo comparando los tiempos de retención de los ME en estudio con los de estándares conocidos. Para el análisis cuantitativo se utilizó el método del estándar interno, incorporando a las muestras de ME no hidroxilados o 2-hidroxilados, generalmente antes del paso de metanólisis, cantidades conocidas de metil-heneicosanoato (21:0) o metil-hidroxi-metil-lignocerato (HO-24:0) respectivamente. La cuantificación se realizó por integración electrónica (Varian Chromatography Workstation, Version 4.51).

6.6. Análisis de especies moleculares de esfingomielinas y ceramidas

Las grandes diferencias existentes tanto en las cantidades como en la composición de AG de estos dos SL entre los diferentes tipos celulares, y sobre todo entre las *fracciones de membrana* obtenidas a partir de ellos en el Capítulo I, impidieron su comparación sobre la misma base utilizando análisis clásicos basados en GC. Es por ello que para el caso de las SM y Cer de fracciones de membrana se utilizó espectrometría de masas de desorción/ionización mediante láser asistida por matriz- tiempo de vuelo (**MALDI-TOF/MS**, del inglés *matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry*).

Los análisis se llevaron a cabo en el LANAIS PROEM-CONICET (Buenos Aires, Argentina) mediante un espectrómetro de masas 4800 MALDI TOF/TOF Plus (AB-Sciex), utilizando como matriz ácido 2,5- dihidroxibenzoico (DHB) 20 mg/ mL disuelto en metanol: agua: TFA (90:0.1:10 v/v/v) y saturado con sulfato de amonio 100 mM. Alícuotas de 10 μ L de las muestras de SM y de Cer totales (entre 1-5 μ g del SL según el caso), recuperadas de las fracciones de membrana (aisladas mediante TLC y purificadas como se describió anteriormente), fueron acidificadas con 1 μ L de ácido trifluoroacético (TFA) 0.1% y 1 μ L de esta solución resultante se mezcló con 1 μ L de matriz. Se sembró en la placa MALDI 1 μ L de la mezcla muestra: matriz. Previamente se utilizaron muestras de SM y Cer conteniendo VLCPUFA normales y 2-hidroxilados, separados y purificados a partir de células totales, para la optimización de los parámetros de MALDI-TOF/MS. Los espectros fueron adquiridos en el modo reflectón de detección de iones positivos mediante un láser de neodimio YAG (ND: YAG) (355 nm) con intensidad 6700. Todos los datos de los espectros de masa fueron adquiridos y analizados utilizando el *software* MALDI-MS Data Explorer®.

6.7. Medición de la radioactividad

Para determinar la radioactividad de los lípidos marcados con [3 H] con los que trabajamos en esta tesis (Capítulos II y III), se utilizó conteo por centelleo líquido (LSC). Las muestras marcadas a medir, ya sea las presentes en los medios de cultivo, en los extractos

lipídicos, en las fases acuosa-metanólica o clorofórmica luego de las particiones, o luego de haber sido separados en clases o especies por TLC (esto es, sobre sílica), se colocaron dentro de viales de vidrio, se agregaron 200 μ L de agua (con el fin de desactivar la adsorción de los lípidos al vidrio, o a la sílica cuando la hubiera), y se agregaron 4 mL del líquido de centelleo. Éste consistió en Preblended Dry Fluor 2a70 al 4% (PPO 98% y bis-MSB 2%, Research Products International Corp., Mt. Prospect, IL, USA) disuelto en una mezcla de 4 partes de tolueno y una parte del detergente Arkopal N-100 (4:1, v/v) (ALSI Química Sanitaria, La Plata, ARG). El conteo de la radioactividad se realizó utilizando un contador de centelleo líquido Wallak Oy modelo 1214 Rackbeta.

7. ESTUDIOS SOBRE LA EXPRESIÓN DE GENES A NIVEL ARNm

7.1. Extracción de ARN

El ARN total fue extraído del tejido testicular, de otros tejidos elegidos como controles, de los túbulos seminíferos previo a su fraccionamiento celular, y de las distintas poblaciones celulares aisladas a partir de dichos túbulos. Para ello se empleó el reactivo TRIzol[®] (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Para favorecer la extracción, los tejidos y las células fueron homogeneizados con el reactivo utilizando un disruptor previamente descontaminado. El material insoluble se removió por centrifugación a 12000 g a 4°C por 10 minutos. Luego del tratamiento con TRIzol[®], se realizó una partición de fases mediante el agregado de cloroformo: la fase acuosa clara superior conteniendo el ARN se recuperó, mientras que se descartó la fase orgánica roja inferior (conteniendo ADN y proteínas). El ARN se precipitó de la fase acuosa superior con isopropanol y posteriormente se lavó con etanol 80% (v/v) para remover impurezas. Finalmente, el ARN total aislado se resuspendió en 40 μ L de agua libre de ribonucleasas (RNasas) atemperada a 58°C y se determinó su concentración mediante la lectura de la absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro PicoDrop. La pureza, determinada mediante la relación entre las absorbancias a 260 y 280 nm, varió entre 1.75 a 1.95. En todos los casos se tomaron las precauciones necesarias a fin de evitar contaminaciones con RNasas y las muestras conteniendo ARN se conservaron a -80°C hasta el momento de su utilización para minimizar su degradación.

7.2. Transcripción reversa (RT)

El ARN extraído fue utilizado para sintetizar el ADN complementario (ADNc) de simple hebra empleando la enzima transcriptasa reversa del virus Moloney de la leucemia murina (**M-MLV RT**, del inglés *Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase*). A partir de 2 μ g de ARN total de cada muestra se realizó la reacción de retrotranscripción en un volumen final de 25 μ L completado con agua libre de RNasas y conteniendo 1 μ g de

Random Primers hexamers (Biodynamics), *buffer* de reacción M-MLV RT 1X (Promega), 0.5 mM de cada uno de los desoxirribonucleótidos (**dNTPs**, del inglés *desoxynucleotide triphosphates*), 25 UI de inhibidor de RNasas (Promega), y 200 UI de la enzima M-MLV RT (Promega), según las indicaciones del fabricante. La reacción fue incubada a 37°C durante 1 hora y el ADNc obtenido se conservó a -20 °C hasta su uso.

7.3. PCR convencional (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa (**PCR**, del inglés *polymerase chain reaction*) convencional o de punto final se utilizó para detectar la expresión de los transcritos de los genes codificantes de la familia de las Elovls en los túbulos seminíferos y en las células aisladas a partir de ellos. Esta reacción permite amplificar fragmentos de interés del ADN utilizando un par de cebadores (en inglés, *primers*) específicos por acción de una ADN polimerasa termoestable.

Para las reacciones de PCR, en un volumen final de 20 µL se incubaron 3 µL de la solución de ADNc en presencia de 1 µL de Taq ADN polimerasa (2 UI) (nombrada de esta forma debido a que es producida por la bacteria termófila *Thermus aquaticus*), 0.2 mM de cada uno de los dNTPs, y 0.25 µM de los pares de *primers* (directo y reverso) en *buffer* de reacción 1X. Los pares de *primers* diseñados para amplificar específicamente los genes *Elovls* (*Elov1* a *Elov17*) de rata se encuentran listados en la **Tabla 1**. Las muestras fueron desnaturalizadas a 94°C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos de amplificación que consistían en: desnaturalización a 94°C por 30 segundos, apareamiento de los *primers* a temperaturas específicas para cada par por 30 segundos, y pasos de extensión a 72°C, por 30 segundos y un paso de extensión final por 10 minutos.

Tabla 1. Secuencias (5´- 3´) de los pares de *primers* utilizados para la amplificación de ADNc mediante RT-PCR convencional.

Gen	Directo	Reverso	Temperatura de fusión (°C)
<i>Elov1</i>	CTCACTGCACATCAGCCAATA	GAGTCTGGTCATGGGTGTAG	57.5
<i>Elov2</i>	CAGCACACAGGCACCAGG	GACTTCAGTGGCTCTCACGG	57.5
<i>Elov3</i>	CAAAGTGAAGCATCCCAACAT	GGTTGTCATAGCTTCCTGCAA	54
<i>Elov4</i>	GGTTCAGTTCCATGTGACCAT	TCTGTTGCCCTGAACTTTTA	56
<i>Elov5</i>	ACCACCATGCCACTATGCT	GTGTCCATTGACGGCAGT	55
<i>Elov6</i>	GCTGATCTTCCTGCACTGGTA	CGTGATGACCCTGAGCTATGT	57.5
<i>Elov7</i>	GGGACCAGCCTACCAGAAGTA	TCAAGGAAGGCAAGATAGCAG	57.5
<i>β-actina</i>	ATGGATGACGATATCGCTG	ATGAGGTAGTCTGTCCAGG	58

Las muestras amplificadas fueron mezcladas con el indicador del frente de corrida *Blue/Orange 6X* (Promega, G1881), en una proporción muestra ADNc: colorante de 5:1, y se sembraron en un gel de agarosa 1.5% preparado con *buffer* TAE 1X pH 8.3 (de composición

Tris acetato 40 mM, EDTA 1 mM) conteniendo 2.5% de bromuro de etidio. También se sembraron 10 μ L del marcador de peso molecular de ADN de 100 pares de bases *CienMarker* (Biodynamics, B040-50). Los fragmentos de ADNc amplificados se resolvieron por tamaño, mediante electroforesis del gel en *buffer* TAE 1X a 100 V durante 30 minutos y se visualizaron bajo transiluminador UV. En aquellas muestras que expresan el transcripto, se observa una banda correspondiente al tamaño del producto amplificado en esas condiciones particulares.

7.4. PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR)

Esta técnica se aplicó para detectar cambios cuantitativos en la expresión de los genes codificantes de *Elovl2*, *Elovl4*, *Elovl5* y de *Fa2h* en testículos de rata durante el desarrollo postnatal, en testículos de rata adulta que habían sido previamente sometidos a hipertermia, y en las distintas células aisladas a partir del epitelio seminífero. La qPCR permite cuantificar el producto de la amplificación del ADN al final de cada ciclo. Para ello se utiliza un fluoróforo que se une al ADN de doble hebra y que al ser excitado a la longitud de onda apropiada produce fluorescencia que puede ser medida por un termociclador apto para qPCR.

Los ADNc (2.5 μ L) fueron amplificados en un volumen final de reacción de 10 μ L utilizando el KAPA SYBR® FAST qPCR Kit Master Mix Universal (Kapa Biosystems) (5 μ L) o de 12 μ L utilizando el SensiFAST SYBR® No-Rox (BioSystems, Argentina) (6 μ L) – ambos kits comerciales compuestos por Taq ADN Polimerasa, dNTPs, Mg^{2+} , conservantes, *buffer* y el fluorocromo verde (en este caso SYBR® Green I) - y una concentración de 0.20 μ M de cada *primer* para el gen de interés. Las secuencias de los *primers* directo y reverso para la amplificación específica de los genes *Elovl2*, *Elovl4*, *Elovl5* y *Fa2h* de rata se encuentran listados en la **Tabla 2**. Fueron diseñados mediante el *software* Primer3 y adquiridos en Invitrogen Life Technologies.

Tabla 2. Secuencias (5´- 3´) de los pares de *primers* utilizados para qRT-PCR.

Gen	Directo	Reverso	Temperatura de fusión (°C)
<i>Elovl2</i>	CGGAATCACACTTCTTCTGC	CACTGCAAGTTGTAGCCTCCT	58
<i>Elovl4</i>	GGTGGATTGGAATCAAGTGG	TACCGCTTCCACCAAAGGTA	58
<i>Elovl5</i>	GAGGCATCCTGGTGGTGTAT	ACACACCTGTCACCAACTCATAG	58
<i>Fa2h</i>	AGTACTATGTGGGCGAACTGC	CAATAGCAGCATCTGTCTTCTGA	58
<i>β-actina</i>	AAGGCCAACCGTGAAAAGAT	ACCAGAGGCATACAGGGACA	58
<i>Agps</i>	CCGAGTACCAATGAGTGCAA	CCATCCATTCCATTTATAAGTT	58
<i>Hprt</i>	CTCATGGACTGATTATGGACAGGAC	GCAGGTCAGCAAAGAACTTATAGCC	58
<i>Pgk1</i>	GCAAAGACTGGCCAAGCTAC	GCCTCAGCATATTTCTTACTGCT	58
<i>Tbp</i>	TGGGATTGTACCACAGCTCCA	CTCATGATGACTGCAGCAAACC	58

Las condiciones de la qPCR utilizadas fueron las siguientes: 40 ciclos de desnaturalización a 94°C por 20 segundos, apareamiento y extensión a 58°C por 30 segundos y un paso de extensión final a 72°C por 30 segundos. El equipo termociclador utilizado fue el Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Australia).

7.5. Validación de la qPCR y análisis de datos

Al final de la fase de amplificación, la especificidad de los productos de reacción, así como la ausencia de dímeros de *primers* se confirmaron mediante el análisis de las correspondientes curvas de *melting*. Además se realizó electroforesis en gel de agarosa (1%) a 50 V durante 1 hora para confirmar el tamaño de los amplicones obtenidos (ver Figura 3 de la sección Figuras y Tablas- Capítulo II), siguiendo el procedimiento ya explicado para la PCR convencional.

En todas las corridas de qPCR se realizaron los respectivos controles negativos NTC (del inglés *no template control*) reemplazando el ADNc por agua libre de RNasas para detectar posibles contaminantes y formación de productos indeseados. Además, para asegurar que la amplificación corresponde al ADNc retrotranscripto, se confirmó la ausencia de contaminación con ADN genómico en el ARN extraído de cada muestra mediante qPCR de controles negativos No-RT, en los cuales el ADNc es reemplazado por el respectivo ARN. Valores elevados de Cq (ausencia de expresión) para todos los genes y muestras analizados en los controles No-RT validan las amplificaciones detectadas en presencia del ADNc.

La comparación de los niveles del ARNm de los genes en estudio entre las diferentes muestras y tratamientos se realizó mediante la normalización con respecto a la expresión de genes de referencia validados como controles internos de expresión estable. Para ello, los valores crudos de Cq (del inglés *quantification cycle*) de los genes de interés (*Elov2*, *Elov4*, *Elov5* y *Fa2h*) y de los siguientes 5 candidatos a genes de referencia: *β-actina*, *alquilglicerona fosfato sintasa (Agps)*, *hipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa (Hprt)*, *proteína de unión a TATA (Tbp)*, y *fosfoglicerato quinasa 1 (Pgk1)*, fueron importados en el *software* qBasePLUS (Hellemans *et al.*, 2007). En qBasePLUS, el módulo geNorm permitió identificar la combinación más estable de genes de referencia para cada experimento en particular (Vandesompele *et al.*, 2002). En el caso del conjunto de datos de muestras de testículo durante el desarrollo postnatal y luego del tratamiento post-hipertermia, la combinación de 5 genes (*Agps*, *Hprt*, *Tbp*, and *Pgk1*), lanzó un valor de estabilidad de genes de referencia (parámetro M de geNorm) aceptable, de 0.47 y 0.24 (valores óptimos <0.5) y una variabilidad entre ellos (parámetro V de geNorm) de 0.15 y 0.15 respectivamente (preferentemente <0.15). En el caso de los datos obtenidos para los diferentes tipos

celulares aislados (SC, EP, ER y ET), el análisis en qBasePLUS indicó que la inclusión de β -actina y de *Tbp* reduce la estabilidad de los genes de referencia cuando se comparan los niveles de expresión entre los diferentes tipos celulares en estudio. Por esta razón, β -actina y *Tbp* fueron omitidos como genes de referencia, mientras que la combinación de *Agps*, *Hprt* y *Pgk1* mostró un valor aceptable del factor M y el valor más bajo de V al comparar los niveles de expresión entre los tipos celulares. Empleando las combinaciones de genes de referencia validadas y confiables para cada muestra, los niveles de *Elovl2*, *Elovl4*, *Elovl5* y *Fa2h* fueron calculados como valores CNRQ (del inglés *calibrated normalized relative quantity*). Estos valores fueron exportados al software GraphPad Prism para ser analizados estadísticamente.

Para cada una de las muestras o condiciones analizadas se realizaron 3 réplicas biológicas (3 reacciones independientes de retrotranscripción) y 4 réplicas técnicas de cada una de ellas. Finalmente, para asegurar la precisión y confiabilidad de las mediciones, mediante qPCR se realizaron curvas estándar para cada gen usando diluciones seriadas 1/6, 1/60, 1/1600 y 1/6000 de ADNc obtenido de testículo adulto, y las eficiencias de amplificación de los genes de interés y de referencia fueron calculadas mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Eficiencia qPCR} = 10^{-1/\text{pendiente}_-1}$$

En la Figura 2 de la sección Figuras y Tablas- Capítulo II, se pueden observar las curvas de eficiencia de todos los pares de *primers* utilizados, cuyos valores aparecen expresados en porcentaje.

8. INMUNOFLORESCENCIA Y MICROSCOPIA

8.1. Inmunohistoquímica en cortes testiculares

Para detectar la expresión de las proteínas *Elovl4* y *Fa2h* en cortes de tejido testicular se aplicó microscopía de fluorescencia, realizando la inmunodetección con anticuerpos primarios específicos. Retina y cerebro de rata adulta fueron usados como controles positivos para poner a punto las inmunohistoquímicas para la detección de *Elovl4* y *Fa2h*, respectivamente.

- **Obtención de criocortes**

Los testículos enteros (de animales de 14, 21, 25 y 37 días de edad postnatal y de adultos de 90 días) se fijaron por inmersión en paraformaldehído (PFA) preparado al 4% (v/v) en una solución de PBS 1X pH 7.4 durante toda la noche a 4°C (utilizando como mínimo 10 volúmenes del fijador por cada volumen de tejido). Dado que el PFA es un fijador de acción rápida pero de penetración lenta, para facilitar su ingreso al tejido, los testículos

de animales de hasta 25 días de edad fueron decapsulados previamente, mientras que a los de animales adultos se les realizaron punciones en la túnica albugínea con aguja de tuberculina.

Luego de lavar con PBS 1X para retirar el exceso de PFA, se cortaron rodajas a partir de los órganos en estudio, las cuales fueron sumergidas en una serie de concentraciones crecientes de sacarosa (10-20-30%) en PBS 1X durante toda la noche a 4°C como tratamiento crioprotector. Posteriormente estas rodajas fueron incluidas en moldes plásticos de 1.5 cm por 1.5 cm con una pequeña cantidad de OCT Tissue Tek (Sakura Finetek, Torrance, CA, USA) para obtener tacos histológicos que se conservaron a -80°C. A partir de éstos, utilizando un criostato (Leica CM 1860), se obtuvieron criocortes de tejido, de 5–7 µm de espesor, que fueron montados sobre portaobjetos polarizados SuperFrost Plus (Thermo Scientific) y se mantuvieron a -20°C hasta el momento de la tinción.

- **Inmunodetección**

Los portaobjetos conteniendo los cortes de tejido fueron sumergidos en PBS 1X previamente atemperado durante 20 minutos a temperatura ambiente para remover el OCT remanente. Luego se realizó una post-fijación, de los cortes, que fue diferente según si los cortes iban a ser destinados a la inmunodetección de Elov14 o de Fa2h. En el primer caso, se los fijó con PFA 4% en PBS a temperatura ambiente durante 2 minutos y se los lavó directamente con PBS 2 veces durante 2 minutos. En el segundo caso, se los fijó durante 10 minutos con acetona:metanol (1:1) a -20°C, se les sacó el exceso de fijador, se los expuso al aire durante 10 minutos a temperatura ambiente para que se sequen, y luego se rehidrataron durante 10 minutos con un pequeño volumen de PBS.

Una vez retirado el exceso de PBS con papel secante, los cortes en sus respectivos portaobjetos se incubaron con cloruro de amonio (NH₄Cl) 50 mM durante 10 minutos a temperatura ambiente. Seguidamente, las membranas celulares se permeabilizaron mediante incubación con Tritón-X 100 al 0.1% (Sigma Aldrich, 9002-93-1) en PBS 1X durante 10 minutos a temperatura ambiente. Luego de realizar 3 lavados de 5 minutos cada uno con PBS, se bloquearon los sitios de unión inespecíficos de los anticuerpos a utilizar con BSA 2% en PBS durante 20 minutos en cámara húmeda. A continuación los cortes fueron incubados durante toda la noche a 4°C con diluciones de los correspondientes anticuerpos primarios. Estos consistieron en anticuerpos policlonales de conejo anti-Elov14 y anti-Fa2h, disueltos en la solución de bloqueo (dilución 1:100 para Elov14 y 1:50 para Fa2h).

Luego de 4 lavados de 5 minutos cada uno con PBS para retirar el anticuerpo excedente, los cortes de tejido fueron incubados en cámara húmeda en oscuridad durante una hora a temperatura ambiente con el correspondiente anticuerpo secundario. Este

consistió, en el caso de Elov14, en anticuerpo de cabra frente al anti-Elov14 de conejo, conjugado con el fluoróforo Alexa Fluor 568 y en el caso de Fa2h, en anticuerpo de cabra frente al anti-Fa2h de conejo, conjugado con Alexa Fluor 488 (Life Technologies, diluciones 1:500 en BSA al 2% en PBS 1X).

Para localizar los núcleos celulares en cada corte de tejido en estudio, luego de lavarlos con PBS 1X, se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente con una solución 5 μ M de Hoechst 33342 (preparado a partir de una solución madre 1 mM en PBS) o con una solución 5 μ M de TO-PRO en PBS. Por último, se retiraron estas sondas fluorescentes y se montó un cubreobjetos sobre el portaobjetos conteniendo cada corte de tejido, añadiendo 16 μ L de líquido de montaje acuoso Fluoromount™ (Sigma Aldrich, F4680) y sellando los bordes del cubreobjetos con esmalte para evitar que se sequen los preparados.

Para cada ensayo se realizó el correspondiente control negativo preparando cortes de tejido del mismo origen que fueron incubados con BSA 2% en PBS en lugar de con los anticuerpos primarios mencionados.

Los preparados así inmunomarcados fueron observados en un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse E-600 equipado con un objetivo de inmersión en aceite a 40 \times NA 1.0. Las imágenes fueron capturadas con una cámara modelo ST-7 SBIG CCD asociada al *software* CCDOPS, versión 5.02 (SBIG Astronomical Instruments) y posteriormente procesadas con el programa Image J 1.51h. Para obtener detalles de la localización intracelular de Elov14 y Fa2h, los preparados se observaron también con un microscopio confocal de barrido láser Leica DMIRE2.

9. IDENTIFICACION DE LAS PROTEÍNAS Elov14 Y Fa2h

Para determinar la expresión de las proteínas Elov14 y Fa2h durante el desarrollo postnatal en testículo, y de Elov14 en testículo adulto, túbulos seminíferos, poblaciones de células germinales y células de Sertoli, se aplicó la técnica conocida como *Western blot* (WB). Retina y cerebro de rata se emplearon como controles positivos de Elov14 y Fa2h, respectivamente.

9.1. Obtención de extractos proteicos

Inmediatamente después de ser extraídos, los testículos y los tejidos controles (retina y cerebro) fueron colocados en un homogeneizador tipo Potter-Elvehjem con pistón de PTFE de 2 mL con 1 mL de *buffer* de lisis, compuesto por Tris-HCl 20 mM (pH 7.4), NaCl 100 mM, EDTA 1 mM, conteniendo Tritón X-100 1% y un cóctel de inhibidores de proteasas completo (Sigma Aldrich, P-8340). Los tejidos se homogeneizaron, repitiendo el

procedimiento cada 10 minutos mientras se mantenían los homogenados en hielo durante 1 hora. Cada homogenado se traspasó a un tubo *ependorf* de 1.5 mL haciéndolo pasar varias veces a través de jeringa de tuberculina para favorecer la lisis. El lisado obtenido se centrifugó durante 20 minutos a máxima velocidad (16000 rpm) en microcentrífuga refrigerada a 4°C. El sobrenadante conteniendo las proteínas se recuperó, y se tomaron alícuotas para la medición de las mismas.

Las suspensiones celulares enriquecidas en EP, ER, ET y CR se lavaron 2 veces con 1 mL de medio KHS y se centrifugaron durante 5 minutos a 2000 rpm. Los *pellets* celulares obtenidos se trataron en las mismas condiciones que se detallan para los tejidos a fin de lograr su lisis (homogenizaciones repetidas cada 10 minutos durante 1 hora a 4°C, pasajes a través de jeringa de tuberculina, centrifugación para recuperar el sobrenadante y toma de alícuotas para cuantificar proteínas). En el caso de las células de Sertoli se removió el medio de cultivo de las cápsulas en que se cultivaron, se lavaron las células 3 veces con PBS 1X, y se les adicionó el *buffer* de lisis (100 µL). La suspensión de células en *buffer* se traspasó a tubos *ependorf*, y se dejó reposar durante 30 minutos en hielo para su completa lisis. Posteriormente los lisados se centrifugaron y se trataron de la misma manera que los de las células espermatogénicas.

9.2. Electroforesis e inmunodetección

Siguiendo el mismo protocolo descrito para las fracciones de membrana en el **punto 5** de esta sección de Materiales y Métodos, alícuotas de los extractos proteicos testiculares y celulares se desnaturalizaron y se sembraron cantidades equivalentes de proteína (40 µg por calle) en geles de poliacrilamida al 10%, y las proteínas se resolvieron por SDS-PAGE.

Para la inmunodetección de Elov14 por *Western blot*, se utilizó un anticuerpo primario policlonal de conejo anti-Elov14 sintetizado y gentilmente donado por el Dr. Robert E. Anderson (*University of Oklahoma Health Sciences Center, OK, USA*), y previamente validado para WB e inmunohistoquímica (Agbaga *et al.*, 2008). Para Fa2h, se utilizó el anticuerpo primario policlonal de conejo anti-Fa2h ab111554 adquirido en Abcam (Cambridge, MA, USA).

Las membranas de PDVF a las que se transfirieron las proteínas fueron incubadas durante toda la noche a 4°C con el respectivo anticuerpo primario, diluido en BSA al 5% en TBS-T, anti-Elov14 (dilución 1:1000) o anti-Fa2h (dilución 1:500) policlonales de conejo. El control de carga se realizó exponiendo a las membranas a un anticuerpo primario monoclonal de ratón anti- α -tubulina (1:4000 en BSA 5% en TBS-T; DM1-A, Abcam, Cambridge, MA, USA, o CP06, EMD/Biosciences-Calbiochem, Los Ángeles, CA, USA). Luego de lavarlas, las membranas fueron incubadas a temperatura ambiente con una

dilución 1:2000 (en BSA al 5% en TBS-T) del correspondiente anticuerpo secundario conjugado con HRP de origen comercial (sc-20049 para las enzimas y sc-2005 para la tubulina), ambos provenientes de Santa Cruz Biotechnology, CA, USA, siguiendo instrucciones del fabricante.

10. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE ELONGASAS

10.1. Ensayos de incorporación de [³H]20:4n-6

Con el fin de comparar la actividad de las elongasas de ácidos grasos entre los diferentes tipos celulares del epitelio seminífero, se empleó un PUFA conocido, el [³H]20:4n-6 (ácido araquidónico tritiado), para detectar la formación de PUFA más largos, esto es, de 22 y hasta 32 átomos de carbono, a partir de él. Antes de cultivar cada grupo de células por separado (SC, EP, ER y ET), para asegurar las condiciones necesarias (medios, tiempos de incubación) que permitieran la supervivencia de las mismas durante las largas horas a las que se las sometería en cultivo en presencia de 2.5 μM 20:4n-6, se hicieron ensayos preliminares, utilizando preparaciones de células intratubulares totales (CT), para determinar su viabilidad. Las CT fueron cultivadas en medio DMEM sin glucosa y con el agregado de diferentes suplementos durante varias horas (hasta 20) a 33°C (Figura 19 en la sección Figuras y Tablas- Capítulo II). Durante estos ensayos se determinó, para cada condición, el número de células sobrevivientes y muertas mediante tinción con yoduro de propidio (IP), como se detalla en el **apartado 12.1** de esta sección. Estas y otras determinaciones previas (por ej., número de horas de cultivo necesarias para que ocurriera una elongación de [³H]20:4 detectable) permitieron emplear las condiciones de cultivo que se describen a continuación.

Los túbulos seminíferos adultos (TS), las células germinales (EP, ER y ET) y las células de Sertoli (SC) fueron resuspendidos en medio **DMEM** (del inglés *Dulbecco's modified Eagle's medium*) sin glucosa (Gibco®, 11966025), suplementado con 5% (v/v) de suero fetal bovino (SFB, Gibco®), lactato 6 mM, penicilina (100 U/ mL) y estreptomina (100 U/ mL) y sembrados en cápsulas de cultivo de 35 mm de diámetro. Se utilizaron 5 X10⁶ células (en el caso de los TS, se empleó una cantidad equivalente a 1.5 mg de proteína), en un volumen final de 2 mL de medio por cápsula. En todos los casos se agregó 1 μCi de [³H]20:4n-6 radiomarcado (65.9 Ci/mmol; Perkin Elmer Life Sciences Inc, Boston, MA, USA) a cada cápsula, previamente combinado con 20:4n-6 no marcado, preparando la mezcla marcado-no marcado en DMEM suplementado con BSA libre de ácidos grasos (relación BSA/ 20:4n-6 total = 1:2, mol/ mol, y concentración final de 20:4n-6, 2.5 μM por cápsula). Los túbulos y las células se incubaron a 33°C en atmósfera húmeda controlada con 5% de CO₂ durante 20 horas.

Transcurridas las 20 horas de incubación con [³H]20:4n-6, los TS y las células en suspensión fueron transferidas a tubos de vidrio, raspando las cápsulas y lavándolas dos veces con PBS 1X frío. Mediante centrifugación (800 g por 5 minutos), los TS y las células fueron separados del medio conteniendo productos marcados con [³H], lavados y recuperados de los *pellets* para la extracción de los lípidos, realizada como se detalla para muestras no marcadas más atrás en esta sección (**apartado 6.1**). Los extractos lipídicos obtenidos se secaron bajo corriente de N₂, y se conservaron a -20°C hasta el momento de su uso, disueltos en 500 µL de cloroformo: metanol (2:1, v/v).

10.2. Medición de la incorporación y distribución del [³H]20:4n-6

Desde los extractos lipídicos se tomaron alícuotas para determinar la incorporación total de [³H]20:4n-6 en cada muestra. Se sembró el volumen del extracto equivalente a 50000 dpm (del inglés *disintegrations per minute*) en placas de TLC para la separación de las principales clases de lípidos polares (fosfolípidos) y de lípidos neutros, como se detalla para los lípidos no marcados en el **apartado 6.4** de esta sección. Dadas las grandes diferencias tanto entre los tamaños de las muestras como entre los niveles de incorporación del precursor, para una localización de los lípidos más precisa y homogénea sobre las placas de TLC, antes de la siembra en las mismas se agregó a las muestras, a modo de *carrier*, un volumen conocido de un extracto de lípidos de testículo de rata sin marcar. Las clases de lípidos se visualizaron luego de la exposición de las placas a vapores de yodo y las manchas resultantes se rasparon y transfirieron a viales. La radioactividad incorporada se midió mediante conteo por centelleo líquido como se detalla en el **apartado 6.7** de esta sección, y se normalizó por el contenido de proteína de los TS y los distintos tipos celulares.

10.3. PUFA y VLCPUFA sintetizados a partir de [³H]20:4n-6

A partir de los extractos lipídicos totales de TS, SC, EP, ER y ET, se tomaron alícuotas que contuvieran un total de 50000 dpm. Se prepararon metil ésteres (ME) a partir de los AG de los lípidos totales presentes, y se purificaron mediante TLC como se detalló antes en esta sección (**apartado 6.5**). Las preparaciones de ME fueron separadas en primer lugar de acuerdo a su número de dobles ligaduras mediante cromatografía de impregnación argéntica (Ag-TLC) y posteriormente de acuerdo a la longitud de su cadena mediante cromatografía líquida de alta presión (**HPLC**, del inglés *high performance liquid chromatography*) de fase reversa. Esta parte del estudio fue realizada con la colaboración del Dr. Daniel A. Peñalva, quien diseñó la estrategia de separación y a quien se le proporcionaron los ME de las muestras para resolver.

Para ello, se utilizaron placas de TLC de 20 x 20 cm preparadas con 10 g de sílica gel G y 2 g de AgNO₃ en agua (AgNO₃ 20% p/p) y cloroformo: metanol (90:10, v/v) como

solvente. Previo a la siembra, los ME se mezclaron con una cantidad conocida de ME de ácidos grasos tetraenoicos y pentaenoicos de distinta longitud de cadena no marcados, preparados previamente para que sirvieran como *carriers*. Las bandas conteniendo las fracciones de ME tetraenoicos y pentaenoicos fueron visualizadas bajo luz UV luego de rociar las placas con DCF al 0.05% en metanol, se rasparon y se eluyeron de la sílica (como se explica en el **punto 6.4** de esta sección). El volumen del eluido se redujo bajo corriente de N₂, se filtró para remover trazas de material particulado, se secó bajo N₂ y se resuspendió en metanol.

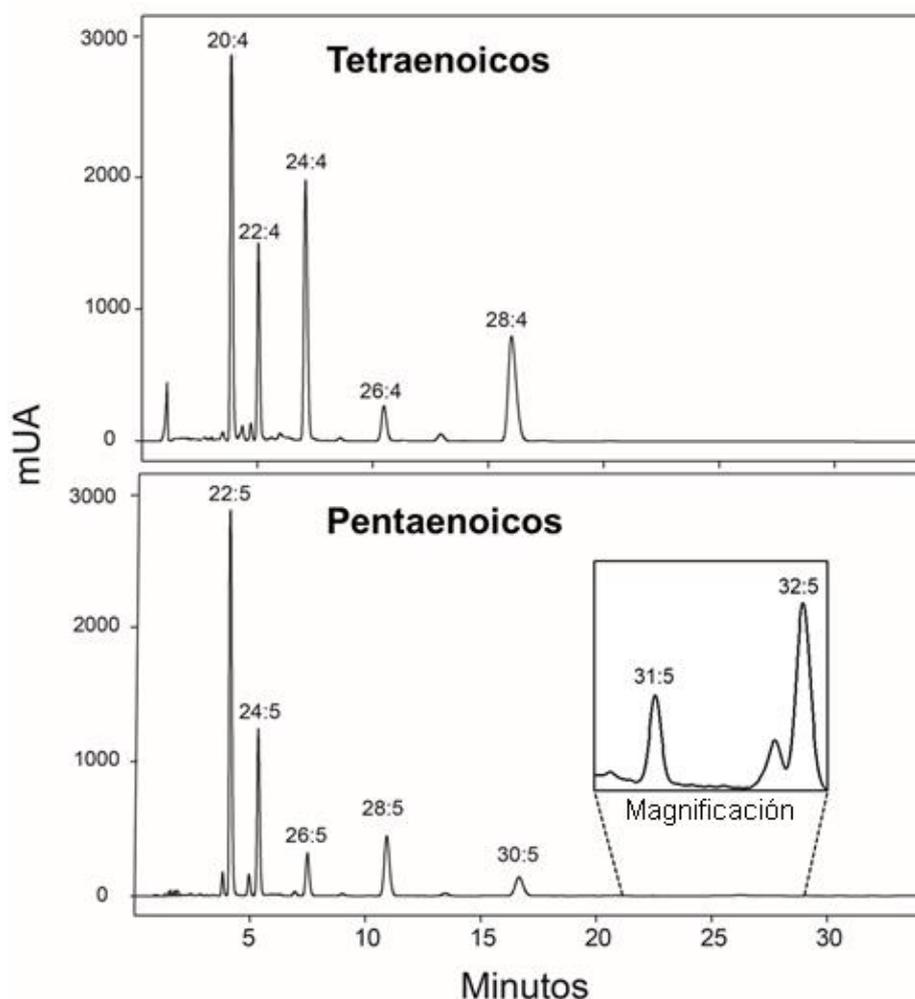


Figura 8. Separación mediante HPLC de especies de ME de AG no hidroxilados tetraenoicos y pentaenoicos de lípidos totales de testículo de rata, en función de su número de carbonos (20 a 32). Para los AG pentaenoicos se incluye una magnificación del cromatograma en el rango de los tiempos de retención correspondientes a los componentes minoritarios 31:5n-6 y 32:5n-6. mUA, miliunidades arbitrarias.

Luego, las especies de ME componentes de las fracciones de ME tetraenoicos por una parte, y de ME pentaenoicos por otra, fueron separadas de acuerdo con la longitud de su cadena por HPLC, como se muestra en los cromatogramas de la **Figura 8**, utilizando un equipo Agilent 1260. Las corridas cromatográficas se llevaron a cabo a 40°C utilizando una

columna analítica (Zorbax Eclipse Plus C18, 4.6 x 100 mm) empaquetada con partículas de 3.5 µm de diámetro. El solvente empleado como fase móvil fue acetonitrilo: agua (98:2, v/v) bombeado isocráticamente a un flujo de 0.75 mL/minuto. Los ME poliinsaturados fueron detectados por su absorbancia a 203 nm y colectados a medida que emergieron de la columna. Cada una de las fracciones colectadas se llevó a sequedad y se midió su radioactividad mediante centelleo líquido.

11. ESTUDIOS SOBRE LA BIOSÍNTESIS DE ESFINGOLÍPIDOS

11.1. Ensayos con NBD-C6-ceramida

Suspensiones de EP, ER y ET (5×10^6 células) fueron incubadas durante 1, 3 y 5 horas en medio DMEM en presencia de una concentración 1 µM del precursor fluorescente NBD-C6-ceramida (Molecular Probes, N-22651, Eugene, OR, USA) o su vehículo etanol como control, a 33°C en atmósfera aire / CO₂ (95:5). Luego de cada período de incubación, las células se lavaron por suspensión en PBS 1X y centrifugación, y se obtuvieron los extractos lipídicos como se describe en el **apartado 6.1** de esta sección. La fase clorofórmica obtenida fue concentrada por evaporación bajo N₂ y los lípidos, disueltos en cloroformo: metanol (2:1, v/v), fueron sembrados en placas de HPTLC (Merck, 1056260001, Darmstadt, Alemania). Para la cromatografía se utilizó cloroformo: metanol: agua (65:25:4 v/v/v). Los lípidos marcados con NBD-C6 se localizaron sobre las placas bajo luz UV y se fotografiaron. Las manchas de lípidos fluorescentes (Cer, y los productos SM y GlcCer) se rasparon y se eluyeron de la sílica mediante tres lavados con cloroformo:metanol:agua (5:5:1, v/v/v). Se resuspendieron en etanol y se analizaron en un espectrofluorímetro, utilizando 466 nm y 539 nm como longitudes de onda de excitación y de emisión, respectivamente.

11.2. Ensayos con precursores radioactivos

- **Precursores y suplementación del medio**

Para investigar la biosíntesis *de novo* de SL en células germinales aisladas, se utilizaron dos precursores conocidos de esta vía: el ácido palmítico y el aminoácido serina. Por separado, se utilizaron [³H]palmitato y [³H]serina (aquí abreviados [³H]16:0 y [³H]Ser) (57.0 Ci/mmol y 27.0 Ci/mmol, respectivamente; Perkin Elmer Life Sciences Inc, Boston, MA, USA). Para poner a punto los ensayos de incorporación de estos precursores, cultivos primarios de CT y de EP fueron incubados en medio DMEM suplementado con lactato 6 mM y con concentraciones variables de glucosa y suero a diferentes tiempos, en una atmósfera de CO₂ al 5% y a una temperatura de 33°C. En la **Tabla 3** se resumen el precursor radioactivo, los suplementos, el tiempo de incubación y el número de células empleados en cada ensayo. Si bien en todos los casos las células presentaban aspecto normal y eran

viales, en todas las condiciones ensayadas la marca de [^3H]Ser incorporada por las células y recuperada en los extractos lipídicos fue muy baja. Por el contrario, la incorporación de [^3H]16:0 fue satisfactoria. Cuando se comparó el efecto de la concentración de glucosa en el medio usando este precursor, se observó que éste era un factor que no afectaba al estado de las células ni a la incorporación del precursor, por lo tanto se procedió a usar el medio DMEM baja glucosa (5.5 mM) suplementado con lactato 6 mM y 10% de SFB.

Tabla 3. Condiciones utilizadas para ensayos preliminares de incubación de células germinales con precursores radioactivos de la vía de biosíntesis *de novo* de esfingolípidos.

Muestra	Precursor (μCi / cápsula)	Glucosa (mM)	SFB (%)	Tiempo (h)	N° de células	Testosterona (μM)	Incorporación en lípidos
EP	[^3H]Ser 1 μCi	-	5	20	3X10 ⁶	-	Baja
EP	[^3H]Ser 2 μCi	-	5	20	5X10 ⁶	-	Baja
EP	[^3H]Ser 2 μCi	-	5	48	5X10 ⁶	-	Baja
CT	[^3H]Ser 1 μCi	-	5	20	5X10 ⁶	-	Baja
CT	[^3H]Ser 1 μCi	-	5	20	5X10 ⁶	0.1	Baja
CT	[^3H]Ser 1 μCi	5.5	5	20	5X10 ⁶	-	Baja
CT	[^3H]Ser 1 μCi	-	10	20	5X10 ⁶	-	Baja
CT	[^3H]Ser 1 μCi	5.5	10	20	5X10 ⁶	-	Baja
CT	[^3H]Ser 1 μCi	25	10	20	5X10 ⁶	-	Baja
TS	[^3H]Ser 1 μCi	-	5	20	-	-	Baja
CT	[^3H]16:0 1 μCi	25	10	5	5X10 ⁶	-	Buena
CT	[^3H]16:0 1 μCi	25	10	20	5X10 ⁶	-	Buena
CT	[^3H]16:0 1 μCi	5.5	10	20	5X10 ⁶	-	Óptima

• Inhibidores

Para poner en evidencia pasos enzimáticos claves involucrados en la biosíntesis *de novo* de SL se utilizaron los siguientes inhibidores específicos:

① L-cicloserina (CS) (Sigma Aldrich, C1159), inhibidor de la serina palmitoiltransferasa. Se preparó una solución madre con una concentración de 25 mg/mL en agua, a partir de la cual se tomaron 8.16 μL ó 16.32 μL , que fueron agregados a un volumen de 2 mL del medio de incubación (volúmenes menores o iguales al 0.8% del volumen final) para obtener una concentración en el medio de 1 mM y 2 mM, respectivamente.

② Fumonisina B1 (FB1) (Sigma Aldrich, F1147), inhibidor de la (dihidro) ceramida sintasa (Cer sintasa). Se preparó una solución 10 mM en dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma Aldrich, 276855), a partir de la cual se agregaron 10 μL ó 20 μL en un volumen de 2 mL del medio

de incubación (volúmenes menores o iguales al 1% del volumen final), obteniendo concentraciones en el medio de 50 μM y 100 μM , respectivamente.

- **Soluciones de testosterona (Tes)**

Para evaluar los efectos de esta hormona esteroidea sobre la síntesis *de novo* de SL en células germinales aisladas se preparó una solución madre con una concentración de 1.8 mM en etanol absoluto. A partir de ella se preparó otra solución 100 μM de Tes en etanol, de la cual se tomó una alícuota de 2 μL que, al ser agregada en un volumen de 2 mL del medio de cultivo nos permitió obtener una concentración de Tes en el mismo de 0.1 μM . La concentración de etanol en el medio representó un 0.1% del volumen final.

- **Medio condicionado de células de Sertoli (MCS)**

Tanto utilizando cortes de tejido como co-cultivos entre células germinales y células de Sertoli, es difícil discernir el efecto que tienen estas últimas sobre la síntesis *de novo* de SL en las primeras. Es por ello que en este estudio se indagó acerca de la posible influencia que sobre dicha síntesis podrían ejercer factores solubles liberados desde las células de Sertoli. Para preparar un medio que contuviera esos potenciales factores, se hicieron cultivos primarios de células de Sertoli como se describió en el **punto 3.4**. Estas células se cultivaron durante al menos 5 días en medio DMEM/ F-12 1:1 (v/v) *libre de suero*, luego de lo cual se colectó el medio sobrenadante. Este medio, que denominamos **medio condicionado de células de Sertoli** y abreviamos **MCS**, se filtró y se utilizó para adicionarlo a las células espermatoogénicas en cultivo como se detalla más adelante.

12. ENSAYOS DE VIABILIDAD Y FUNCIONALIDAD CELULAR

12.1. Exclusión del yoduro de propidio (IP)

El IP se utiliza como tinción para el ADN celular, como por ej. en microscopía para visualizar el núcleo. Como el IP no puede atravesar la membrana plasmática de las células vivas, es muy útil para diferenciar células dañadas o muertas de células que mantienen la integridad de su membrana. En comparación, las membranas (sanas o dañadas) son permeables al colorante nuclear Hoechst. Es por ello que la exclusión del marcador no permeable IP se utilizó para determinar la viabilidad de las células en estudio luego de ser tratadas durante 20 horas en cultivo con los diferentes inhibidores u hormonas y sus respectivos controles, ambos en presencia de 16:0 2.5 μM . En todos los casos, transcurridas las 20 horas de cultivo, las células fueron incubadas durante 10 minutos a 33°C en presencia de 2 μM IP (Sigma Aldrich, 11348639001) y también con 5 μM Hoechst 33342 (Sigma Aldrich, 14533), ambos disueltos en PBS. Inmediatamente se fotografiaron varios campos al azar para cada condición con un microscopio de fluorescencia invertido modelo

Nikon Eclipse TE 2000 y se determinó el número de células viables por campo. Las células vivas excluyen al IP y se tiñen con Hoechst, mientras que las no viables se tiñen con los dos.

12.2. Reducción del MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5difeniltetrazol)

Este ensayo, conocido como “prueba del MTT” se basa en la reducción metabólica de este compuesto (de color amarillo) realizada por la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa de las células vivas, convirtiéndolo en un compuesto intracelular coloreado (formazán), lo que permite determinar la funcionabilidad mitocondrial de las células controles en comparación con las tratadas. La cantidad de células viables es proporcional a la cantidad de formazán producido. Este método es ampliamente utilizado para medir supervivencia y proliferación celular. El método original fue desarrollado por Mosmann (1983), y evalúa la capacidad reductora de las células, independientemente de los cambios en la integridad de su membrana plasmática. El compuesto de formazán es insoluble, por lo que es necesario añadir un *buffer* de solubilización para obtener la solución coloreada (violeta) que pueda ser medida colorimétricamente. En nuestro caso lo aplicamos porque interesaba evaluar la viabilidad de las células espermatogénicas aisladas que permanecían en cultivo durante 20 horas, en especial las tratadas con los inhibidores y las hormonas en presencia de ácidos grasos como el 16:0.

El protocolo utilizado en esta tesis fue una modificación puesta a punto por primera vez en nuestro grupo para la determinación de viabilidad en células espermatogénicas totales (CT) en suspensión, ya que los métodos originales estaban descritos para células adherentes en cultivo. Para ello, el MTT (Sigma Aldrich, M5655) fue disuelto en PBS 1X estéril a una concentración de 5 mg/mL. Se trabajó con placas de 96 pocillos y las CT fueron sembradas en una densidad de 250000 células cada 100 μ L de medio por pocillo. Se utilizaron los mismos medios completos que para los experimentos, esto es, en presencia o en ausencia de los diferentes inhibidores u hormonas, según se indica en cada caso particular. Las placas se colocaron durante 20 horas a 33°C en atmósfera húmeda de 5% de CO₂. Cada tratamiento se realizó por quintuplicado.

Transcurridas las 20 horas, se agregó la solución de MTT (10% del volumen del medio de cultivo) para alcanzar una concentración final de 0.5 mg/mL por pocillo, y las células se mantuvieron a 33°C durante 4 horas en oscuridad en una atmósfera de CO₂ al 5%. Durante este periodo se observó la formación de los cristales violetas de formazán en el microscopio óptico. Luego, directamente sobre los 100 μ L del medio original en el que las células se encontraban suspendidas, se agregó el mismo volumen del *buffer* de solubilización (Tritón X-100 en isopropanol ácido 0.1 N HCl). Se homogeneizó vigorosamente con micropipeta

para disolver completamente los cristales de formazán, incubando durante 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. La reducción del MTT se cuantificó en un lector de placas (Multiskan GO, Thermo Scientific, N13137) a 570 nm, restando el valor de la absorbancia a 650 nm correspondiente a proteínas y restos celulares. Además se restó a cada pocillo la absorbancia promedio medida para el medio de cultivo sin células (blanco de absorbancia), para eliminar la interferencia del color propio de dicho medio. En este punto del ensayo, se hizo la prueba de pasar la suspensión de células (con cristales de formazán) contenida en cada pocillo a tubos *ependorf*, centrifugar, descartar dicho medio coloreado, y resuspender el *pellet* celular en el *buffer* de solubilización. El resultado fue que no había diferencias con la absorbancia obtenida para las células a las que se les había restado la absorbancia del medio como blanco. Los resultados fueron expresados como porcentaje de viabilidad celular en la condición experimental con respecto a la condición control correspondiente (considerada 100%), y se compararon estadísticamente mediante el *software* GraphPad Prism 5.

Ensayos preliminares realizados para la prueba del MTT. Los pasos metodológicos aquí descritos para esta prueba se desarrollaron luego de haber puesto a punto diferentes detalles y condiciones experimentales para poder aplicar el método a las células germinales en suspensión. Inicialmente se probaron diferentes densidades celulares: 50000, 100000, 250000 y 400000 células por pocillo. Determinamos que tanto la escasez como el exceso de células por muestra disminuyen la capacidad reductora del MTT y la formación de cristales observables en el microscopio. También se compararon diferentes *buffers* de solubilización en distintos volúmenes (alcohol isopropílico ácido, Tritón X-100 en isopropanol ácido 0.1 N HCl, SDS 10% en HCl 0.01 N y DMSO 100%) en volúmenes de 50, 100 y 150 μL /pocillo. Concluimos que el más apropiado para detectar absorbancia en este tipo celular era el Tritón X-100 en isopropanol ácido 0.1 N HCl en 100 μL /pocillo. Además, se compararon dos volúmenes de la solución de MTT por pocillo: 10 μL y 25 μL , comprobando que un mayor volumen del mismo no mejora la absorbancia. Por otra parte, se realizaron controles negativos, sometiendo las células espermatozógenas a las mismas condiciones pero incubándolas a 37°C, temperatura a la cual estas células no son viables.

13. BIOSÍNTESIS DE Cer, SM Y GlcCer EN CÉLULAS GERMINALES A PARTIR DE [³H]16:0

13.1. Diseños experimentales empleados

Los cultivos se realizaron en poblaciones aisladas de CT, EP y ER, suspendidas en 1 mL de medio DMEM baja glucosa (5.5 mM) (Gibco®, 31600034) suplementado con lactato 6 mM, 10% (v/v) de SFB, penicilina (100 U/ mL) y estreptomycin (100 U/ mL). Las células se

sembraron en cápsulas de cultivo de 35 mm de diámetro, en una densidad de 4 a 5 x 10⁶ células por cápsula, y se mantuvieron a una temperatura de 33°C, bajo atmósfera de CO₂ al 5%. A las 5 horas de cultivo, solubilizado en 1 mL de cada uno de los medios en estudio, se agregó 1 µCi del precursor radioactivo, [³H]16:0 (57.0 Ci/mmol; Perkin Elmer Life Sciences Inc, Boston, MA, USA), al cual se le había adicionado la cantidad suficiente de 16:0 no marcado y BSA como para alcanzar una relación BSA/16:0 de 2:1 y una concentración final de 16:0 de 2.5 µM.

En una primera serie de ensayos, las células se preincubaron en presencia de uno de los dos inhibidores empleados (CS o FB1), o de sus respectivos controles (agua o DMSO), durante 5 horas. A continuación se agregó a cada cápsula (1 mL) del mismo medio DMEM completo (esto es, conteniendo los inhibidores para mantener su concentración), y 1 µCi de [³H]16:0. A partir de este agregado, los cultivos continuaron durante 20 horas adicionales (**Figura 9 A**).

Los efectos de la testosterona se realizaron similarmente (Fig. 9 A), esto es, las células se preincubaron en presencia de Tes (y los respectivos controles con su vehículo, etanol) durante 5 horas. A continuación se agregó a las cápsulas el 1 mL del mismo medio completo conteniendo Tes o etanol para mantener su concentración, y 1 µCi de [³H]16:0. A partir de este agregado, los cultivos continuaron durante 20 horas adicionales.

En una tercera serie de experimentos, se evaluaron los efectos del agregado del medio condicionado de Sertoli (MCS). En este caso, las células experimentales y controles se preincubaron durante 5 horas con el medio DMEM completo. Una vez cumplidas, se agregó, 1 mL del medio MCS o 1 mL de DMEM/F-12 (control del medio MCS), ambos conteniendo el 1 µCi de [³H]16:0, y los cultivos continuaron durante 20 horas adicionales (**Figura 9 B**).

Finalmente, para evaluar el efecto de MCS en presencia de Tes, se preincubaron las células en el medio DMEM conteniendo Tes (o su vehículo, etanol, como control) durante 5 horas. Cumplidas éstas, a *ambos* cultivos (*sin* Tes y *con* Tes), se les agregó el medio MCS (1 mL) conteniendo [³H]16:0, prosiguiendo la incubación durante 20 horas (**Figura 9 C**).

Al cabo de las 20 horas, las células fueron fotografiadas con una cámara adosada a un microscopio óptico Nikon Eclipse TE 2000 para evaluar la morfología celular.

Las suspensiones celulares se procesaron como se detalló previamente en esta sección para el caso del [³H]20:4 (**apartado 10.1**), a fin de obtener los extractos lipídicos. En todos los casos se separaron los lípidos, de los cuales los estudios se concentraron en la radioactividad proveniente de [³H]16:0 que había sido incorporada en la Cer, la SM y la GlcCer en las condiciones controles y experimentales descritas.

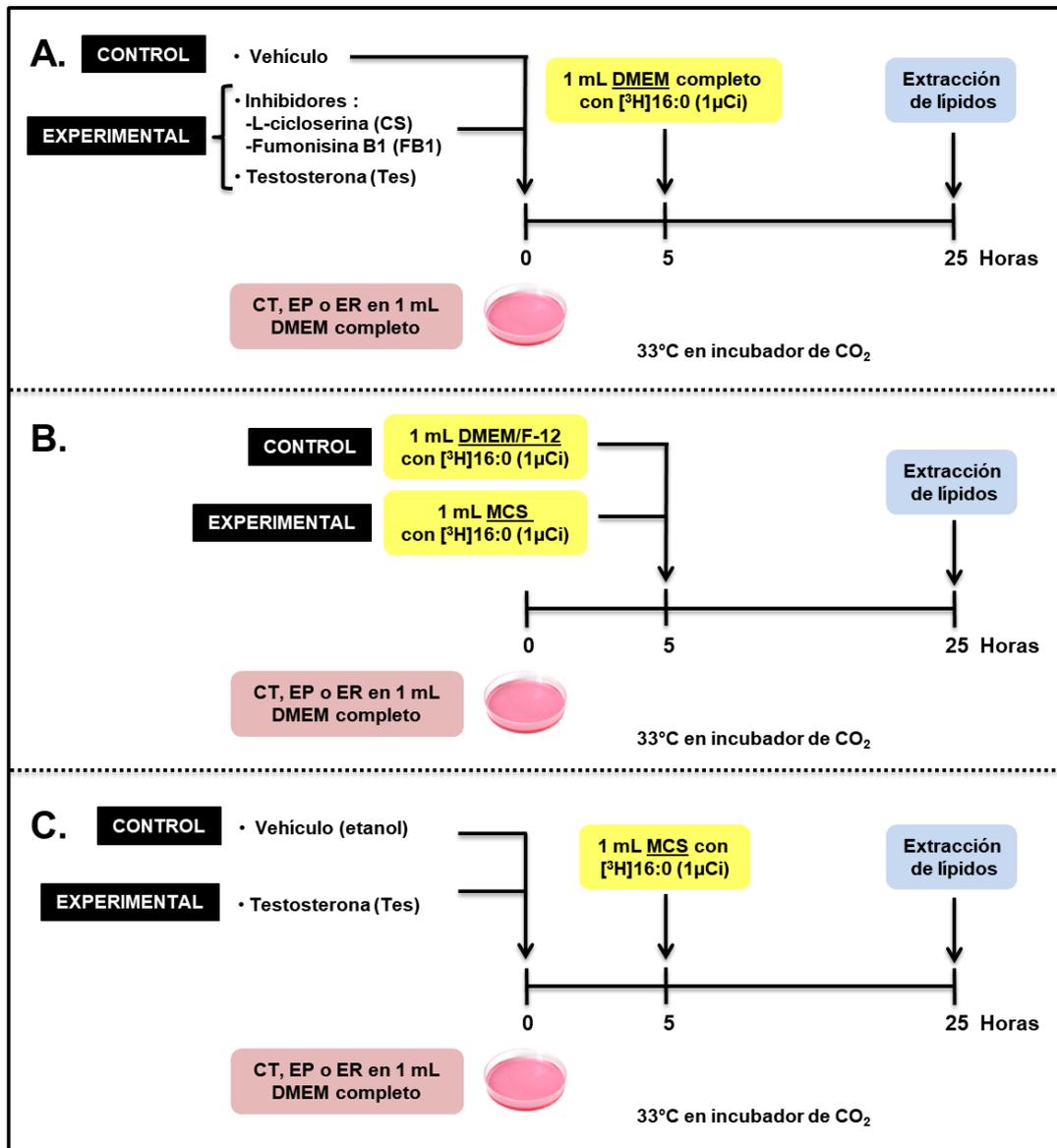


Figura 9. Esquema de los diseños experimentales empleados para investigar la biosíntesis *de novo* de esfingolípidos utilizando el precursor $[^3\text{H}]16:0$, en células aisladas a partir del epitelio seminífero adulto: CT, células espermatogénicas totales; EP, espermatoцитos en paquiteno; ER, espermátidas redondas.

13.2. Expresión de los genes *CerS3*, *SMS1*, *SMS2* y *GlcCerS*

• En células aisladas del epitelio seminífero

Para detectar posibles diferencias cuantitativas en los niveles de ARNm de los genes *CerS3*, *SMS1*, *SMS2* y *GlcCerS* entre las poblaciones de células aisladas del epitelio seminífero (EP, ER, ET, SC y CR), se realizó RT-qPCR utilizando los pares de *primers* listados en la **Tabla 4**, de acuerdo a los procedimientos descritos en detalle en el **apartado 7** de esta sección.

Tabla 4. Secuencias (5'-3') de los pares de *primers* utilizados para qRT-PCR.

Gen	Directo	Reverso	Temperatura de fusión (°C)
CerS3	GTCTTTGTGAAAGCGTCCCAC	ATTGGCTAGAGGTGTGGCAA	58
SMS1	TGCATAGTTGGCACGCTGTA	GCACTTGAGCTTCCCAGTCT	58
SMS2	CTTCCTCTTCAGCGGCCATA	TGGTACCACCAGAAGTGACG	58
GlcCerS	ACGTAGCTGACAGACAAGGC	CATCCCCGTCACACACTTGA	58

- **En células tratadas con hormonas esteroidales y MCS**

Para evaluar los efectos de las hormonas esteroidales sobre la expresión de los cuatro genes en estudio (*CerS3*, *SMS1*, *SMS2* y *GlcCerS*) los niveles del ARNm de los mismos se cuantificaron mediante RT-qPCR, inicialmente en cultivos de CT, luego de ser tratados durante 5 horas con cada hormona, 0.1 μM de Tes, 0.1 μM de 17- β -estradiol (E2), o su vehículo (etanol). Las CT fueron cultivadas en las mismas condiciones que las utilizadas para los ensayos con el precursor radioactivo (33°C en una atmósfera de CO₂ al 5%), agregando a controles y experimentales la misma concentración del vehículo o de hormonas (0.1 μM) y de 16:0 (2.5 μM), en estos casos no marcado.

Las células fueron resuspendidas en el medio habitual (DMEM 5.5 mM glucosa, 6 mM lactato, 10% de SFB, y 100 U/ mL de penicilina y de estreptomicina). Porciones de 750 μL de esta suspensión celular (conteniendo 2 x 10⁶ células por pocillo) se repartieron en placas de 24 pocillos, e inmediatamente se agregaron 750 μL de cada uno de los siguientes tres medios: 1) el mismo medio DMEM completo; 2) el medio MCS resultante del cultivo de células de Sertoli; o 3) DMEM/F-12 (control del medio MCS), en los dos últimos casos en proporción final DMEM: F-12 3:1. Los 3 medios estuvieron suplementados con 16:0 sin marcar y BSA libre de ácidos grasos (2:1, mol: mol) para alcanzar una concentración final de 2.5 μM de 16:0. Al mismo tiempo, se agregaron las hormonas esteroidales Tes o E2 (1.5 μL de soluciones 100 μM de etanol) en los pocillos correspondientes, para alcanzar una concentración final de las mismas en el medio igual a 0.1 μM .

Al cabo de 5 horas en cultivo, se extrajo el ARN total de cada muestra y se realizó RT-qPCR utilizando los pares de *primers* listados en la **Tabla 4**. Ensayos similares se realizaron para medir los niveles de expresión de *Elovl2*, *Elovl4*, *Elovl5* y *Fa2h* en cada una de las condiciones experimentales aquí mencionadas, en este caso utilizando los pares de *primers* que aparecen en la **Tabla 2**. Para llevar a cabo la RT-qPCR se aplicaron los procedimientos detallados para *Elovl4* y *Fa2h* en la presente sección de Materiales y Métodos.

14. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para evaluar la significancia de las diferencias entre muestras pareadas (control y experimental), se aplicó el *test* “*t*” de Student. Para determinar la existencia o no de diferencias significativas al comparar los datos obtenidos de más de dos tratamientos, o de muestras entre sí, se utilizó el análisis de la varianza (ANOVA) de una vía entre las medias de las condiciones/poblaciones estudiadas. En los casos en que se detectaron diferencias significativas, para determinar cuáles de las medias eran diferentes entre sí, se completó el análisis mediante el *post-test* de Tukey de comparaciones múltiples. Todos los análisis estadísticos se realizaron usando el *software* Graph Pad Prism versión 5.0[®] (San Diego, CA, USA). Los datos graficados corresponden a la media \pm desvío estándar (SD) o a la media \pm error estándar de la media (SEM) en el caso de los experimentos de PCR cuantitativa, de un *n* mínimo igual a tres. Los grados de significatividad (*p*) se expresan en las leyendas de las figuras. Los valores de *p* menores a 0.05 ($p < 0.05$) se consideraron estadísticamente significativos. En la mayoría de los experimentos *in vitro* el número de muestras individuales analizadas varió entre 3 y 6, dependiendo del volumen de las células o fracciones en estudio, en cada una de las cuales se hicieron determinaciones por duplicado. En los experimentos realizados *in vivo* los datos presentados corresponden al menos a 4 animales por condición.

***RESULTADOS -
CAPÍTULO I***

I. FRACCIONES DE MEMBRANA DE CÉLULAS ESPERMATOGÉNICAS

En esta primera parte del trabajo de tesis doctoral el objetivo fue investigar la distribución de los lípidos entre *fracciones* de membrana (plasmática, intracelulares) obtenidas a partir de las células espermatoogénicas en diferentes estadios de su diferenciación. Nuestro foco estaba puesto sobre la distribución lateral de componentes (proteínas, lípidos) entre dominios tipo *raft* y *no-raft* de sus membranas plasmáticas. Los esfuerzos iniciales se concentraron en lograr una separación aceptable de las membranas para poder compararlas en su composición, para lo cual comenzamos con el estudio de las células totales presentes en el interior de los túbulos (CT), más del 95% de las cuales está constituido por células espermatoogénicas en distintos estadios de diferenciación.

El aislamiento de dos fracciones de membrana tan disímiles como las popularmente conocidas como *raft* y *no-raft* en células tan diferentes entre sí como las germinales en distintos estadios de su diferenciación, que aunque son del mismo origen difieren tanto en tamaño, densidad, forma y composición de sus componentes (incluyendo a los lípidos), requirió inicialmente estudios preliminares para seleccionar el método más adecuado. A lo largo de este capítulo se presentan, por un lado, los resultados de la caracterización de las fracciones de membrana obtenidas a partir de las CT mediante el método clásico de Brown y Rose (1992), que emplea el detergente Tritón X-100 en frío, y por otro, se caracterizan las fracciones obtenidas de homogenados totales (HT) de CT mediante otro método (Luria *et al.*, 2002), que se basa en la homogenización de las membranas en un *buffer* de lisis en ausencia de detergente y separación de las fracciones de membrana de acuerdo con su densidad en gradientes de sacarosa.

El foco principal del estudio estaba puesto sobre la distribución lateral en las membranas de las especies moleculares de esfingomielinas (SM) y ceramidas (Cer) con VLCPUFA (n-V y h-V) en comparación con las especies “no VLCPUFA” de los mismos lípidos y su posible afinidad por otros lípidos de membrana, como por ej., el colesterol. Es por eso que las SM y las Cer se investigaron *en el contexto* del ambiente lipídico que las rodeaba, esto es, en paralelo con el estudio de la distribución, entre las mismas fracciones de membrana, de varias otras clases lipídicas neutras y polares, entre ellas el colesterol y los principales GPL. Es por ello que la presente sección, Resultados-Capítulo I, se dividió en dos partes, la primera cubriendo aspectos generales de la *caracterización* de las fracciones de membrana que pueden obtenerse por los métodos mencionados, y la segunda centrándonos en la SM y Cer y en sus ácidos grasos.

1. CARACTERÍSTICAS DE LAS CÉLULAS ESPERMATOGÉNICAS EN ESTUDIO

En la **Figura 1** se pueden observar algunas de las características de las CT y de las poblaciones celulares que se aislaron para su estudio a partir de las CT en el presente trabajo (EP, ER y ET). Se incluyen en la figura los cuerpos residuales (CR), pequeñas partículas acelulares rodeadas de membrana que contienen “restos” de materiales fuertemente compactados para ser descartados, y que se desprenden a partir de las espermatidas durante su elongación en las etapas más tardías de la espermiogénesis. Si bien en la Fig. 1 se comparan las poblaciones celulares al mismo aumento (400X) luego de su tinción con el colorante vital Hoechst 33342, las células se identificaron a mayor aumento por medio de la morfología de sus núcleos, típica de cada tipo celular.

Los EP son células redondeadas de gran tamaño, de entre 18 y 20 μm de diámetro. Su núcleo central es voluminoso y su cromatina se caracteriza por ser finamente granulada. Las ER, también de forma esférica, se pueden diferenciar por su tamaño más pequeño, de entre 10 y 12 μm de diámetro, y por su núcleo central, típicamente redondo y de tinción homogénea, con su cromatina mucho más condensada. Las ET se caracterizan por mostrar distintas fases de elongación y su núcleo, aún más condensado, deja de ser esférico para adoptar distintos estadios morfológicos que culminan con el aspecto falciforme típico de los espermatozoides maduros de rata. Otra peculiaridad de las ET es la de contener inclusiones lipídicas, que en parte corresponden a CR en formación. Por su parte, los CR aislados son partículas muy pequeñas (3 a 5 μm de diámetro) que por contener membranas intracelulares densamente empaquetadas además de numerosas gotas lipídicas, se tiñen fuertemente con el Rojo Nilo (Fig. 1).

En la fila superior de la Figura 1 se incluye una preparación de células intratubulares totales (CT), a partir de las cuales se obtuvieron las poblaciones celulares a estudiar. En ella pueden reconocerse los diferentes tipos de células espermatogénicas descritos. En estas preparaciones más del 70% son espermatidas (aprox. 40% ER y 30% ET), 20-25% son espermatoцитos (principalmente EP) y el porcentaje restante (un 5 a 10%) está constituido por células de Sertoli y espermatogonias.

El reconocimiento de las características morfológicas y nucleares, el hecho de que excluían el yoduro de propidio y el grado de pureza de las fracciones enriquecidas en cada tipo celular, 84%, 90%, y 78% para EP, ER y ET, respectivamente (**Tabla 1**), hicieron aceptables los criterios de viabilidad y pureza en estas preparaciones. La fracción de ET contuvo un 36% de CR. Estas partículas no se consideraron “contaminantes” de las ET, dado que en ellas se forman y desde ellas se liberan (Tabla 1).

2. CARACTERIZACION DE LAS FRACCIONES DE MEMBRANA OBTENIDAS DE CT MEDIANTE EL MÉTODO QUE EMPLEA DETERGENTE EN FRÍO

La herramienta más ampliamente utilizada para el estudio de la distribución lateral de componentes específicos (proteínas o lípidos) entre dominios tipo *raft* y *no-raft* de la membrana plasmática celular consiste en aislar membranas “resistentes a la solubilización en detergente” (DRM) representativas de dichos dominios. Aplicando el protocolo clásico (Brown y Rose, 1992) descrito en Materiales y Métodos, a partir de homogenados de las células espermatozógenas totales (CT) se recuperó una fracción de DRM, cuya composición se analizó en comparación con la de la fracción de membranas solubles en detergente (DSM) (**Figura 2 A**).

Se observaron diferencias entre los perfiles proteicos de los dominios DRM y DSM, en comparación con el homogenado total (HT) de partida y el *pellet* que sedimentó en el fondo de los tubos (**Figura 2 B**). Mientras que en la fracción DRM hubo una mayor abundancia relativa de proteínas de alto peso molecular (más de 100 kDa), en la fracción DSM se observó un enriquecimiento relativo en proteínas de pesos moleculares menores a 100 kDa.

El análisis mediante *Western blot* para caveolina-1 y flotilina-1, dos proteínas marcadoras de microdominios de membrana tipo *raft* y caveolas (Kim *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2011), como se esperaba de acuerdo a la bibliografía mostró que ambas proteínas se concentraron en la fracción DRM, no detectándose cantidades significativas en la fracción DSM y en el *pellet* (**Figura 2 C**). Este resultado fue consistente con el hecho de que la fracción DRM se encuentra enriquecida en este tipo de dominios (Brown y Rose, 1992), y permitió demostrar que el fraccionamiento fue cualitativamente aceptable, además de comprobar la pureza e identidad de los dominios aislados.

2.1. Distribución de la proteína total

Como también se considera aceptable para otras células, en el caso de las CT de rata la fracción DRM contuvo un pequeño porcentaje de la proteína (menos del 10%) originalmente presente en los homogenados totales (HT) (**Tabla 2**). La mayor parte de la proteína total inicialmente se recuperó entre la fracción DSM (un 74%) y el *pellet* insoluble (un 20%). Al comparar el *contenido* de proteína en los HT de partida con el contenido recuperado al sumar la proteína presente en cada una de las tres fracciones obtenidas, la recuperación, un factor indicativo del *rendimiento* del método, fue de un 50%.

2.2. Distribución del fósforo lipídico total

En la **Tabla 2** también se compara la recuperación de fósforo lipídico (P) en cada una de las fracciones (DRM y DSM). Por cada 100 μg de P inicialmente presente en los HT provenientes de CT, se recuperaron en total 62 μg . Considerando esta cantidad total

recuperada como 100% se determinó que el P se distribuyó de la siguiente manera entre DRM, DSM y Pe, 42%, 44% y 14%, respectivamente (Tabla 2), es decir que, a diferencia de lo que sucedió con las proteínas se recuperó una cantidad similar de P en ambas fracciones, aunque el rendimiento se mostró por debajo del 65%.

2.3. Distribución de componentes lipídicos de membrana

Al calcular la concentración de lípidos en pmol por μg de proteína en las fracciones en estudio, la fracción DRM resultó ser la más rica en fosfolípidos, colesterol y esfingomielina (**Figura 3 A**). Con respecto a los fosfolípidos, esto fue consistente con los datos de la Tabla 2, dado que la fracción DRM fue *relativamente* más rica en P lipídico que en proteína, mientras lo contrario ocurrió con la fracción DSM.

Al comparar las relaciones molares entre estos componentes lipídicos entre sí, las relaciones colesterol/fosfolípido y esfingomielina/fosfolípido fueron, como era de esperar de acuerdo con la literatura, más altas en la fracción DRM que en la DSM. Por su parte, mientras la relación colesterol/esfingomielina en la fracción DRM también fue alta, de ≈ 2.5 , un resultado inicialmente muy intrigante fue que en la fracción DSM el valor de dicha relación fue muy superior, de ≈ 37.5 (**Figura 3 B**).

Este resultado encontró su explicación cuando se separaron los fosfolípidos en *clases* (**Figura 4 A**) y se cuantificó la composición (%) en fosfolípidos de cada fracción (**Figura 4 B**). Así, en las placas de TLC, la cantidad de SM en la fracción DRM era visiblemente mayor que la del HT de partida y mucho mayor que la de la fracción DSM, donde era apenas detectable. Al cuantificar el P de las clases, el porcentaje de SM en la fracción DRM fue significativamente (aproximadamente 1.8 veces) mayor que el % de SM presente en el HT de partida, lo cual no era inesperado. En contraste, el % de SM fue varias veces *menor* en la fracción DSM que el originalmente presente en el HT (aproximadamente 3.6 veces), de lo cual resultó una llamativa diferencia (de unas 6.7 veces) en la proporción (%) de SM *entre* las fracciones DRM y DSM.

Esta diferencia tan drástica se podría adjudicar a la activación de esfingomielinasas y otras enzimas hidrolíticas actuando sobre la SM durante el largo tiempo (24 horas) que insume el aislamiento de las fracciones DRM y DSM con este método, ya que en ésta última fracción tanto los lípidos como las enzimas de membrana se encuentran disueltos en el detergente. Lamentablemente un aumento de ceramidas en la fracción DSM no pudo evidenciarse, dada la imposibilidad real de estudiar los lípidos neutros de esta fracción, por estar los extractos lipídicos fuertemente “contaminados” por el detergente que en parte contienen (Fig. 4 A). Sin embargo, una fuerte evidencia adicional de hidrólisis enzimática durante el aislamiento en el medio que contenía el detergente se obtuvo para los GPL. En

los de la fracción DSM se observó, tanto cualitativamente como cuantitativamente, un porcentaje menor de CGP y EGP y un gran incremento en los % de lisofosfolípidos (LPC, LPE) en comparación con la fracción DRM y con el HT de partida.

2.4. Distribución de ácidos grasos de los glicerofosfolípidos

Tal como se podía esperar, la fracción DRM contuvo glicerofosfolípidos con porcentajes mayores de ácidos grasos saturados (principalmente 16:0, también 18:0) y monoenoicos (18:1), y menores de poliinsaturados (20:4, 22:5) que los GPL presentes en la fracción DSM (**Figura 5 A**). La fracción DSM a su vez contuvo GPL más ricos en 20:4 y 22:5 y en los minoritarios VLCPUFA, y relativamente más pobres en ácidos grasos saturados. La relación 22:5/20:4 fue 1.18 en HT y mayor que ésta en las dos fracciones (1.23 en DRM y 1.32 en DSM) (**Figura 5 B**). Estas relaciones sin embargo no difirieron marcadamente entre sí.

Al agrupar los ácidos grasos por su grado de insaturación (**Figura 5 C**), las diferencias entre las dos fracciones, y las diferencias entre cada una de ellas y el HT, si bien fueron significativas, no nos parecieron tan marcadas como para resultar en grandes diferencias en sus propiedades (por ej., las biofísicas). No nos satisfizo la relativamente baja proporción total de ácidos grasos saturados (menos del 50% de los ácidos grasos) de los GPL de la fracción DRM y que ésta fracción presentara una proporción bastante alta de GPL con PUFA (un 30%). En vista de que el Tritón X-100 es un detergente no-iónico, mientras que los lisofosfolípidos y los ácidos grasos libres que se generaron en las muestras durante el aislamiento de las fracciones DRM y DSM tienen el carácter de detergentes iónicos, la solubilización y mezcla de estos anfífilos con el Tritón podría haber contribuido no sólo a favorecer la hidrólisis de los GPL y la SM en las dos fracciones sino también a modificar la distribución de los mismos entre ellas.

3. CARACTERIZACION DE LAS FRACCIONES DE MEMBRANA OBTENIDAS DE CÉLULAS ESPERMATOGÉNICAS MEDIANTE EL MÉTODO QUE EMPLEA HOMOGENIZACIÓN EN AUSENCIA DE DETERGENTE

Los resultados hasta aquí presentados muestran que el método que emplea detergente para la separación de dominios tipo *raft* y *no-raft* a partir de una población de células espermatoogénicas totales (CT) no tendría objeciones para caracterizar la distribución lateral de *proteínas* entre estos dominios, como fue por ej. en nuestro caso la de la flotilina-1. Sin embargo, las dificultades (ver recuadro al final del Capítulo) que presentaba este método al querer aplicarlo a los lípidos de membrana nos llevó a continuar la búsqueda, indagando ventajas y desventajas de otros procedimientos, para finalmente adoptar el método previamente optimizado por Luria y colaboradores (2002), que emplea *lisis* y

homogenización de las células en un medio libre de detergente, para obtener un homogenado total (HT) conteniendo fragmentos de membrana que pueden ser separados entre sí empleando ultracentrifugación en gradientes discontinuos de sacarosa.

Al aplicar este método inicialmente a las células CT, se obtuvieron resultados promisorios, ya que en lugar de dos, se recuperaron tres fracciones de membrana bien definidas de las *interfases* de sacarosa, además de un *pellet* en el fondo de los tubos, como se ilustra en la **Figura 6 A**. Hemos denominado “membranas livianas” (**ML**) a la fracción más pequeña, recuperada en la interfase entre 10% y 22.5%, “membranas pesadas” (**MP**) a la siguiente en tamaño, recuperada en la interfase entre 22.5% y 35%, y “membranas extra-pesadas” (**MEP**) a la relativamente mayor, recuperada en la interfase entre 35% y 40% de sacarosa, y *pellet* (**Pe**) a la que sedimentó en el fondo de los tubos. Las fracciones ML y MP mostraron un color blanquecino, mientras que la fracción MEP fue levemente amarillenta. El Pe presentaba un color blanquecino claro y de características gomosas, probablemente debido al ADN contenido en él, ya que con este método se espera que aquí sedimente la fracción nuclear, entre otras estructuras, como elementos del citoesqueleto. En el caso de las CT, las tres bandas conteniendo fracciones de membrana fueron bien visibles, siendo notorio el incremento de masa, en el siguiente sentido: ML→MP→MEP→Pe. Este orden, claramente aparente en los tubos, se correspondió con el *contenido* de proteína de cada fracción, analizado para proceder al siguiente paso, la separación de sus proteínas aplicando SDS-PAGE.

Como parte de la caracterización de las fracciones de membrana aisladas desde las CT de rata, en la **Figura 6 B** se muestran los perfiles proteicos de las cuatro fracciones de membrana en comparación con el homogenado total (HT) de partida, habiendo sembrado en los cinco casos la misma cantidad de proteína total. En todas las fracciones se encontraron proteínas con pesos moleculares en el rango de entre 40 y 100 kDa. Las fracciones MP y ML presentaron mayor proporción de proteínas de más alto peso molecular (de 100 a 250 kDa) que la fracción MEP, la cual a su vez contuvo una mayor proporción de proteínas de más bajo peso molecular, sobre todo pesos cercanos a 30 y 10 kDa. Por su parte, en el *pellet* celular (Pe) si bien se detectaban proteínas de alto peso molecular, las proteínas de entre 30 y 10 kDa se encontraron notablemente concentradas.

Para determinar la identidad y el grado de pureza de las fracciones de membrana mencionadas, se estudió la distribución de proteínas consideradas marcadoras de diferentes dominios de membrana, en ellas y en el HT de partida, mediante *Western blot*. En la **Figura 6 C** se presenta la distribución de la flotilina-1 y la caveolina-1, marcadoras de dominios *raft/caveolas*. Ambas proteínas se detectaron sólo tenuemente en la fracción de membranas pesadas (MP) y extra-pesadas (MEP), apareciendo notablemente concentradas en la

fracción de membranas livianas (ML). Tomando como base de comparación la densidad de ambas proteínas en el homogenado total (HT) de las CT del cual se partió, y asignando a ésta el valor de 1.0, la densidad de ambas proteínas en la fracción ML fue entre 3 y 4 veces superior. Esto demostró que la pequeña fracción ML se encontraba enriquecida en dominios de membrana tipo *raft*/caveolas.

Una proteína también ubicada en la membrana plasmática, marcadora de dominios *no-raft* por estar ausente de los dominios *raft* es el receptor de transferrina (TfR). Cuando se la utilizó para evaluar las fracciones de membrana obtenidas de los HT provenientes de las CT de rata, la fracción MP resultó ser la más marcada (casi 6 veces la concentración observada en el HT) (**Figura 7**). El TfR fue prácticamente indetectable en las fracciones MEP y Pe, exhibiendo densidades aún menores que la presente en el HT. Tomados en conjunto, los resultados de las proteínas marcadoras de dominios *raft* y *no-raft* utilizadas indican que las fracciones ML y MP son principalmente contribuidas por las membranas plasmáticas de las células espermatogénicas en estudio.

Mediante el uso de una serie de marcadores enzimáticos y microscopía, previamente se había demostrado que la fracción heterogénea que aquí denominamos MEP contiene un conjunto de membranas derivadas de organelas intracelulares, incluyendo retículo endoplásmico, aparato de Golgi, mitocondrias y lisosomas (Monneron y D'Alayer, 1978a, b). En nuestras preparaciones el receptor de estrógeno acoplado a proteína G (GPR30) y la calnexina, dos proteínas marcadoras de retículo endoplásmico (Williams, 2006; Otto *et al.*, 2008), se encontraron concentradas en la fracción MEP (Figura 7), como era de esperar para una fracción que contiene principalmente membranas de origen intracelular. La escasa detección de GPR30 y calnexina en las ML y las MP indica que estas dos fracciones fueron aisladas con un aceptable grado de pureza.

Los alentadores resultados obtenidos con las CT nos animaron a aplicar este método de separación de fracciones de membrana a células espermatogénicas en estadios específicos de su diferenciación, eligiendo para ello los estadios de espermátocitos en paquiteno (**EP**), espermátidas redondas (**ER**) y espermátidas elongadas o tardías (**ET**) (**Figura 8**). En los tres estadios celulares, la flotilina-1 se concentró principalmente en la pequeña fracción ML, una indicación de que las fracciones de membrana purificadas mediante el método que aquí denominamos "libre de detergente" conservan su identidad, esto es, se asemejan entre sí, en todos los tipos celulares estudiados. Como en el caso de las CT, para células en cada uno de estos tres estadios, la comparación cuantitativa de los datos obtenidos de los *Western blot* se hizo midiendo la densidad de flotilina-1 en cada fracción en comparación con la presente en el homogenado total (HT) de partida. En todos los casos, la fracción de ML fue la más altamente enriquecida en flotilina-1. Una

comparación entre los tres estadios permitió observar que la abundancia de microdominios ricos en flotilina-1 en la fracción ML fue claramente superior en los EP, y que dicha abundancia mostró una tendencia a disminuir en las células con el avance de la diferenciación (EP>ER>ET).

3.1. Distribución de la proteína total

En la **Tabla 3** se compara el contenido de proteína recuperado en los homogenados totales (HT) y en las fracciones ML, MP, MEP obtenidas tanto de las muestras de células espermatoogénicas totales (CT) como de las de preparaciones conteniendo células germinales en los estadios EP, ER y ET de su diferenciación. En el caso de las CT, la distribución de la proteína entre fracciones de membrana mostró que cada 100 mg de proteínas iniciales en los HT, se recupera menos de 1 mg de las ML, mientras que se recuperan 10 mg y 26 mg de MP y MEP, respectivamente. Finalmente, el *pellet* (Pe) contribuyó con 38 mg al rendimiento final que fue de 75% (75 mg cada 100 mg de HT). La recuperación de la proteína total a partir de las CT por el método “libre de detergente” (Tabla 3) fue muy superior (25% mayor) a la obtenida por el método que emplea detergente (Tabla 2).

En los tres estadios de la diferenciación EP, ER, y ET, la recuperación del contenido de proteína mostró que sumando la contribución de las cuatro fracciones de membrana analizadas (ML, MP, MEP y Pe) tiene algunas variaciones, ya que en EP y ER se recuperó casi el 90% de la proteína presente en el HT de partida, mientras que en las ET se recuperó una cantidad similar a las CT (71%).

EP, ER y ET también se distinguieron en la distribución % de la proteína total entre las fracciones de membrana. Las ML fueron en todos los casos las que menos proteína aportaron, pero con valores diferentes entre las células, 0.3%, 1%, y 0.9% de la proteína total en EP, ER y ET, respectivamente. Por su parte, las MP contribuyeron con un 11.9%, 23% y 11.6%, mientras que las MEP lo hicieron con 36.6%, 41% y 25.1%, respectivamente.

3.2. Recuperación y distribución del fósforo lipídico total

Dada la preocupación que nos había generado la posibilidad de perder lípidos de membrana por hidrólisis enzimática durante las largas horas que requieren los aislamientos de las fracciones de membrana, antes de utilizar el protocolo descrito por Luria y colaboradores (2002) se había procedido a hacer algunas exploraciones preliminares, una de las cuales fue elegir el *buffer* de lisis más apropiado para la preparación de los homogenados celulares. Para ello se partió de CT, se utilizaron paralelamente los *buffers* de lisis TKM y TNE (cuya composición se especifica en la sección Materiales y Métodos) para preparar los HT, se aislaron las fracciones de membrana en cada medio simultáneamente, y

se prepararon extractos lipídicos, cuyos perfiles lipídicos se compararon por TLC (**Figura 9**). Las proporciones de GPL y lípidos neutros mayoritarios no mostraron diferencias aparentes por el uso de uno u otro *buffer*. Por el contrario, tanto en la fracción MP como en la MEP fue notoria, a simple vista, la presencia de una mayor proporción de LPC (y de DAG) en las muestras en las cuales se había empleado el *buffer* de lisis TKM. Otra desventaja del uso de este *buffer* en la etapa de la lisis celular fue la notable *disminución* de la proporción de SM, evidente en las dos fracciones de membrana, el cual se vio reflejado en un aumento en la proporción de Cer. Tomados en conjunto, estos datos indicaron que el *buffer* TKM favorece la generación artefactual de metabolitos lipídicos en cantidades que no suelen encontrarse habitualmente en estas células (Oresti *et al.*, 2010b), quizás atribuible a que contiene iones bivalentes. Por este motivo es que se eligió el *buffer* de lisis TNE para preparar los HT de todas las células en estudio en la presente tesis.

En la **Tabla 4** se compara la recuperación de fósforo lipídico (P), tanto el rescatado en cada una de las fracciones de membrana en estudio, como el total correspondiente a su suma. Empezando por los resultados obtenidos con CT, pudimos ver que, por cada 100 µg de P inicialmente presente en los HT de las mismas, 80 µg pudieron recuperarse al sumar los µg de P presentes en las fracciones ML, MP, MEP y Pe. Esto es, la recuperación del P lipídico luego del fraccionamiento con respecto al P que había en el HT de partida fue del 80%, implicando una diferencia de sólo un 20% con respecto a éste último.

Considerando esta cantidad total recuperada como 100% para determinar la *distribución* del P *entre* las fracciones de membrana que se recuperaron de los gradientes, la fracción conteniendo ML representó tan sólo el 1.4%, las fracciones MP y MEP aportaron el 21.8% y el 31.3% respectivamente a ese total, mientras el porcentaje mayoritario, 45.6%, quedó en el *pellet*.

En los tres estadios de la diferenciación evaluados, EP, ER, y ET, la recuperación del contenido de P al sumar la contribución de las cuatro fracciones de membrana analizadas (ML, MP, MEP y Pe) mostró un comportamiento similar al de las CT, ya que en todos los casos alcanzó, en promedio, el valor de 80 µg de P por cada 100 µg de P originalmente presente en el correspondiente HT. Por ello, podemos decir que el rendimiento del presente método, en nuestras manos, fue del 80% en promedio (Tabla 4).

Para EP, ER y ET, la *distribución* % del P lipídico total recuperado al sumar el P presente en cada una de las fracciones de membrana en estudio mostró que las ML representaron en los tres casos la fracción más pequeña, 1.1%, 1.3%, y 1.9% del P total, respectivamente. Por su parte, las MP contribuyeron con un 27.0%, 23.5% y 24.5%, respectivamente. Las fracciones ML y MP (que en su mayor parte representan a las

membranas plasmáticas de las células) al ser sumadas, contribuyeron en porcentajes similares al P total recuperado, alcanzando un 28.1%, 24.8% y 26.4% respectivamente.

Un aspecto interesante de la fracción MEP fue que mostró ser la que más se modificó cuantitativamente con la diferenciación, ya que su aporte al total del P lipídico disminuyó notoriamente entre los estadios EP, ER y ET, alcanzando valores de 49.1%, 39.4% y 29.3% del total del P respectivamente. Esta diferencia es consistente con el hecho de que el volumen y el tamaño de estos tipos celulares disminuyen con la diferenciación en el orden EP>ER>ET. Este orden es también consistente con el hecho de que la fracción MEP contiene membranas de estructuras intracelulares como el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi, las cuales son mucho más desarrolladas en los EP que en las ER, y en éstas más que en las ET (Russell y de França, 1995).

Si consideramos la suma del P lipídico presente en las fracciones ML+MP como contribuido principalmente por las membranas plasmáticas de las células, la *distribución* del P exclusivamente *entre* estas dos fracciones permite inferir que, en las membranas plasmáticas de poblaciones de EP, ER y ET, la contribución porcentual de la fracción ML a las mismas aumenta con la diferenciación (4.0%, 5.1% y 7.1% de las respectivas sumas ML + MP, **Figura 10**).

Excluyendo la fracción Pe, si consideramos que el P lipídico en (ML+MP) representa el aportado por las membranas plasmáticas y el presente en MEP es el aportado por membranas intracelulares, la contribución de ML+MP se incrementó con la diferenciación hasta casi alcanzar la mitad de ese total: 36.4% en EP, 38.6% en ER, y 47.7% en ET. Este incremento puede explicarse por el aumento en la relación superficie/volumen que experimentan las células espermatoogénicas a medida que se diferencian y disminuye su tamaño.

3.3. Actividad específica de la 5' nucleotidasa

La 5' nucleotidasa se examinó en las fracciones de membrana en estudio por ser una enzima característica de los dominios tipo caveolas (Kittel y Bácsy, 1994). Utilizando como partida homogenados totales (HT) obtenidos a partir de células totales (CT), tanto la fracción DRM obtenida con el método que emplea detergente, como la fracción ML obtenida con el método "libre" de detergente, presentaron la mayor actividad específica de la enzima, siendo ésta 5 y 9 veces mayor, respectivamente, que en el HT de partida (**Tabla 5**).

El enriquecimiento en 5' nucleotidasa, así como el registrado previamente en caveolina-1 y flotilina-1, tanto en los DRM como en las ML provenientes de las CT, indica que ambas fracciones de la membrana plasmática comparten la propiedad de estar enriquecidas en dominios *raft*/caveolas. Características similares se observaron en las

fracciones de membrana obtenidas de las tres estirpes de células espermatogénicas estudiadas (EP, ER y ET, Tabla 5), encontrándose en todos los casos la más alta actividad específica de 5' nucleotidasa en la fracción ML.

Si bien la actividad específica fue máxima en la fracción ML (9-13 veces mayor en relación a la de los correspondientes HT), también se detectó actividad en la fracción MP (2.5- 3.5 veces mayor que en los correspondientes HT). En contraste, la actividad específica de la 5' nucleotidasa de la fracción MEP fue la más baja en todos los casos, incluso aún más baja que la de los correspondientes HT. Estos resultados fortalecen la idea de que la voluminosa fracción MEP concentra membranas intracelulares, y que está casi libre de contaminación con fragmentos de membrana plasmática. Actividades similarmente bajas o aún menores que en la fracción MEP se detectaron en la fracción Pe. La actividad específica también mostró un nivel muy bajo (< 2.0) cuando se la midió en la fracción DSM obtenida con el método que emplea detergente, lo cual es coincidente con la baja actividad de esta enzima en las fracciones de membrana *distintas* de las ML y las MP obtenidas por el presente método.

Llamativamente, al comparar la distribución de la actividad enzimática *entre* ML y MP para las células EP, ER y ET mediante el cálculo de la relación ML: MP, ésta dio un resultado muy similar, de alrededor de 4:1, en cada uno de los tres estadios de diferenciación celular. Tomados en conjunto, los presentes resultados y los que describen la distribución de las proteínas marcadoras de las fracciones ML y MP respaldan nuestra interpretación de que estas dos fracciones contienen mayormente fragmentos de membrana representativos de la membrana plasmática de las células en estudio.

3.4. Niveles y proporciones de componentes lipídicos en fracciones de membrana

• En CT

La *concentración* de fosfolípidos (FL), colesterol (Col) y esfingomielina (SM) en los HT y en cada una de las fracciones de membrana procedentes de las CT, expresada en relación al contenido de proteína, se presenta comparativamente en la **Figura 11 A**. En el conjunto de células CT, por cada μg de proteína, la fracción ML fue la que presentó la *mayor* cantidad de FL, Col y SM, esto es, los tres componentes lipídicos se encuentran altamente concentrados en la pequeña fracción ML. La concentración de los tres componentes fue significativamente mayor en ML que en MP, y en ésta, a su vez, mayor que en MEP. En vista de que la cantidad absoluta, tanto de lípidos como de proteína, *augmentaron* en el orden ML→MP→MEP, la disminución de la concentración de lípidos descrita implica que, en ese mismo orden, la proteína aumenta relativamente más que los lípidos.

Independizándonos de la proteína, podemos ver diferencias interesantes entre las fracciones de membrana al comparar las *relaciones* molares entre los componentes lipídicos (**Figura 11 B**). Así, la relación Col/FL fue significativamente menor en la fracción ML que en la MP, lo cual fue llamativo porque aparentemente contradice la creencia, generalmente aceptada, de que los dominios tipo *raft* son más ricos en colesterol que los *no-raft*. Lo contrario ocurrió con la relación SM/FL, dado que fue mayor en la fracción ML que en la MP. Los datos de la Fig. 11 B permiten calcular que la relación Col/SM es cercana a 2.0 en la fracción ML y cercana a 5.0 en la fracción MP. Estos valores son consistentes con el valor de ≈ 2.5 calculado para la relación Col/SM en la fracción DRM (Fig. 3 B).

En las CT, de los datos de la Fig. 11 B, surge que cuando se usa el método libre de detergente, la relación Col/SM es de ≈ 3.0 para la fracción MEP. En comparación, cuando se usa el método que emplea detergente, de los datos de la Fig. 3 B surgiría que en la fracción DSM la relación Col/SM es cercana a ≈ 37.0 . Dado que el colesterol es estable, este insólito valor puede atribuirse a la importante pérdida de SM que tiene lugar en esta última fracción (Fig. 4).

- **En EP, ER y ET**

La *concentración* de FL, Col y SM en cada fracción de membrana obtenida a partir de células en cada uno de los tres estadios de la diferenciación en estudio, EP, ER y ET, expresada en relación al contenido de proteína, se compara en la **Figura 12 A**.

Centrándonos primero en la fracción ML, vemos que en ella tanto la concentración de FL, como de Col, como de SM, fue máxima en EP, y *disminuyó* con la diferenciación (EP>ER>ET).

Para la fracción MP, los tres componentes incrementaron su concentración entre EP y ER, alcanzando en este estadio sus valores máximos, para disminuir nuevamente entre ER y ET (EP<ER>ET).

MEP fue la fracción de membrana con *menor* concentración de FL, Col, y SM, por μg de proteína en EP, ER y ET, lo que coincide con el hecho de que el contenido en proteína de esta fracción fue el más alto en los tres tipos celulares. En ella la variación de concentración de los tres componentes con la diferenciación fue similar a la de las MP (EP<ER>ET).

Centrándonos a continuación en la distribución de *cada uno* de estos tres componentes lipídicos *entre* las fracciones ML y MP de membrana en función del desarrollo, los resultados mostraron diferencias interesantes.

►En los EP, la concentración de FL/ μg de proteína fue significativamente *mayor* en la fracción ML que en la MP (1.7 veces). En las ER y en las ET, dicha concentración fue casi *igual* entre las fracciones ML y MP.

►En los EP, la concentración de Col/ μg de proteína también fue significativamente mayor en la fracción ML que en la MP (1.3 veces). Por el contrario, en las ER y en las ET, llamativamente, dicha concentración fue mucho *mayor* en las MP que en las ML (1.5 veces).

►En los EP, la concentración de SM/ μg de proteína en ML fue 2.0 veces mayor que en MP, mientras que en las ER y ET fue unas 1.2 veces mayor.

De estas observaciones se puede resumir que en los EP las fracciones ML son más ricas en FL y Col que las MP, mientras que en las ER y ET ocurre exactamente lo contrario: son las MP las que se enriquecen en FL y en Col.

La alta concentración de Col y de SM es una propiedad característica de los microdominios tipo *raft* en la membrana plasmática. Fue por lo tanto interesante observar que en la fracción ML, representativa de esos dominios, la relación Col/SM se mantuvo relativamente más constante con el desarrollo (1.9→2.2→2.5) que en la fracción MP, representativa de los dominios *no-raft*, donde esta relación aumentó netamente (2.8→4.2→4.9), durante la progresión EP→ER→ET. Una tendencia similar se observó para la relación Col/FL (**Figura 12 B**).

Finalmente, las *relaciones* o *ratios* entre las concentraciones de FL, Col y SM por μg de proteína entre las fracciones ML y MP (ML/MP) para cada tipo celular, calculadas a partir de los datos de la Figura 9 como una manera de visualizar una aproximación a su distribución *lateral* en la membrana plasmática mostró lo siguiente:

Relación ML/MP	EP	ER	ET
Fosfolípidos	1.65	0.99	0.97
Colesterol	1.31	0.64	0.66
Esfingomielina	2.04	1.25	1.27

Es necesario recordar que una relación de 2.0 no significa que haya dos veces más SM en ML que en MP, sino que la *concentración* de SM en las pequeñas ML es 2 veces mayor a la concentración de SM en las mucho mayores MP.

3.5. Clases de fosfolípidos en, y su distribución entre, fracciones de membrana

- **En CT**

La composición en fosfolípidos en homogenados totales (HT) y en tres fracciones de membrana (ML, MP y MEP) obtenidas a partir de estas células se compara cualitativamente en la **Figura 13 A** y cuantitativamente en la **Figura 13 B**. Las preparaciones de CT normalmente contienen una muy baja cantidad de lisofosfolípidos. Estos productos tienden a aumentar debido a la hidrólisis parcial de los FL durante los procedimientos de homogenización y aislamiento de las fracciones de membranas. Sin embargo, cabe destacar que en los HT preparados a partir de CT con el presente método libre de detergente las proporciones de lisofosfolípidos fueron muy escasas (menos del 1%) y que las tres fracciones de membrana contuvieron proporciones que, si bien fueron algo mayores que las del HT, aún fueron pequeñas (1.2-3.5% de LPC y LPE). Estos resultados fueron muy satisfactorios, en comparación con los obtenidos previamente para los fosfolípidos, tanto de los HT como de las fracciones de membrana obtenidas, luego de emplear el método que implica el uso de detergente (Figs. 4 A y 4 B).

En las tres fracciones de membrana en estudio, los FL mayoritarios fueron los CGP, seguidos por los EGP y por la SM (Fig. 13 B). Sobre la base de los porcentajes, y en comparación con el HT de partida, la fracción ML contuvo relativamente menos GPL y más SM que las otras dos fracciones de membrana, MP y MEP. Así, la relación entre estos dos FL de colina (SM/CGP), fue de alrededor de 0.42, 0.22 y 0.18 en ML, MP y MEP, respectivamente. Esto nuevamente destacó el enriquecimiento en SM de la fracción ML, conteniendo los dominios tipo *raft*. De representar tan sólo un 5.7% de los fosfolípidos en el HT de partida, la SM alcanzó el 15.4% de los FL totales en ML, un 10.3% en MP, y un 8.9% en MEP. Además de en SM, la fracción ML estuvo también relativamente enriquecida en fosfatidilserina (PS) con respecto a las otras dos fracciones. Representando sólo un 4% de los fosfolípidos totales en el HT, la PS alcanzó el 12% de los mismos en ML, un 10% en MP, y un 4.6% en MEP.

El porcentaje de difosfatidilglicerol (DPG), también conocido como cardiolipina, representó el 2.1% de los FL del HT. A la inversa de los dos fosfolípidos recién nombrados, fue apenas detectable en las ML (0.2%), su proporción fue del 1.6% en las MP, y aún mayor, del 4.3%, en las MEP (Fig. 13 B). Dado que el DPG suele encontrarse concentrado en la membrana mitocondrial interna, este enriquecimiento relativo es consistente con la idea de que la fracción MEP contiene membranas derivadas de estructuras y organelas intracelulares.

- **En EP, ER y ET**

En términos generales, los tres estadios celulares mostraron un patrón de distribución porcentual de clases de fosfolípidos similar al recién descrito para las CT. Es decir, con pequeñas diferencias entre las células en cada estadio, los CGP y EGP, seguidos por la SM, fueron los FL mayoritarios de los HT y de las tres fracciones de membrana en estudio (**Figura 14**). Con respecto a los respectivos HT de partida, en los tres estadios celulares la fracción de membranas ML mostró contener significativamente más SM y menos CGP. La relación SM/CGP, de ser de ≈ 0.5 en las ML de los EP, disminuyó a ≈ 0.3 en las ML de las ER y de las ET. La fracción MP demostró una tendencia similar, pues dicha relación, de ser ≈ 0.33 en los EP, disminuyó a ≈ 0.25 en las ER y las ET. Estas relaciones no implican disminuciones cuantitativas, sólo indican que en las dos fracciones representativas de la membrana plasmática, la SM aumentó *menos* que los CGP durante la diferenciación. Al contrario de ML y MP, en la fracción MEP la relación SM/CGP aumentó, desde ≈ 0.14 en los EP hasta ≈ 0.25 en las ER y ET. Ello indica que en la fracción MEP la proporción de SM aumentó relativamente más que la de CGP con el avance de la diferenciación.

Tal como se detalló más arriba para las ML de las CT, la fracción ML de células en cada uno de los tres estadios celulares estuvo enriquecida, además de en SM, en PS. La SM, de representar (en promedio) un 5% de los fosfolípidos en los tres HT de partida, alcanzó el 16% de los FL totales en las ML de los EP, y un 13% en los de las ML de ER y ET. Por su parte la PS, de un 4% (en promedio) de los fosfolípidos totales en los HT, alcanzó valores de $\approx 13\%$ de los FL de la ML en los tres tipos celulares. En otras palabras, ambos fosfolípidos mostraron porcentajes menores en MP y MEP que en ML. También como se detalló para las MEP de las CT, la fracción MEP de los tres tipos celulares fue comparativamente más rica en DPG que las fracciones ML y MP.

Cabe mencionar que en el caso de EP, ER y ET se encontraron porcentajes similares de lisofosfolípidos (LPC, LPE), tanto al comparar los HT como las fracciones de membrana entre sí. Así, cada lisofosfolípido representó $\approx 1\%$ de los FL totales (en promedio) en los HT de partida y un $\approx 3\%$ de los FL totales cada uno (en promedio) por fracción de membranas (más LPE que LPC). La diferencia entre los HT y las fracciones, que fue del mismo orden para todas las preparaciones, indica que estos lisofosfolípidos se generaron durante los procedimientos del fraccionamiento subcelular.

3.6. Ácidos grasos de glicerofosfolípidos de fracciones de membrana

- **En CT**

Al analizar la composición de AG de los GPL totales en las fracciones ML, MP y MEP obtenidas de CT, observamos que la fracción ML contenía GPL ricos en ácidos grasos

saturados (SFA), predominantemente el 16:0 (80%) y bastante menos el 18:0 (6%), y pobres en ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) como el 20:4n-6 o el 22:5n-6 (que al ser sumados representaron un 8%) (**Figura 15 A**). En cambio, en los GPL de las fracciones MP y MEP se encontraron proporciones altas (y similares, de \approx 40% cada uno) de los ácidos grasos saturados y PUFA mencionados.

El hecho de que en la fracción ML la suma de los SFA representó más del 80% de los AG de los GPL (**Figura 15 C**) sugiere que en ella abundan especies moleculares disaturadas de GPL (predominantemente la dipalmitoil-PC, considerando el predominio de CGP en esta fracción, Fig. 13). En las MP y en las MEP, los porcentajes de 16:0 y 18:0 por una parte, y los de 20:4 y 22:5 por otra, indican que en ambas fracciones abundaron las especies palmitoil-araquidonoil- y palmitoil-docosapentaenoil- de GPL de colina y de etanolamina. La relación 22:5n-6/20:4n-6 fue significativamente mayor en la fracción MP que en la fracción MEP (**Figura 15 B**). Los GPL de las tres fracciones contuvieron porcentajes bajos de AG monoenoicos (MFA), dienoicos (DFA) y VLCPUFA (**Figura 15 C**).

Comparando el perfil de ácidos grasos de los GPL totales de la fracción ML obtenida por el presente método (Figura 15) con el de los GPL totales de la fracción DRM obtenida con el método anterior (Figura 5), podemos concluir que en el presente caso la separación lateral entre fracciones de membrana fue mucho más clara y patente. Así, mientras en las presentes ML observamos un 85% de SFA, en los DRM ese porcentaje si bien había sido alto, era mucho menor (43.5%). Mientras en las presentes ML la suma de PUFA representó un escaso 8%, en DRM había alcanzado un valor mucho más alto (35%) de los AG de los GPL.

- **EP, ER y ET**

La composición en AG (%) de los GPL de las tres fracciones de membranas (ML, MP y MEP) obtenidas de poblaciones de células en cada uno de estos tres estadios de diferenciación se comparan en la **Figura 16**. En la **Figura 17** se presentan las sumas de estos AG, agrupados de acuerdo con su grado de insaturación.

En la fracción ML, la composición de AG de los GPL no mostró diferencias significativas entre EP, ER y ET. En los tres estadios celulares, los GPL de esta fracción de membranas se encontraron enriquecidos en SFA, preponderando el 16:0, seguido muy por debajo por el 18:0. Los porcentajes de estos dos AG en la fracción ML, sumados, superaron el 90%. En ninguna de las poblaciones celulares analizadas la fracción ML contuvo cantidades significativas de 22:5n-6, y sólo se detectaron proporciones traza de otros PUFA y de VLCPUFA.

En contraste, en los GPL de las fracciones MP y MEP de los tres tipos celulares, la proporción de SFA, mayoritariamente el 16:0 y 18:0 (sumados, \approx un 50%) y de PUFA, mayoritariamente el 20:4n-6 y el 22:5n-6 (sumados, también alrededor de un 50%) fue similar.

En conjunto, estos resultados señalan que, independientemente del tipo celular, en las fracciones ML predominaron las especies moleculares disaturadas de GPL, dada su absoluta riqueza en SFA, mientras en las fracciones MP y MEP lo hicieron las especies moleculares tetraenoicas y pentaenoicas de GPL, dadas sus proporciones similares de SFA y PUFA.

Entre los PUFA de los GPL de MP y MEP, se observaron proporciones importantes de 20:4n-6 y 22:5n-6, aunque diferentes entre las dos fracciones. Así, en los tres tipos de células espermatogénicas, el 20:4n-6 fue proporcionalmente más abundante en los GPL de las MEP que en los de las MP, mientras lo opuesto ocurrió con el 22:5n-6. Este último fue por lo tanto el PUFA predominante de los GPL de las *membranas plasmáticas* de las células espermatogénicas durante los tres estadios.

Con respecto a los efectos de la diferenciación celular sobre los PUFA de GPL de las MP y las MEP, fue interesante observar que, en el orden EP→ER→ET, la relación 22:5n-6/20:4n-6 aumentó significativamente en las dos fracciones de membrana, pero mucho menos intensamente en los GPL de la fracción MEP (0.6→1.1→1.6) que en los de la MP (1.2→1.6→2.8).

4. ESFINGOMIELINA, CERAMIDA Y SUS ÁCIDOS GRASOS

Una característica distintiva de algunos de los esfingolípidos de las células espermatogénicas de roedores, como es el caso de la SM y la Cer, es su alto contenido en VLCPUFA, en sus versiones no hidroxiladas (n-V) y 2-hidroxiladas (h-V), y el hecho de que los porcentajes de estos ácidos grasos (AG) se incrementan con el avance de la diferenciación (Oresti *et al.*, 2010b). Uno de los puntos centrales de este capítulo fue conocer la *distribución* de las especies moleculares de SM y Cer *entre* las fracciones de membrana en estudio, aisladas de las células espermatogénicas de rata. Recapitulemos que el objetivo estaba enfocado sobre la distribución *lateral* de las especies de SM y Cer conteniendo n-V y h-V entre los dominios tipo *raft* y *no-raft*, y determinar si dicha distribución se modifica durante la diferenciación.

4.1. Ácidos grasos de SM y Cer en DRM y DSM

En la **Figura 18** se comparan las composiciones de AG de la SM y la Cer recuperadas de las fracciones aisladas a partir de CT por el método que emplea detergente.

SM de DRM y DSM. Las SM de la fracción DRM tuvieron al 16:0 como AG mayoritario (34%) (**Figura 18 A**). Sumado a otros ácidos grasos saturados (SFA), como el 18:0, esta SM concentró principalmente SFA (un 67%) (**Figura 18 B**). Esto se esperaba para esta fracción, que se supone rica en dominios tipo *raft*. Sin embargo, como *no* estaba previsto, los DRM también contuvieron en su SM porcentajes importantes de VLCPUFA, en sus versiones n-V y h-V. El orden de abundancia de n-V fue $n28:4n-6 > n30:5n-6 \gg n32:5n-6$ (Fig. 18 A), y entre los h-V el orden fue $h28:4n-6 > h30:5n-6 \gg h32:5n-6$. La *suma* de VLCPUFA en esta SM alcanzó un 27% (Fig. 18 B). Por su parte, la SM de la fracción DSM contuvo menos SFA que ésta y mucho más VLCPUFA (60% de sus AG totales), de los cuales el 36% correspondió a n-V y el 24% a h-V, siendo en este sentido muy parecida su composición a la SM del HT de partida.

Cer de DRM y DSM. Las Cer recuperadas de la fracción DRM contuvieron cantidades similares de 16:0 y 28:4n-6, mientras 30:5n-6 y 32:5n-6 ocuparon el segundo y tercer lugar, esto es, el mismo orden de abundancia que el observado para la SM (Fig. 18 A). Entre los n-V, n28:4n-6 predominó marcadamente sobre n30:5n-6, mientras entre los h-V, la proporción de h28:4n-6 fue similar a la de h30:5n-6. Los minoritarios n32:5n-6 y h32:5n-6 aparecieron en proporciones similares. La *suma* de VLCPUFA en esta Cer alcanzó un 55%. En la Cer recuperada de la fracción DSM, el AG mayoritario fue el 16:0, seguido, en proporciones iguales, por el n28:4n-6 y el n30:5n-6 (Fig. 18 A), correspondiendo a la suma de SFA un 39% y a la suma de n-V un 30% del total de AG (Fig. 18 B). Las Cer de la fracción DSM no pudieron analizarse en su totalidad, contando con datos sólo de las Cer que contienen ácidos grasos no hidroxilados, incluyendo n-V, debido a que el detergente presente en la fracción DSM impidió la recuperación de las Cer con h-V (ver Fig. 4).

4.2. Ácidos grasos de SM y Cer en ML, MP y MEP

Las composiciones porcentuales en ácidos grasos (AG) de la SM y la Cer de cada una de estas tres fracciones de membrana, preparadas por el método libre de detergente, aisladas a partir de CT se presentan en la **Figura 19**. En la **Figura 19 A** se comparan las composiciones (%) de los principales AG, y en la **Figura 19 B** se muestran cinco *grupos* de AG, sumados de acuerdo con sus características (grado de insaturación, longitud de cadena, hidroxilación) de la SM y la Cer de estas tres fracciones de membrana.

En términos generales, podemos decir que entre los ácidos grasos de SM y Cer de las ML prevalecieron los SFA (16:0, 18:0), mientras entre los de las MP y de las MEP, abundaron netamente los VLCPUFA (n-V, h-V). Entre los n-V de ambos lípidos, la abundancia relativa siguió en general el orden, $n28:4n-6 > n30:5n-6 > n32:5n-6$, mientras que

entre los h-V, en cambio, el orden de abundancia relativa tendió a ser h30:5n-6 > h28:4n-6 > 32:5n-6. El lípido más rico en h30:5n-6 fue la Cer de las MEP.

SM de ML, MP y MEP. En la SM de las ML hubo un claro predominio de los AG saturados, especialmente el 16:0, como era de esperar para los dominios de membrana tipo *raft*, y menos de un 10% de otros AG incluyendo VLCPUFA, en su mayor parte n-V. En contrapartida, la SM de las MP contuvo un 35% de n-V y un 15% de h-V, esto es, un 50% de VLCPUFA (Fig. 19 B). Este resultado demostró claramente la separación *lateral* entre las fracciones ML y MP, de las especies con SFA *versus* las especies con VLCPUFA de SM. En comparación, la SM de las MEP contuvo un 20% de n-V y un 15 % de h-V, esto es, un 35% de VLCPUFA.

Cer de ML, MP y MEP. La Cer de la fracción ML fue difícil de estudiar por ser extremadamente minoritaria. La que alcanzó a ser detectada, estuvo compuesta casi únicamente por SFA, con sólo trazas (< 1%) de otros AG. En contrapartida, en la Cer de las MP predominaron ampliamente los VLCPUFA, con porcentajes casi iguales de n-V y h-V, cuya suma alcanzó un valor tan alto como el 72%. Llamativamente, la Cer de las MEP contuvo un 22% de n-V y casi el doble, un 42% de h-V, esto es, un 64% de VLCPUFA.

Tomados juntos, estos resultados permiten concluir que la mayor parte de las especies de SM con VLCPUFA de las CT (*tanto con n-V como con h-V pero en especial con los primeros*), fueron aportadas por la fracción MP, esto es, se concentraron en la membrana plasmática celular. Por su parte, la mayor parte de las Cer con VLCPUFA de estas células (*tanto con n-V como con h-V pero en especial con los últimos*), fueron aportadas por las MEP, esto es, se concentraron en membranas intracelulares.

4.3. Cuantificación de SM y Cer en ML, MP y MEP

Para facilitar la comparación entre la SM y la Cer, las cantidades de SM y Cer recuperadas de las fracciones de membrana obtenidas de las CT se cuantificaron sobre la base de sus ácidos grasos (**Figura 20**). Comparando inicialmente los niveles totales de ambos lípidos, surge que la cantidad total de SM supera en unas 5 veces la cantidad de Cer en los HT de las CT.

Del total de la SM inicialmente presente en esos HT, la cantidad de SM contribuida por la fracción ML fue considerablemente baja (**Figura 20 A**). Ello concuerda con el hecho de que las ML contenían sólo un 1.4% de los FL del total de fracciones de membrana (Tabla 4), y que la SM constituyó el 16% del total de los FL (Fig. 13) presentes en este 1.4%, esto es, esta SM representó un mero 0.22% de los moles de FL totales recuperados.

Por el contrario, la mayor parte de la SM fue aportada por la fracción MP, superando en casi 2 veces la cantidad de SM de la fracción MEP. Si bien la fracción MP contenía

especies de SM con otros AG, en ella predominaron los VLCPUFA. Entre ellos, la suma de especies conteniendo n-V superó holgadamente a la suma de especies conteniendo h-V (3:1, esto es, en ≈ 3 veces). Por su parte en la SM de la MEP tanto la cantidad total de ambas especies como la diferencia entre ellas, fueron menores (**Figura 20 C y D**).

Del total de Cer presente en los HT, la cantidad de Cer contribuida por la fracción ML fue muy baja (Fig. 20 A). De hecho esta Cer, que contenía casi únicamente especies con SFA (**Figura 20 B**), fue tan minoritaria que era difícil de detectar. Por su parte, la cantidad de Cer presente en las MP fue unas 6 veces menor que la de SM. Esta Cer estuvo conformada por algo más de especies con n-V que con h-V, aunque en cantidades más cercanas a 1:1 que en el caso de la SM (Fig. 20 C y D).

La mayor parte de la Cer total recuperada entre las tres fracciones de membranas fue aportada por las MEP (Fig. 20 A). La Cer de esta fracción superó en 2 veces la cantidad de Cer de las MP, y en ≈ 8 veces la cantidad de Cer de las ML. Las especies mayoritarias de la Cer de la MEP contenían h-V. Así, la relación h-V/n-V en esta Cer fue de 4.4:1.0 (Fig. 20 C y D). En esta misma fracción, la relación h-V Cer a h-V SM (de $\approx 1.0 : 1.5$) fue la más alta de las tres fracciones de membranas.

5. ESFINGOMIELINA, CERAMIDA Y SUS ESPECIES MOLECULARES

Antes de analizar las SM y Cer provenientes de las preparaciones de fracciones de membranas celulares, se obtuvieron espectros a partir de muestras de SM y Cer conteniendo n-V y h-V, previamente separadas entre sí y de las especies con otros ácidos grasos a partir de preparaciones de CT de rata. Ello permitió conocer el patrón de fragmentación iónica de cada especie molecular y su valor m/z específico (**Tabla 6**), a través de los cuales se identificaron los picos detectados en las muestras de SM y Cer obtenidas a partir de las 3 fracciones de membranas (ML, MP y MEP) aisladas de EP, ER y ET.

La SM y la Cer de estas células contienen esfingosina (d18:1) como su base esfingoidea, lo que es consistente con lo observado previamente (por métodos químicos) para la SM y Cer de testículo de rata (Furland *et al.*, 2007a). En el presente análisis de MALDI-TOF MS, la SM fue identificada por el producto iónico característico $m/z +184$, correspondiente a la fosfocolina, su cabeza polar. Éste apareció como un pico muy intenso en el patrón de fragmentación iónico de todas las especies de SM analizadas, independientemente del ácido graso, sea éste SFA o VLCPUFA.

En la **Figura 21** se muestra el patrón de fragmentación que se obtuvo para cada una de las especies de SM con VLCPUFA (señales en el rango m/z 850-950 amplificado). Por la presencia del producto iónico de $m/z +184$ en los espectros de MS/MS, se confirma que corresponden a distintas especies moleculares de SM.

Por su parte, la Cer fue identificada por el producto iónico característico m/z +264, correspondiente al peso molecular de la esfingosina + H^+ (- 2 H_2O) (especies doblemente deshidratadas), indicativo de que la Cer se deshidrata para ionizarse [Cer + H^+ (- H_2O)]. Además, durante el análisis pudimos reconocer que se generaron abundantes aductos de sodio [Cer + Na^+]; por ello, la suma de las señales [Cer + H^+ (- H_2O)] + [Cer + Na^+] fue tomada en cuenta para estimar las intensidades relativas de las especies de Cer. En la Figura 21 se muestra el patrón de fragmentación obtenido de las señales en el rango m/z 670-800 atribuibles a especies de Cer con VLCPUFA. En ella se puede observar el pico de mayor intensidad correspondiente a m/z +264 presente en los espectros MS/MS de todas las especies de Cer analizadas.

5.1. Especies de SM y Cer en DRM y DSM de CT

El patrón de especies moleculares de SM observado en los espectros de masas obtenidos de las fracciones DRM y DSM de CT (**Figura 22**) confirmó los resultados obtenidos por GC previamente en este capítulo. Así, la SM de la fracción DRM estuvo enriquecida en especies moleculares saturadas, principalmente d18:1/16:0 SM (m/z 703.5) y d18:1/18:0 SM (m/z 731.6), las cuales fueron encontradas también como aductos de sodio (m/z 725.6 y m/z 753.6, respectivamente). Las especies con VLCPUFA fueron detectadas en bajas intensidades en esta fracción. En contraste, en la SM de la fracción DSM, si bien la señal correspondiente a d18:1/16:0 SM fue la que se detectó con mayor intensidad, asignándosele por lo tanto el 100%, esta fracción contuvo una abundancia relativa importante de las especies moleculares de SM con n-V y h-V. Esto es consistente con el hecho de que la fracción DSM agrupó el conjunto de todas las membranas que fueron solubilizadas por el Tritón X-100.

Los espectros de la Cer recuperada de la fracción DRM mostraron que las señales de mayor intensidad presentaron valores m/z que no coincidieron con ninguno de los asignados a las especies moleculares de este lípido (Fig. 22). Esto se confirmó por la ausencia del producto m/z +264 al analizar los patrones de fragmentación MS/MS de cada una de ellas. Así, los picos marcados con un asterisco (*) en la Fig. 22 se reconocieron como señales iónicas de la matriz, y las señales no identificadas (marcadas con el signo #) es probable que correspondan a trazas del detergente utilizado durante el fraccionamiento. Es por ello que, pese a que se alcanzó a identificar la señal m/z 520.6, correspondiente a d18:1/16:0 Cer, su abundancia relativa quedó subestimada debido a la gran superioridad de las señales interferentes. En la fracción DSM, la Cer no pudo ser analizada, además de por los motivos expuestos aquí, por los explicados previamente en este capítulo (Fig. 4 y Fig. 18).

5.2. Especies de SM y de Cer en las ML, MP y MEP de CT

En la **Figura 23** se muestran los espectros de masas de las especies de SM y Cer detectadas en las fracciones de membranas aisladas a partir de las CT por el método libre de detergente.

SM. Los espectros fueron consistentes con los resultados obtenidos mediante GC en este capítulo, mostrando que la SM de la fracción ML estuvo altamente enriquecida en la especie d18:1/16:0 SM. Por su parte, en las fracciones MP y MEP, además de estas especies, se observó una mayor abundancia relativa de especies de SM con VLCPUFA. Entre éstas se identificaron especies de SM con n-V (coloreadas en rojo), y con h-V (coloreadas en azul) en la Fig. 23. Entre las primeras, d18:1/28:4n-6 (m/z 863.6) y d18:1/30:5n-6 (m/z 889.7) fueron las más abundantes, y entre las segundas, lo fueron d18:1/h28:4n-6 (m/z 879.7) y 18:1/h30:5n-6 (m/z 905.7).

Cer. En las Cer de las tres fracciones de membranas obtenidas de las CT, las señales de mayor intensidad (*) en la Fig. 23 no correspondieron a este lípido, sino a la matriz, en forma similar a lo descrito más arriba al analizar los espectros de las Cer de los DRM. Sin embargo, a diferencia de éstos, en el presente caso los espectros estaban libres de los picos que se habían atribuido en aquél caso a trazas del detergente, y que interferían justo en la zona de m/z de los espectros donde se detectan las Cer con VLCPUFA. En los presentes espectros de Cer se pudo demostrar, no sólo la pequeñez de la intensidad de la especie d18:1/16:0 Cer (m/z 520.6) en las fracciones ML, MP y MEP, sino ver claramente que la fracción ML *no contenía* especies moleculares de Cer con VLCPUFA. Éstas últimas se identificaron en cambio claramente en las fracciones MP y MEP. Al igual que para las SM, en el caso de las Cer, la especie d18:1/28:4n-6 Cer (m/z 680.7) fue la más abundante entre las n-V Cer y la especie d18:1/h30:5n-6 Cer (m/z 706.7) la más abundante entre las h-V Cer.

5.3. Especies de SM y Cer en membranas de EP, ER, y ET

SM. En las fracciones ML, tanto en los EP, como en las ER, como en las ET (**Figuras 24 a 26**), los espectros MS/MS permitieron confirmar la identidad y abundancia relativa de las especies moleculares de SM saturadas (16:0 SM y 18:0 SM), como lo demostró la presencia de d18:1/16:0 SM (m/z 703.5) y d18:1/18:0 SM (m/z 731.6) y sus correspondientes aductos de sodio. En las fracciones MP de células en los mismos tres estadios celulares, si bien las especies de SM con SFA también estaban presentes, el predominio de las especies de SM con n-V (coloreadas en rojo) en los EP, fue confirmada por las intensidades de los picos identificados como d18:1/28:4n-6 y d18:1/30:5n-6 (m/z 863.6 y m/z 889.7, respectivamente).

La diferenciación celular en la dirección EP→ER→ET se asoció con un incremento en la proporción de las especies de SM que contenían h-V (coloreadas en azul), en las MP y en las MEP, predominando entre las h-V SM las especies d18:1/h30:5n-6 (m/z 905.7) y d18:1/h28:4n-6 (m/z 879.7). La magnificación de los espectros de SM para la fracción MP de membrana plasmática de EP, ER y ET permitió detectar dos picos en m/z 917.7 y m/z 933.7 atribuibles a las especies de SM relativamente minoritarias d18:1/32:5n-6 y d18:1/h32:5n-6, los cuales se encuentran señalados en la **Figura 27**.

Cer. En las fracciones ML de EP, ER y ET se detectó, apenas en bajas intensidades, la señal m/z 520.6, correspondiente a trazas de d18:1/16:0 Cer en las ML de los tres estadios celulares (Figs. 24-26). Las fracciones MP, en los tres casos, abundaron en especies de Cer con VLCPUFA, especialmente con n-V (en color rojo) y h-V (en color azul), predominando d18:1/28:4n-6 seguida de d18:1/30:5n-6 entre las primeras e inversamente, d18:1/h30:5n-6 seguida de d18:1/h28:4n-6 entre las segundas. En las MEP, se notó la mayor abundancia relativa de especies de Cer con h-V por sobre las especies de Cer con n-V.

Las proporciones de especies con n-V, tanto de Cer como de SM fueron altas en los EP, mientras que las de especies de ambos lípidos con h-V se incrementaron con la diferenciación celular en la dirección EP→ER→ET, en concordancia con datos previos (Oresti *et al.*, 2010b). Los resultados presentados en este capítulo nos permiten extender esos resultados demostrando que el enriquecimiento en la relación entre h-V y n-V que experimentan ambos lípidos con la diferenciación celular es aportado por diferentes fracciones de membrana: en las SM por las MP, representando principalmente a las membranas plasmáticas y en las Cer por las MEP, representando principalmente a las membranas intracelulares.

Observaciones sobre el método elegido para el fraccionamiento de membranas de células espermatoogénicas

Si bien el método de solubilización en el detergente Tritón X-100 a 4°C ha sido la herramienta más utilizada para el análisis cualitativo de la presencia de proteínas y lípidos en los DRM como fracción representativa de los dominios tipo *raft* de las membranas (plasmática o intracelulares), en los últimos años se ha generado una importante controversia en torno al mismo, recibiendo críticas y preocupaciones respecto a la posibilidad de discriminar entre lo que realmente está presente en la membrana celular y lo que puede generarse artefactualmente en el laboratorio (Aureli *et al.*, 2016).

En la primera parte de este capítulo observamos que la distribución de las principales clases de GPL, SM, Cer y sus AG efectivamente se vio alterada en las fracciones aisladas a partir de CT con este método. Por ejemplo, en la fracción DRM, si bien como se esperaba predominaron el Col y las especies de SM y de GPL con AG *saturados*, sospechosamente se encontraron también proporciones relativamente elevadas de especies de SM con VLCPUFA y de GPL con PUFA. Además, las cantidades de fósforo lipídico y proteína total recuperadas al sumar las fracciones DRM y DSM (aún incluyendo las cantidades presentes en los *pellets* residuales), fueron mucho menores que en las células enteras previo al fraccionamiento, sugiriendo que parte de los FL y proteínas habían sido degradados, incluyendo procesos de hidrólisis, durante el aislamiento de los DRM, que en el caso de los lípidos pudimos comprobar por la aparición de porcentajes inusualmente elevados de lisofosfolípidos. Esto motivó que la composición porcentual en fosfolípidos fuese totalmente inusual en ambas fracciones. Así, la fracción de los DRM presentó una inesperadamente elevada relación EGP/CGP, y la fracción DSM también estuvo notablemente alterada en su composición, con disminuidos porcentajes de CGP, EGP y SM (y concomitante aumento de Cer). Estos resultados sugieren que diferentes fosfolipasas (incluida una esfingomielinasa) se vuelven libremente activas, ya sea durante la solubilización con Tritón X-100 o durante las largas horas de centrifugación en presencia del detergente que se requiere para aislar los DRM (pese a la baja temperatura). Por otra parte, a la actividad solubilizante de enzimas asociadas a membranas que posee el Tritón X-100 como detergente no-iónico, se le suma la presencia de los detergentes zwitteriónicos (LPC, LPE y AGL) generados endógenamente en las muestras en forma artefactual. Otra dificultad importante que enfrentamos con el método que emplea este detergente fue que debido a que tiene una concentración micelar crítica (CMC) muy baja (0.22-0.24 mM), es difícil de remover de las soluciones acuosas, y por ser un detergente no polar bastante hidrofóbico, tiende a extraerse con los lípidos, contaminando los extractos lipídicos y por lo tanto dificultando la separación acostumbrada de algunos de los lípidos que solubiliza (en nuestro caso las Cer que esperábamos analizar).

Por último, su utilización afectó adversamente la *recuperación* tanto de fosfolípidos como de proteínas. Para finalizar, también encontramos señales inesperadas en las muestras que habían sido extraídas con este método en la espectrometría de masas, sobre todo en las Cer.

Por lo tanto, sin desmerecer la popularidad que tiene en la comunidad científica el uso de los DRM como herramienta cuando el propósito es enfocarse en el estudio de los componentes *proteicos* de los dominios *raft/caveolas* de membrana, los resultados obtenidos en el presente Capítulo a partir de CT con este método en comparación con el método libre de detergente permitió elegir el segundo como el más apropiado para el estudio de los *lípidos* y su distribución entre fracciones de membrana. Éste último método permitió mantener una aceptable integridad de las fracciones de membrana de las células espermatogénicas, tanto desde el punto de vista cuantitativo, como lo manifestó la importante recuperación de fósforo lipídico y proteína totales al sumar los contenidos de las fracciones, como cualitativo, como lo reveló la buena preservación de los VLCPUFA de las especies de SM y Cer.

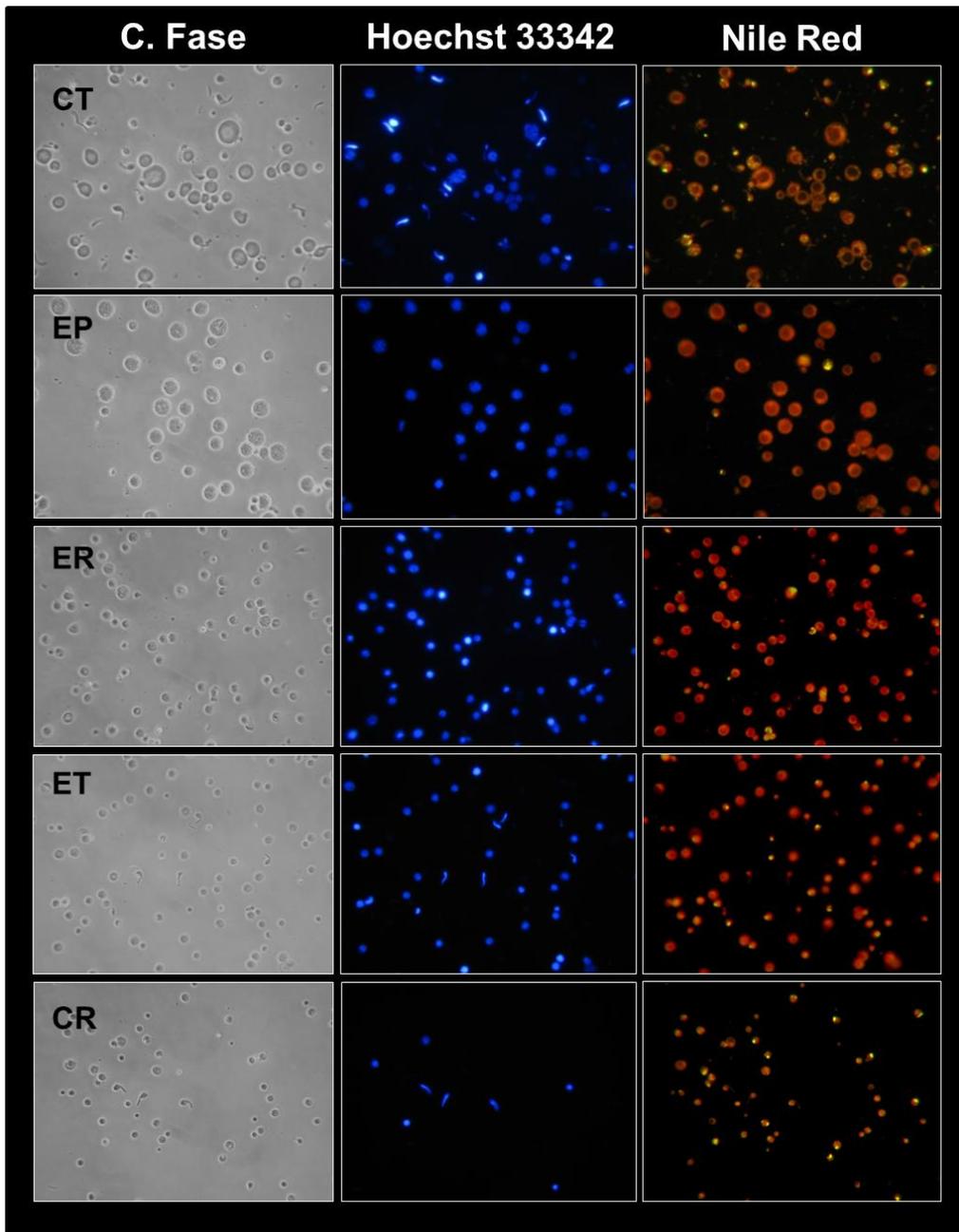


Figura 1. Aspecto microscópico de las fracciones enriquecidas en poblaciones de células espermatogénicas de rata adulta estudiadas en esta tesis. El conjunto total de células recuperadas del epitelio contenido en los túbulos seminíferos (CT) se separó mediante el método STA-PUT (Fig. 2, Materiales y Métodos) en poblaciones de espermatocitos en paquiteno (EP), espermatidas redondas (ER), espermatidas tardías (ET) y cuerpos residuales (CR). El Hoechst 33342 (5 μ M) se utilizó para teñir los núcleos celulares e identificar las células por la forma típica de sus núcleos, y el Rojo Nilo (Nile Red) (1.5 μ g/mL), para marcar los lípidos. En esta figura los 5 preparados se observan al mismo aumento (400X). Las células que se tiñen con Hoechst en la fracción CR representan un \approx 20% (Tabla 1), mientras los abundantes CR en ella (3 a 5 μ m) no se tiñen porque carecen de núcleo. La marcación con Rojo Nilo mostró un aumento de concentración de lípidos por célula con la diferenciación celular. La acentuación de la fluorescencia amarilla se corresponde con la acumulación de gotas lipídicas conteniendo lípidos neutros en la fracción de ET y aún más en CR.

Tabla 1

Composición celular de las distintas fracciones obtenidas a partir del conjunto de células intratubulares totales (CT) de rata adulta mediante un gradiente de sedimentación (STA-PUT)

Fracción	Tubos (3 mL)	Tipos de células presentes
1	5-12	47 ± 4% Células de Sertoli 45 ± 4% Espermatocitos en paquiteno 8 ± 3 % Espermatidas redondas fusionadas (multinucleadas)
2	15-28	84 ± 4% Espermatocitos en paquiteno 10 ± 2% Células de Sertoli 6 ± 1% Espermatidas redondas
3	29-45	47 ± 4% Espermatocitos en paquiteno/leptoteno/zigoteno 53 ± 3% Espermatidas redondas
4	46-65	90 ± 2% Espermatidas redondas 2% Espermatidas elongadas 8 ± 0.4% Cuerpos residuales
5	66-75	24 ± 3% Espermatidas redondas 40 ± 2% Espermatidas elongadas, principalmente tardías 36 ± 2% Cuerpos residuales
6	76-90	78 ± 5% Cuerpos residuales 11 ± 1.5% Espermatidas tardías 8 ± 3% Cabezas de espermios 3 ± 1% Espermatidas redondas

Las diferentes estirpes celulares presentes en el epitelio seminífero de rata (CT) se separaron sobre la base de su densidad por sedimentación en gradientes continuos de albúmina (Fig. 2, Materiales y Métodos). De cada gradiente se recolectaron 90 fracciones de 3-4 mL por tubo. Luego de su análisis microscópico las poblaciones celulares se agruparon de acuerdo con el tipo celular que predominaba en cada una. En **negrita** se destaca el componente mayoritario de las fracciones celulares 1 a 6.

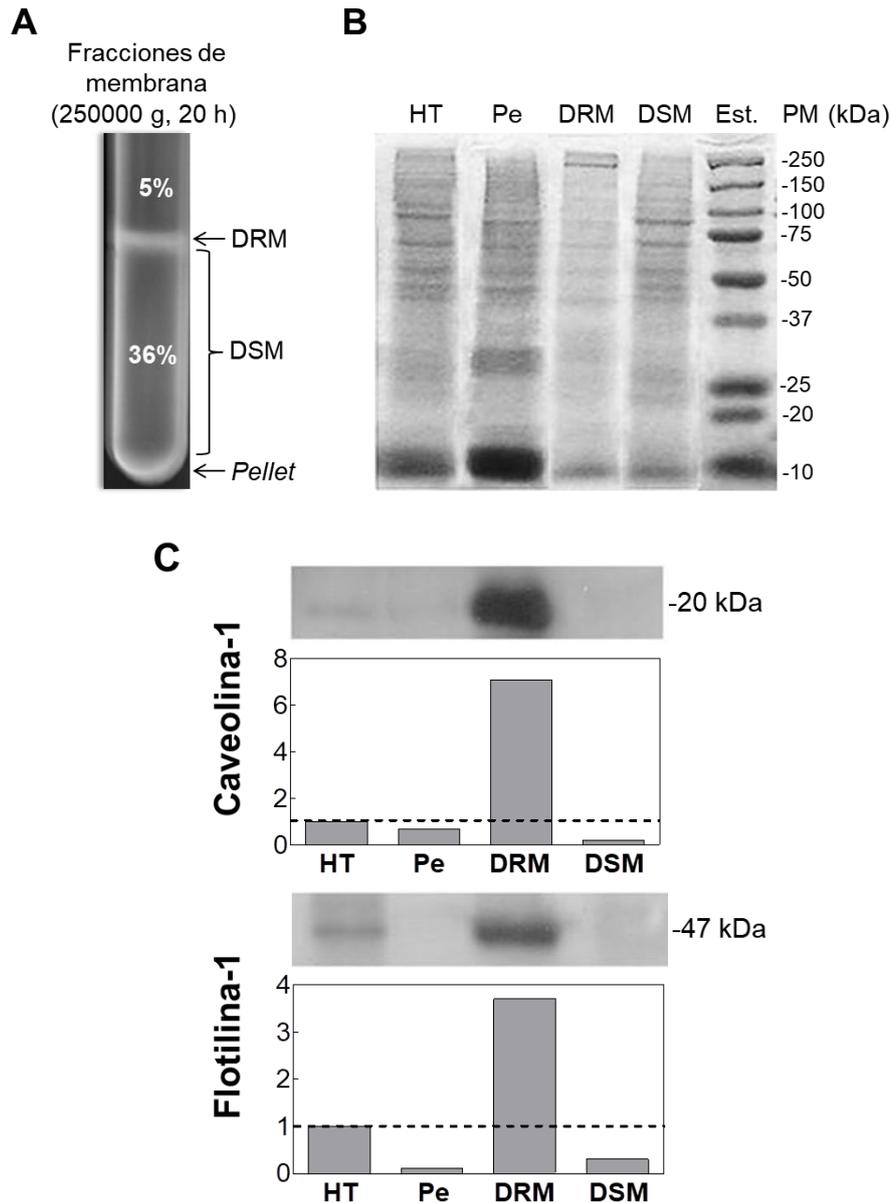


Figura 2. Aislamiento y caracterización de las fracciones de membrana obtenidas a partir de células totales del epitelio seminífero de ratas adultas (CT) mediante el método clásico con detergente descrito por Brown y Rose (1992). **A:** Se muestran las tres fracciones de membrana que se obtienen a partir del homogenado total (HT) de las CT luego de su solubilización en *buffer* conteniendo Tritón X-100 y ultracentrifugación en un gradiente discontinuo de sacarosa. La banda correspondiente a la fracción de membranas “resistentes” a la solubilización en detergente (DRM) se colectó de la interfase entre 5% y 36% de sacarosa. Por debajo de la fracción DRM, la mayor parte del volumen de sacarosa correspondió a la fracción “soluble” en el detergente (DSM). El *pellet* (Pe) insoluble presente en el fondo de los tubos también se colectó con fines comparativos. **B:** Gel de poliacrilamida 12% comparando el perfil proteico del HT y de las tres fracciones, obtenido mediante SDS-PAGE. Se sembraron cantidades equivalentes de proteína (20 µg) por fracción. Las bandas de proteínas se visualizaron mediante tinción con *Coomassie Blue*. A la derecha del gel se indican los pesos moleculares (PM) de proteínas estándar (en kDa). Nótese la mayor proporción de proteínas de alto peso molecular en la fracción DRM en comparación con la fracción DSM. **C:** Determinación mediante *Western blot* de la expresión de caveolina-1 y flotilina-1, dos proteínas marcadoras de dominios de membrana tipo *raft/caveolas* en el HT y en las fracciones aisladas a partir de éste. Se sembraron cantidades equivalentes de proteína por fracción (30 µg). Los gráficos de barras representan la densidad relativa en cada fracción, con respecto a la densidad en el HT de partida (tomado como 1.0) de cada una de estas dos proteínas marcadoras.

Tabla 2

Proteína y fósforo lipídico recuperados en las fracciones de membrana obtenidas a partir de preparaciones ricas en células espermatoogénicas totales (CT) de rata por el método que emplea detergente.

Células totales		
Fracción	mg de proteína en membranas/100 mg de proteína en HT	µg de P en membranas/100 µg de P en HT
HT	100	100
DRM	3.3 ± 0.1 (6.7%)	26.1 ± 4.9 (42.1%)
DSM	36.2 ± 1.4 (73.7%)	27.1 ± 3.0 (43.7%)
<i>Pellet</i>	9.6 ± 3.9 (19.6%)	8.8 ± 1.6 (14.2%)
Total	49.1 (100%)	62.0 (100%)

A partir de preparaciones de CT, se obtuvieron homogenados totales (HT), que se sometieron a fraccionamientos con el método que se detalla en la Fig. 2 y se determinó el contenido de proteína y fósforo lipídico (P) de cada fracción. Los resultados se expresan como valores promedio ± SD de 3 preparaciones independientes, y representan el contenido de proteína (columna izquierda) y P (columna derecha) recuperado en cada fracción de membrana con respecto a una cantidad, fijada arbitrariamente, de proteína (100 mg) o P (100 µg) del correspondiente HT de partida, respectivamente. Entre paréntesis se calculó la contribución porcentual de cada fracción al total (100%) de la proteína y el P recuperados.

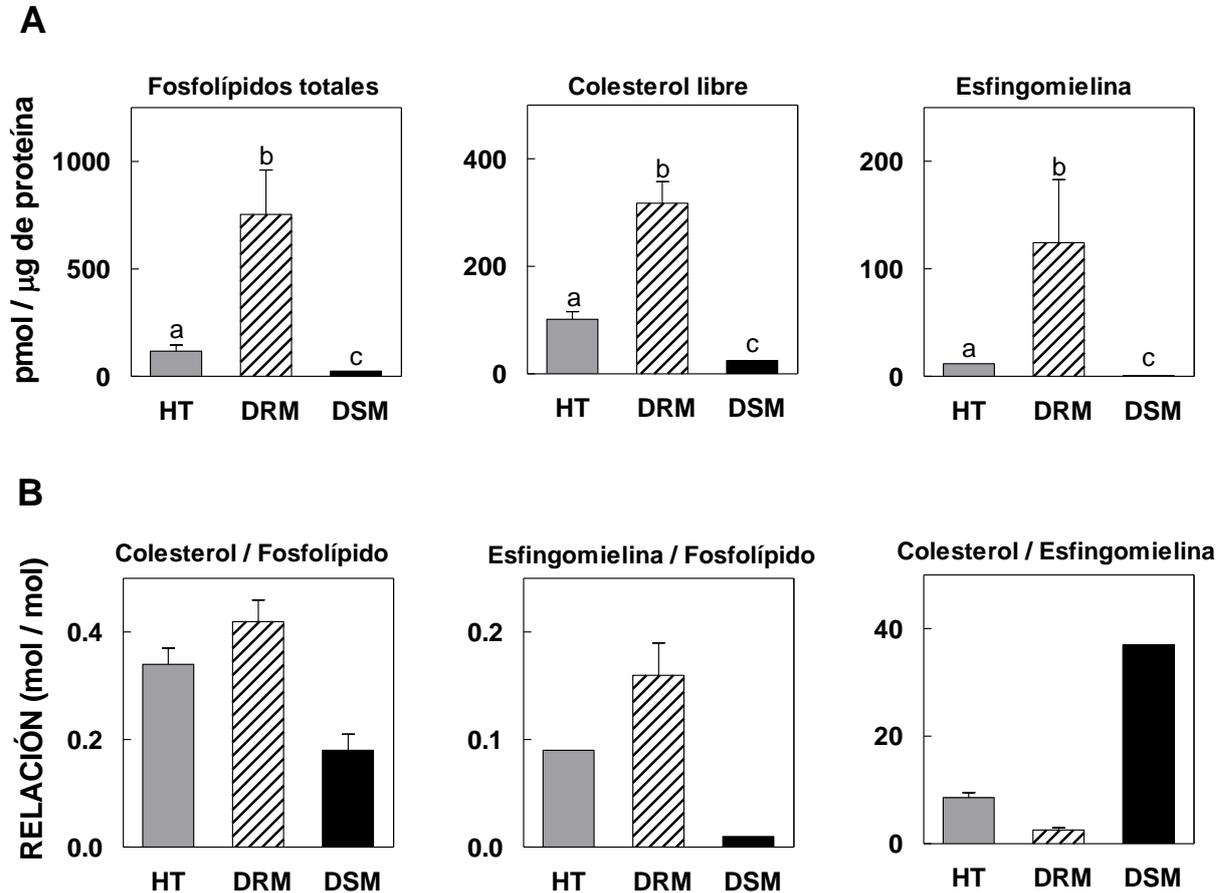


Figura 3. Niveles y proporciones de componentes lipídicos de membrana en las fracciones DRM y DSM de células espermatogénicas totales de rata. Homogenados totales (HT) obtenidos de CT se separaron en las fracciones indicadas. Se prepararon extractos lipídicos y se determinó el contenido de los lípidos que se indican. **A:** Concentración, expresada sobre la base del contenido de proteína en cada fracción. **B:** Relaciones entre los componentes lipídicos. Los resultados representan valores promedio \pm SD de 3 preparaciones independientes. Letras diferentes (a-c) indican diferencias significativas entre fracciones ($p < 0.05$, ANOVA).

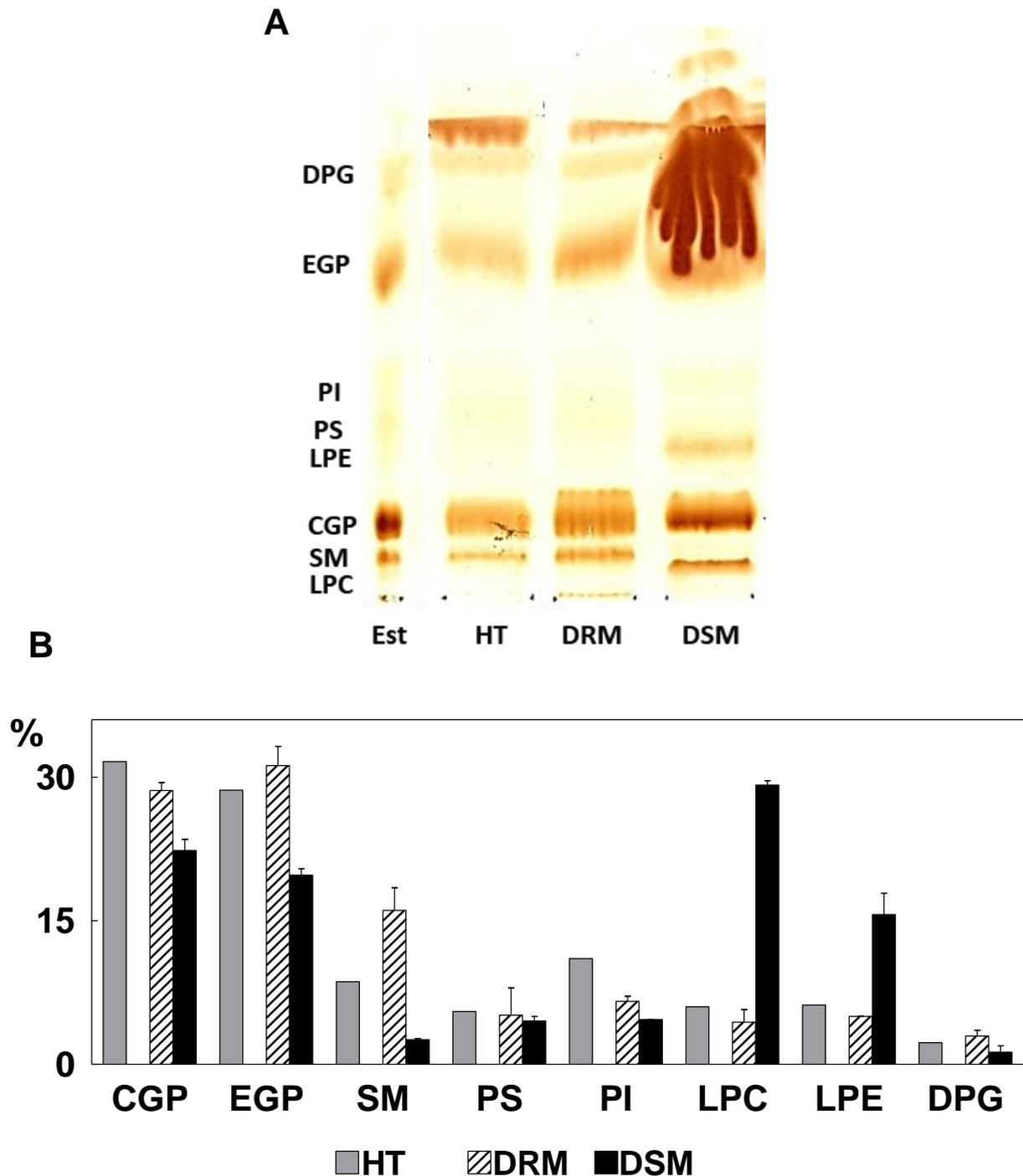


Figura 4. Fosfolípidos de las fracciones DRM y DSM en comparación con los de los homogenados totales (HT) de partida. A: Ejemplo de una TLC en la cual se sembró igual cantidad de P (10 μ g) en los tres casos (Est: muestra de referencia). Los lípidos se separaron con cloroformo: metanol: ácido acético: agua (50:37.5:3.5:2 en vol.). La mancha en la parte superior de la fracción DSM corresponde al detergente presente en los extractos (impide el estudio de los lípidos neutros). **B:** Composición en fosfolípidos (%) del HT y de las fracciones DRM y DSM. Los fosfolípidos se separaron en clases como se muestra en A, y se cuantificaron por medición del fósforo. Abreviaturas: CGP, EGP, glicerofosfolípidos de -colina y -etanolamina, respectivamente; SM, esfingomielina; PS, PI: fosfatidil-serina e -inositol, respectivamente; LPC, LPE, lisofosfatidil-colina y -etanolamina, respectivamente. DPG, difosfatidilglicerol. La fracción DSM presentó un porcentaje mucho menor de GPL y de SM y mucho mayor de lisofosfolípidos (LPC y LPE) con respecto a la fracción DRM y al HT de partida.

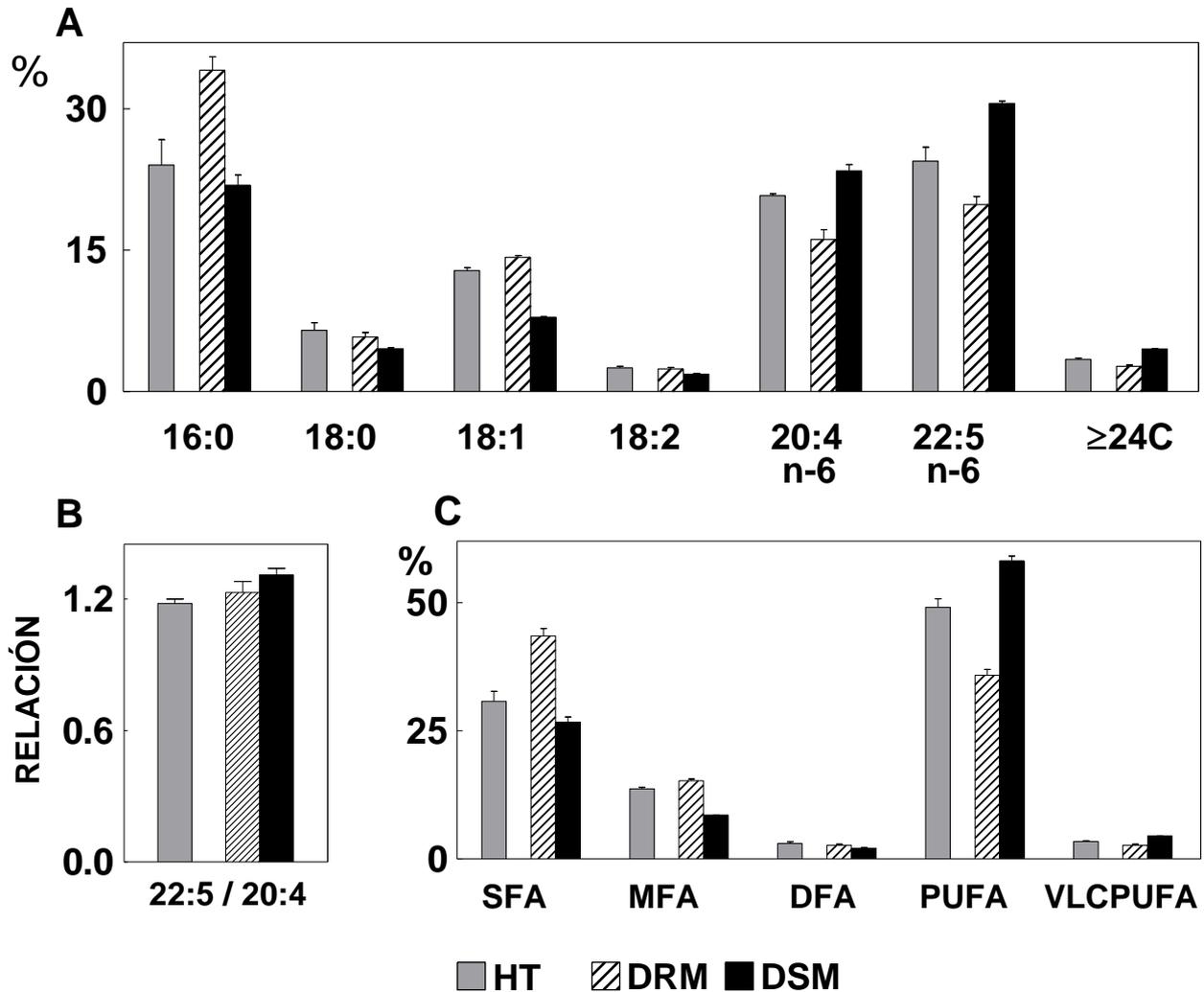


Figura 5. Composición de ácidos grasos de los GPL totales de las fracciones DRM y DSM en comparación con la de los homogenados totales (HT) de partida. A: Principales ácidos grasos. Los GPL totales se separaron de los lípidos neutros por TLC, y sus ácidos grasos se analizaron por GC. **B:** Relación 22:5/20:4 en los GPL de cada fracción. **C:** Grupos de ácidos grasos. Se sumaron los % de ácidos grasos individuales del mismo grado de insaturación en cada grupo. SFA, saturados; MFA, monoenoicos; DFA, dienoicos; PUFA, poliinsaturados; VLCPUFA, PUFA de muy larga cadena.

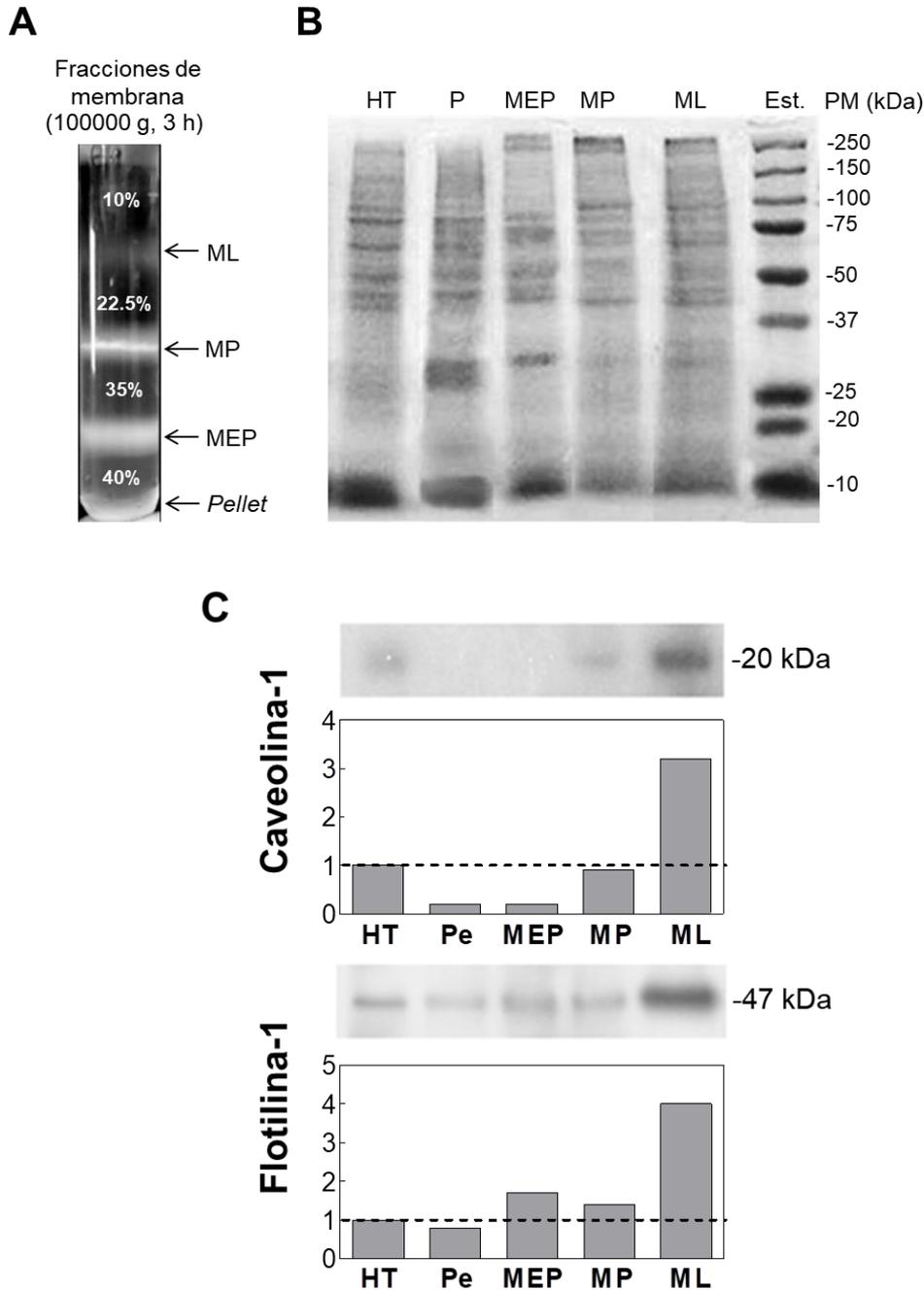


Figura 6. Aislamiento y caracterización de fracciones de membrana de células espermatogénicas totales del epitelio seminífero (CT) de ratas adultas por el método libre de detergente descrito por Luria y colaboradores (2002). **A:** Muestra las fracciones de membrana que se separan a partir del homogenado total (HT) de CT luego de su ultracentrifugación en un gradiente discontinuo de sacarosa. Las flechas señalan las interfases entre las concentraciones de sacarosa indicadas sobre el tubo, de las cuales se colectaron las bandas correspondientes a tres fracciones: membranas livianas (ML), membranas pesadas (MP) y membranas extra-pesadas (MEP). También se colectó el *pellet* (Pe) presente en el fondo de los tubos con fines comparativos. **B:** Gel de poliacrilamida 12% comparando los perfiles proteicos del HT y de las 4 fracciones mencionadas, obtenidos mediante SDS-PAGE. Se sembraron cantidades equivalentes de proteína (20 µg) por fracción. Las bandas se revelaron con *Coomassie Blue*. **C:** Determinación mediante *Western blot* de la expresión de caveolina-1 y flotilina-1, en el HT y en las fracciones. Se sembraron 25 µg de proteína total por fracción. Los gráficos de barras representan la densidad relativa (en unidades arbitrarias) de cada una de estas dos proteínas marcadoras (con respecto al HT de partida, tomado como 1.0). Notar que ambas proteínas se encontraron concentradas en la fracción ML.

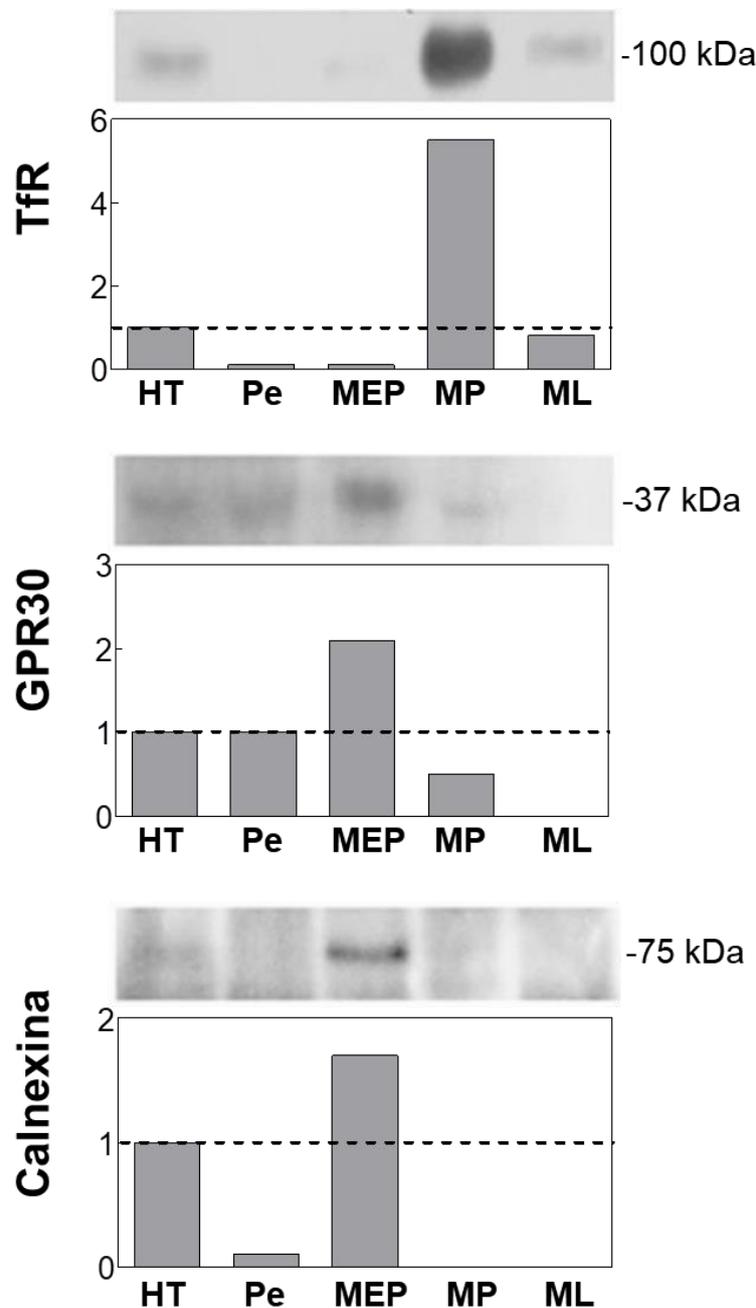


Figura 7. Distribución de una proteína marcadora de membrana plasmática y dos del retículo endoplásmico en las fracciones de membranas obtenidas a partir del homogenado total (HT) de las CT. Se muestran *Western blot* representativos para TfR (receptor de transferrina), conocido por estar presente (en la fracción no-raft) de la membrana plasmática de las células germinales, y para GPR30 y calnexina, dos proteínas presentes en el retículo endoplásmico. Se sembraron 25 μ g de proteína por fracción. Los gráficos de barras representan la densidad relativa de cada una de las proteínas marcadoras (en unidades arbitrarias) en las fracciones indicadas en comparación con su densidad en el HT de partida (a la que se asignó el valor 1.0).

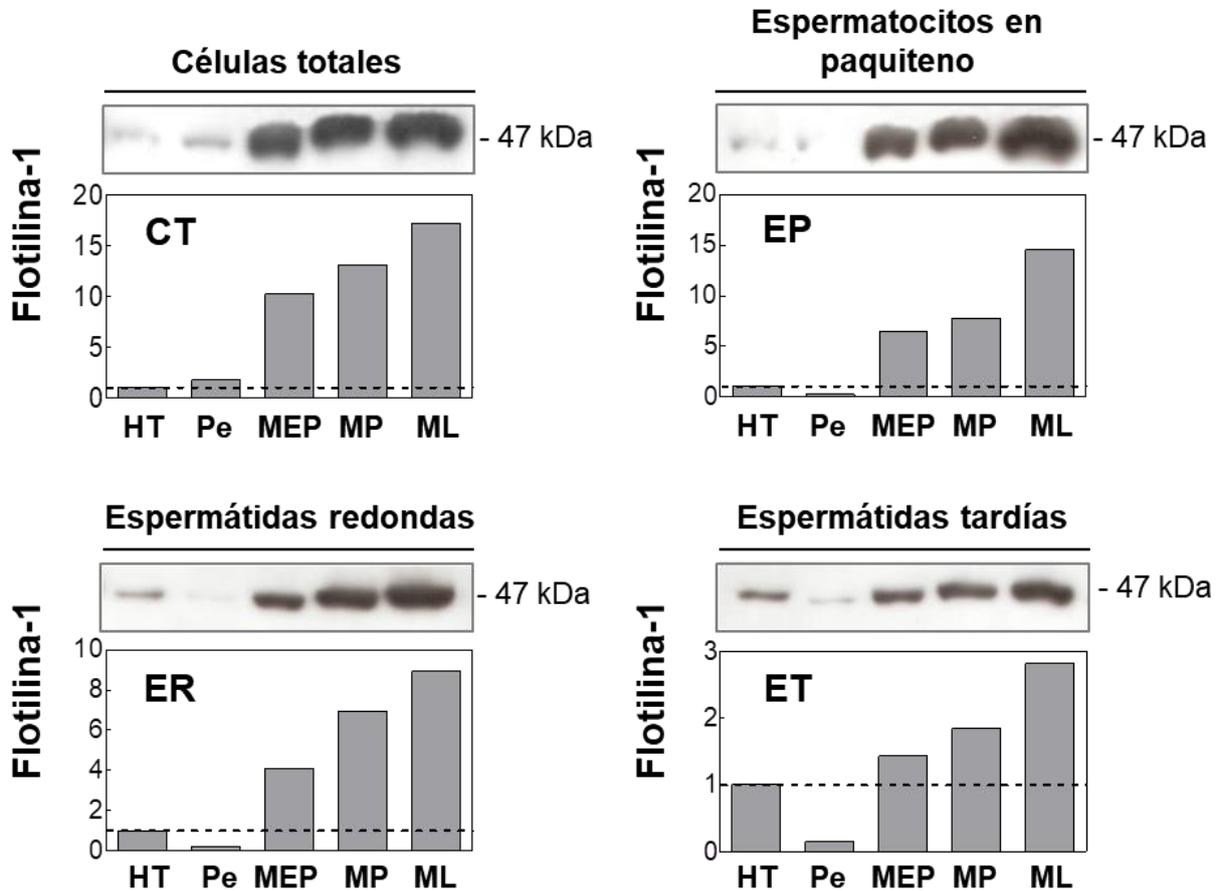


Figura 8. Distribución de flotilina-1 entre fracciones de membranas obtenidas a partir de células espermatogénicas en distintos estadios de su diferenciación. Partiendo de CT, se obtuvieron poblaciones de espermatocitos en paquiteno (EP), espermátidas redondas (ER) y espermátidas tardías (ET). De cada una de estas cuatro poblaciones celulares se prepararon homogenados totales (HT), y a partir de éstos se obtuvieron las 4 fracciones de membrana que se indican, con el método libre de detergente descrito en la Figura 3. Se sembraron cantidades equivalentes de proteína (25 µg) en cada calle de los geles y se aplicó SDS-PAGE. Mediante *Western blot* se determinó la distribución de flotilina-1, marcadora de dominios de membrana tipo *raft/caveolas*, en cada *fracción* celular. Las barras representan la densidad de flotilina-1 en cada fracción con respecto a la presente en el correspondiente HT (en unidades arbitrarias) a la cual se le asignó el valor 1.0. Notar que en todas las células la flotilina-1 se encontró concentrada en la fracción ML.

Tabla 3
Contenido de proteína recuperado en fracciones de membrana obtenidas de poblaciones de células espermatogénicas.

Fracción	mg de proteína en membranas/ 100 mg de proteína en homogenado total (%)			
	CT	EP	ER	ET
HT	100	100	100	100
ML	0.8 ± 0.1 (1.1%)	0.3 ± 0.2 (0.3%)	1.0 ± 0.5 (1.1 %)	0.9 ± 0.2 (1.3%)
MP	10.1 ± 2.3 (13.5%)	11.9 ± 5.6 (13.6%)	23.0 ± 12.8 (25.5 %)	11.6 ± 6.5 (16.2%)
MEP	26.1 ± 6.9 (34.8%)	36.6 ± 9.1 (42%)	41.0 ± 11.0 (45.5%)	25.1 ± 10.5 (35.1%)
Pe	38.2 ± 6.8 (51%)	38.3 ± 24.3 (43.9%)	25.3 ± 14.4 (28%)	34.1 ± 9.2 (47.6%)
Total	74.9 (100%)	87.2 (100%)	90.2 (100%)	71.6 (100%)

Partiendo de CT, se obtuvieron poblaciones de espermatoцитos en paquiteno (EP), espermátidas redondas (ER) y espermátidas tardías (ET). De cada una de estas cuatro poblaciones celulares se prepararon homogenados totales (HT), y a partir de éstos se obtuvieron las fracciones de membrana que se indican (ML, MP, MEP y Pe) con el método libre de detergente. Se cuantificó la proteína total en los HT y en cada una de las fracciones. Los resultados se expresan como valores promedio ± SD de 3 preparaciones independientes, y representan el contenido de proteína recuperado en cada fracción de membrana con respecto a una cantidad, fijada arbitrariamente (100 mg), de proteína del correspondiente HT de partida.

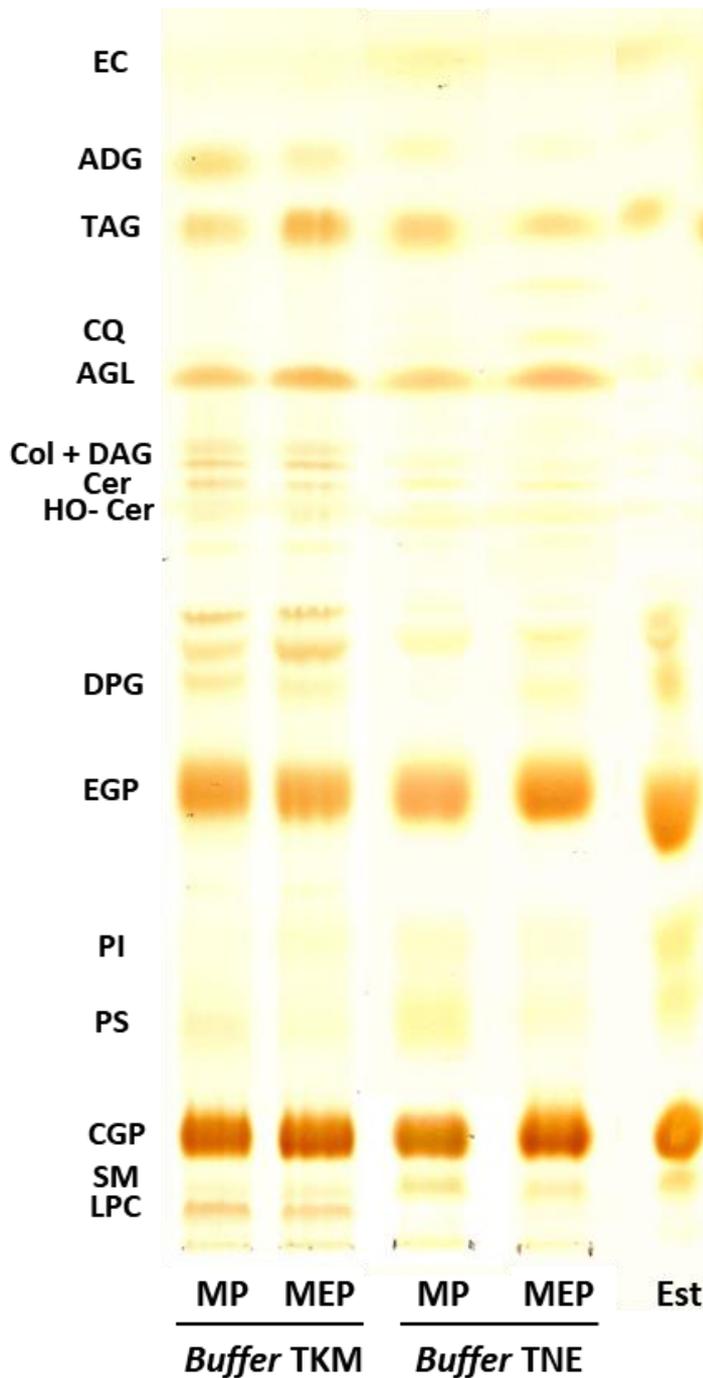


Figura 9. Efecto sobre los lípidos de membrana del *buffer* utilizado en la lisis de células espermatogénicas totales (CT) de rata.

Además de mostrar la separación de lípidos (polares y neutros) de fracciones de membrana obtenidas con el método libre de detergente, se comparan los perfiles lipídicos de las fracciones de membrana MP y MEP obtenidas de homogenados preparados con los dos *buffers* de lisis que se indican. Se sembraron 5 µg de fósforo lipídico de cada muestra. Los resultados muestran la razón por la cual se adoptó TNE en lugar de TKM como *buffer* de lisis: el uso de éste último resultaba en hidrólisis de SM (nótese el menor nivel de SM y mayor de Cer), y en generación de DAG y lisofosfolípidos (por ej. LPC).

LPC, lisofosfatidilcolina;
 SM, esfingomielina;
 CGP, glicerofosfolípidos de colina;
 PS, fosfatidilserina;
 PI, fosfatidilinositol;
 EGP, glicerofosfolípidos de etanolamina;
 DPG, difosfatidilglicerol o cardiolipina;
 HO- Cer, hidroxí-ceramida;
 Cer, ceramida;
 Col, colesterol + DAG, diacilgliceroles;
 AGL, ácidos grasos libres;
 CQ, coenzima Q;
 TAG, triacilgliceroles;
 ADG alquil-diacilglicéridos;
 EC, ésteres de colesterol.
 Est: muestra de referencia.

Tabla 4
Recuperación de fósforo lipídico a partir de homogenados de tres poblaciones de células espermatogénicas luego del fraccionamiento de sus membranas.

Fracción	µg de P en membranas/ 100 µg de P en homogenado total (%)			
	CT	EP	ER	ET
HT	100	100	100	100
ML	1.1 ± 0.1 (1.4 %)	0.9 ± 0.1 (1.1 %)	1.0 ± 0.2 (1.3 %)	1.5 ± 0.2 (1.9 %)
MP	17.4 ± 1.4 (21.8 %)	21.7 ± 4.2 (27.0 %)	18.8 ± 5.7 (23.5 %)	19.6 ± 2.6 (24.5 %)
MEP	25.0 ± 4.7 (31.3 %)	39.5 ± 2.8 (49.1 %)	31.5 ± 2.3 (39.4%)	23.4 ± 1.2 (29.3 %)
Pe	36.5 ± 3.9 (45.6 %)	18.3 ± 5.9 (22.8 %)	28.6 ± 3.1 (35.8 %)	35.5 ± 1.1 (44.4 %)
Total	80.0 (100%)	80.4 (100%)	79.9 (100%)	80.0 (100%)

CT, células totales; EP, espermatoцитos en paquiteno, ER, espermátidas redondas y ET, espermátidas tardías. Para cada *tipo* celular, se determinó el contenido de fósforo lipídico (P) en los homogenados totales (HT) y en las fracciones de membrana aisladas a partir de éstos (ML, MP, MEP y Pe). Los resultados muestran los µg de P recuperados en cada *fracción* de membrana con respecto al P originalmente presente en el *correspondiente* HT de partida. Se eligió una cantidad que hiciera comparables a todos los HT (fijada arbitrariamente en 100 µg de P). La recuperación total fue similar para todos los tipos celulares (un promedio de 80 ug de P en membranas/ 100 µg de P en HT) e indican un rendimiento satisfactorio del fraccionamiento. Los datos entre paréntesis dan cuenta de la distribución de dicho P (en %) entre las fracciones de membrana.

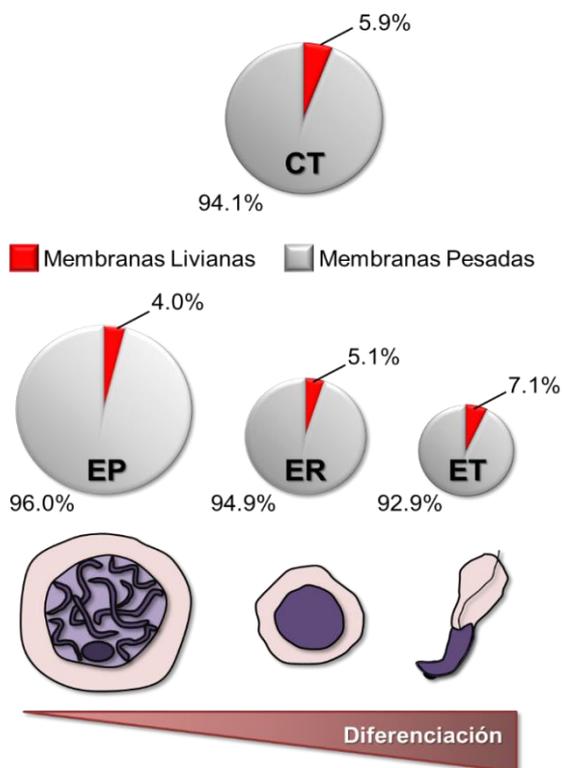


Figura 10. Distribución porcentual de P lipídico entre las fracciones livianas y pesadas de membranas obtenidas a partir de poblaciones de células espermatogénicas. CT, células totales; EP, espermatoцитos en paquiteno; ER, espermátidas redondas y ET, espermátidas tardías. Los datos se calcularon considerando el P recuperado en cada una de estas dos fracciones, utilizando los valores promedios de la Tabla 4.

Tabla 5

Actividad específica de la enzima 5' nucleotidasa en fracciones de membrana obtenidas de células espermatoogénicas en distintos estadios de su diferenciación.

	Fracción	AE (nmol Pi/ mg de proteína/ min)	AE en fracción/ AE en HT
Células totales	HT	3.23 ± 0.7 ^a	1
	DRM	16.11 ± 1.0 ^b	5.0
	DSM	<2	-
	ML	28.9 ± 1.5 ^c	9.0
	MP	8.61 ± 0.7 ^d	2.7
	MEP	2.37 ± 0.3 ^a	0.7
	Pe	<2	-
Espermatocitos en paquiteno	HT	2.45 ± 0.1 ^a	1
	ML	31.38 ± 4.0 ^b	12.8
	MP	8.24 ± 1.6 ^c	3.4
	MEP	<2	-
	Pe	<2	-
Espermátidas redondas	HT	4.30 ± 0.7 ^a	1
	ML	41.38 ± 5.3 ^b	9.6
	MP	10.75 ± 0.6 ^c	2.5
	MEP	2.60 ± 0.4 ^d	0.6
	Pe	<2	-
Espermátidas tardías	HT	2.30 ± 0.2 ^a	1
	ML	23.43 ± 3.0 ^b	10.2
	MP	6.44 ± 1.3 ^c	2.8
	MEP	<2	-
	Pe	<2	-

Partiendo de CT, se obtuvieron las poblaciones de espermatocitos en paquiteno, espermátidas redondas y espermátidas tardías. De cada uno de estos cuatro tipos celulares se prepararon homogenados totales (HT), y a partir de cada uno de éstos, las fracciones de membrana que se indican. La actividad específica (AE) de la enzima, expresada en nmoles de fósforo inorgánico (Pi) /mg de proteína/minuto, se obtuvo para cada HT y cada fracción. Los resultados representan valores promedio ± SD de 3 preparaciones independientes. Las muestras de las fracciones de cada tipo celular fueron comparadas con respecto al correspondiente HT mediante el *test* estadístico de Tukey; letras diferentes (a-d) indican diferencias significativas ($p < 0.01$). En la columna de la derecha se presenta la *relación* entre la AE de la enzima determinada en cada fracción de membrana y la AE de su correspondiente HT, a la que se le asignó el valor de 1.0. En el caso de las CT, se incluye la AE de la enzima en las fracciones DRM y DSM obtenidas por el método que utiliza detergente. Nótese la pérdida de AE que sufre la enzima en este último caso.

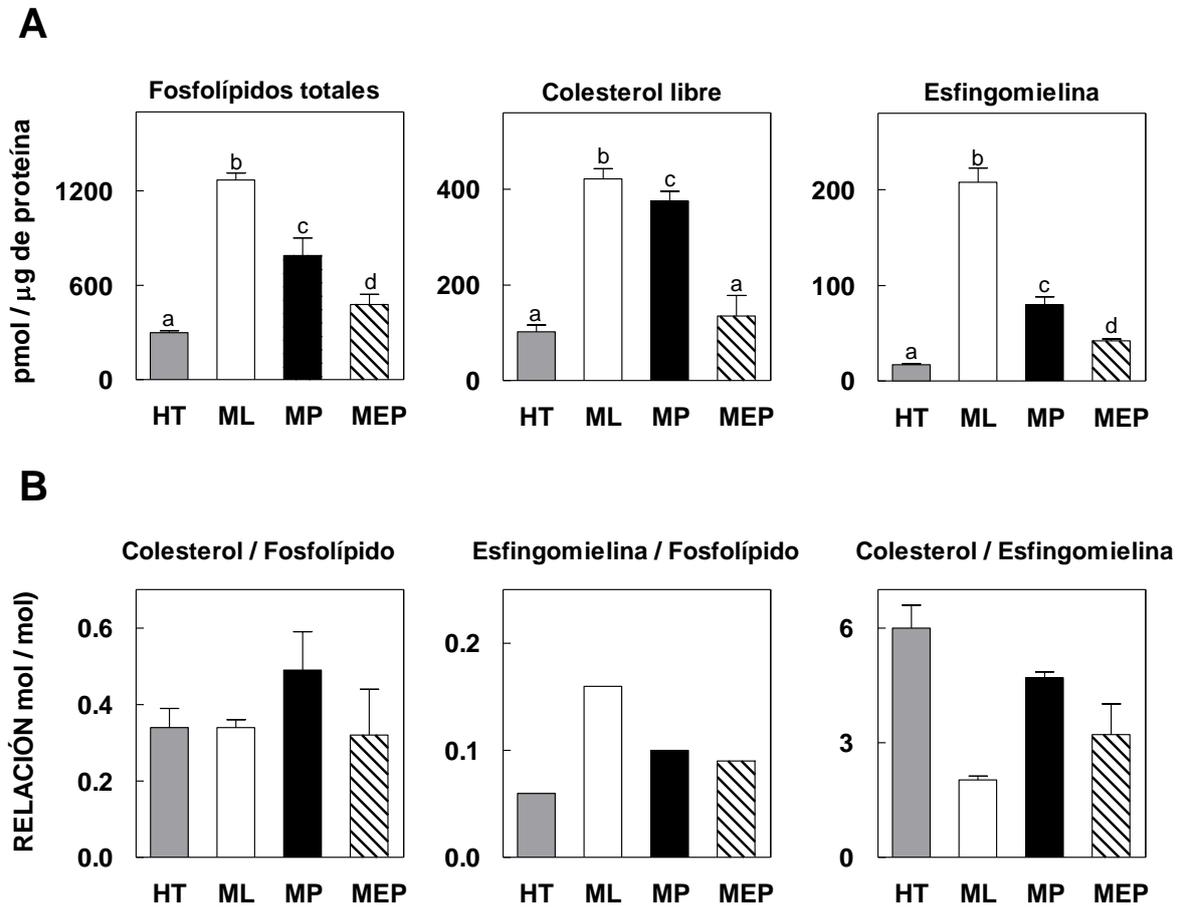


Figura 11. Niveles y proporciones de componentes lipídicos de tres fracciones de membrana de células espermatogénicas totales (CT) de rata. Homogenados totales (HT) preparados de CT se separaron en fracciones (ML, MP y MEP) y en los cuatro casos se determinó el contenido de los lípidos que se indican. **A:** Concentraciones, expresadas sobre la base del contenido de proteína en cada caso. **B:** Relaciones entre componentes lipídicos presentes en las mismas muestras. Los datos representan valores promedio \pm SD de 3 preparaciones independientes. Letras diferentes (a-d) indican diferencias significativas entre los datos ($p < 0.05$, ANOVA).

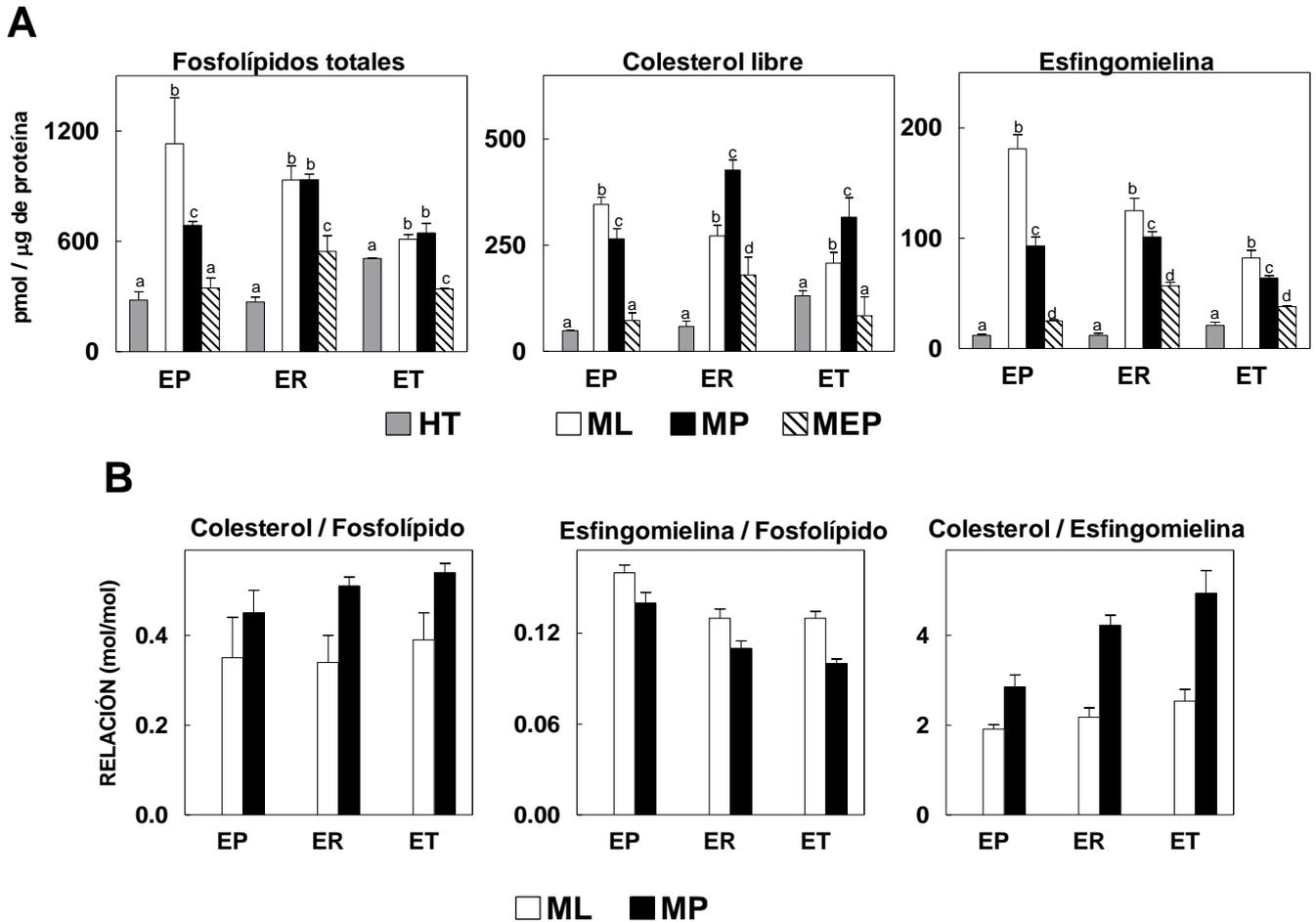


Figura 12. Niveles y proporciones de componentes lipídicos de tres fracciones de membrana obtenidas de tres poblaciones de células espermatogénicas de rata. Homogenados totales (HT) preparados de cada tipo celular se separaron en fracciones (ML, MP y MEP) y en los correspondientes extractos se determinó el contenido de los lípidos que se indican. **A:** Concentraciones, expresadas sobre la base del contenido de proteína en cada caso. **B:** Relaciones (mol/mol) entre componentes lipídicos presentes en las mismas muestras. Los datos representan valores promedio \pm SD de 3 preparaciones independientes. Letras diferentes (a-d) indican diferencias significativas entre los datos ($p < 0.05$, ANOVA).

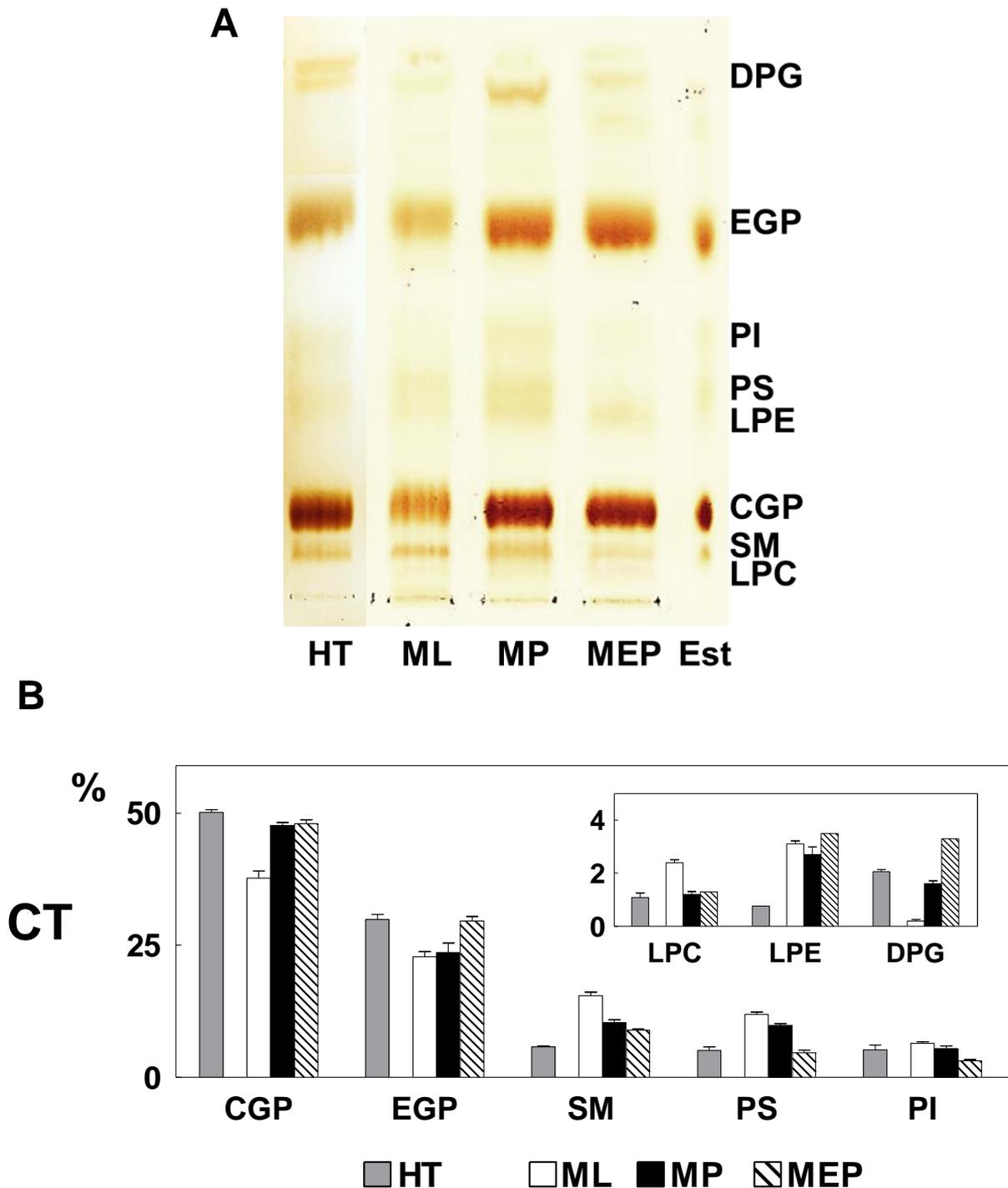


Figura 13. Fosfolípidos de las fracciones ML, MP y MEP de células espermatoogénicas totales (CT) en comparación con los de los homogenados totales (HT) de partida. A: Ejemplo de una TLC en la cual se sembró igual cantidad de P (10 μ g) en los cuatro casos. (Est: muestra de referencia). Los lípidos se separaron con cloroformo: metanol: ácido acético: agua (50:37.5:3.5:2 en vol.). **B:** Composición en fosfolípidos (%) del HT y de las tres fracciones de membrana. Los fosfolípidos se separaron en clases como se muestra en (A), y se cuantificaron por medición del fósforo. Abreviaturas: CGP, EGP, glicerofosfolípidos de -colina y -etanolamina, respectivamente; SM, esfingomielina; PS, PI: fosfatidil-serina e -inositol, respectivamente; LPC, LPE, lisofosfatidil-colina y -etanolamina, respectivamente; DPG, difosfatidilglicerol. Se puede apreciar el bajo porcentaje de lisofosfolípidos (< 4%) presente en todas las fracciones conteniendo membranas.

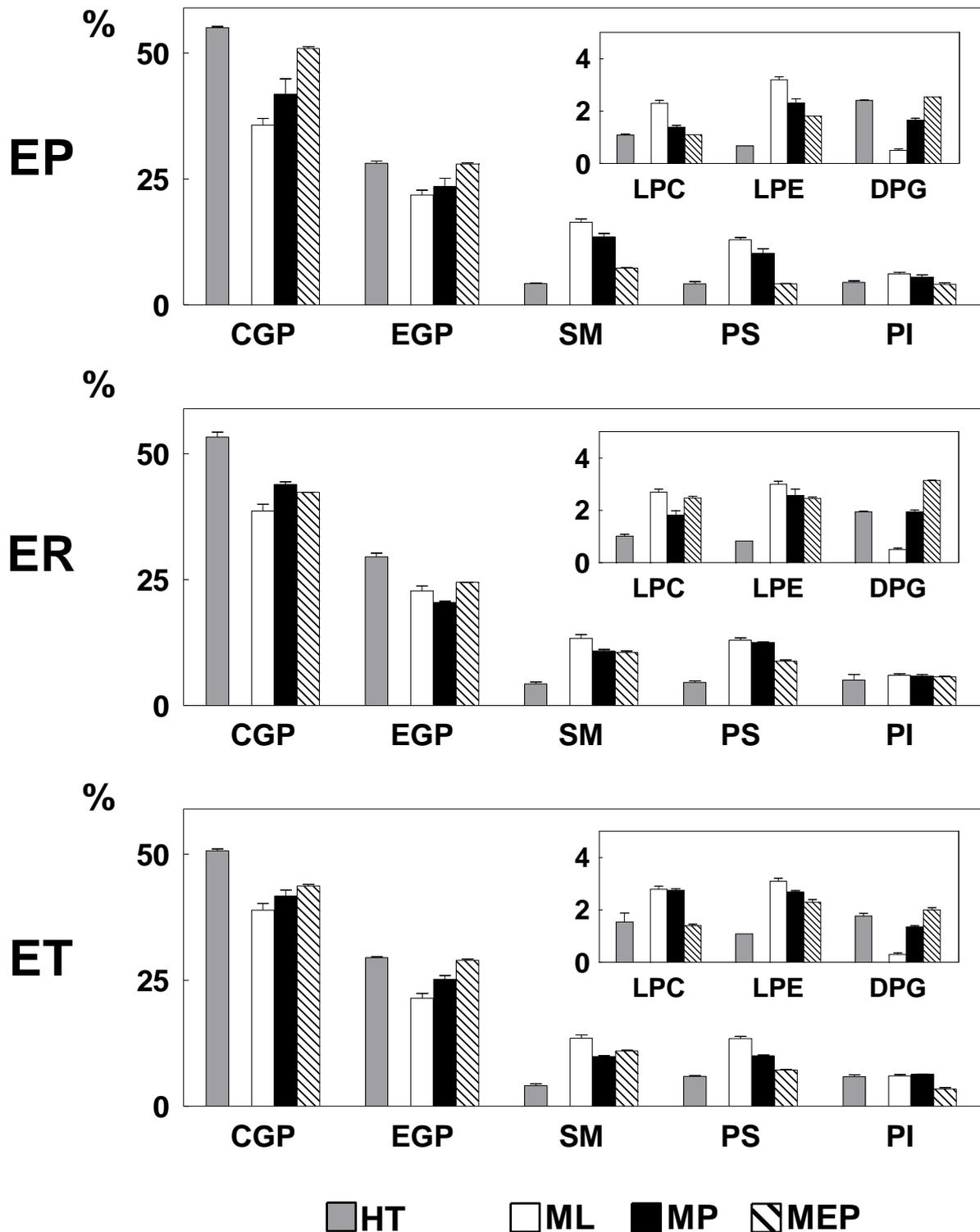


Figura 14. Fosfolípidos de las fracciones ML, MP y MEP de tres poblaciones de células espermatozógenas en comparación con los de los homogenados totales (HT) de partida. Se muestra la composición en fosfolípidos (%) del HT y de las tres fracciones de membrana obtenidas de espermatozoides en paquetino (EP), espermátidas redondas (ER) y espermátidas tardías (ET). Los fosfolípidos se separaron en clases y se cuantificaron como se describe en la Fig. 13 para las CT. Abreviaturas: CGP, EGP, glicerofosfolípidos de -colina y -etanolamina, respectivamente; SM, esfingomielina; PS, PI: fosfatidil-serina e -inositol, respectivamente; LPC, LPE, lisofosfatidil-colina y -etanolamina, respectivamente; DPG, difosfatidilglicerol.

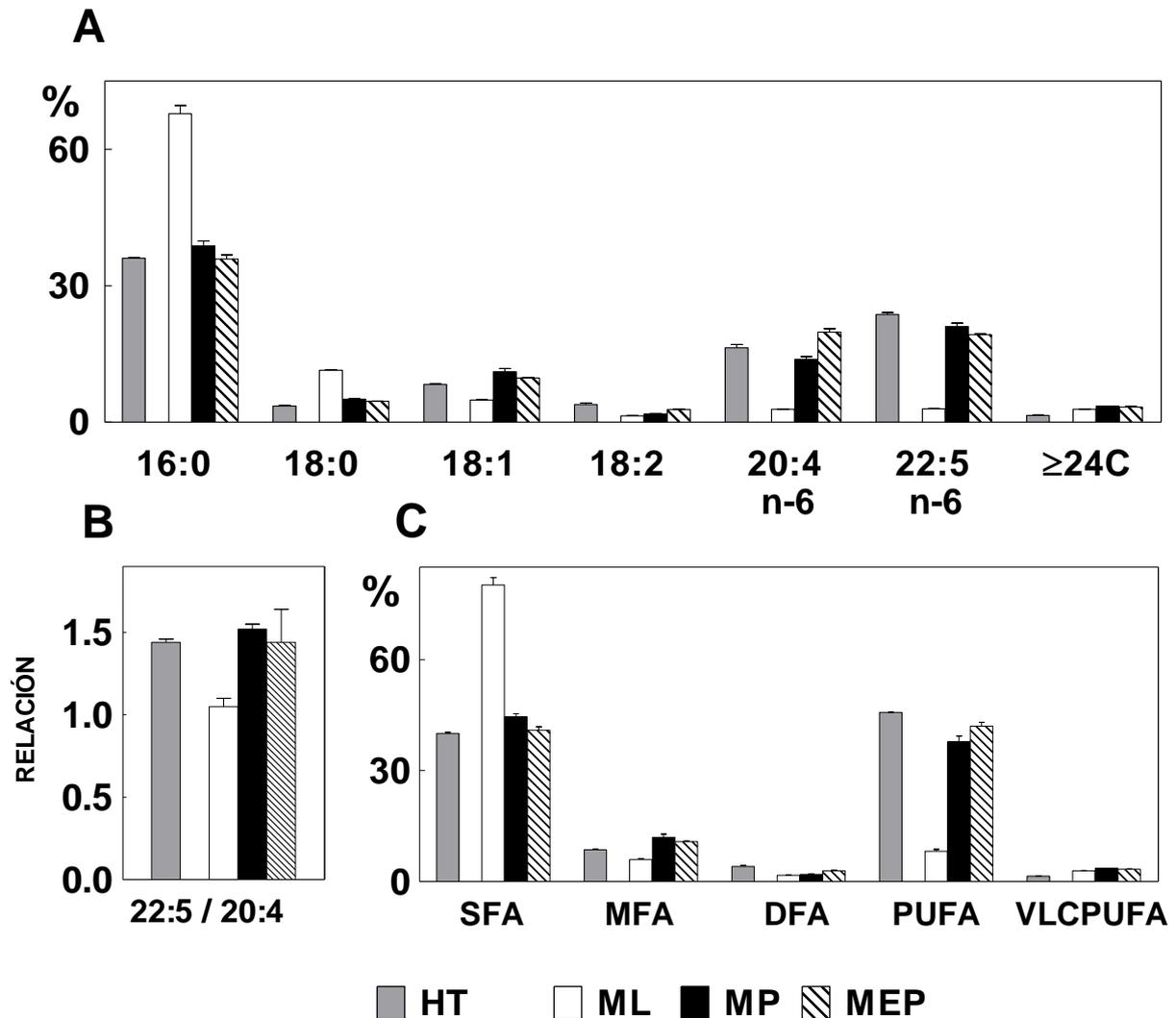


Figura 15. Ácidos grasos de los GPL totales de las fracciones ML, MP y MEP de células espermatogénicas totales en comparación con los de los homogenados totales (HT) de partida. Los GPL totales se separaron de los lípidos neutros por TLC, y sus ácidos grasos se analizaron por GC. **A:** Composición (%), mostrando los principales ácidos grasos. **B:** Relación 22:5/20:4 en los GPL totales de cada fracción. **C:** Grupos de ácidos grasos. Se sumaron los % de ácidos grasos individuales del mismo grado de insaturación en cada grupo. SFA, saturados; MFA, monoenoicos; DFA, dienoicos; PUFA, poliinsaturados; VLCPUFA, PUFA de muy larga cadena.

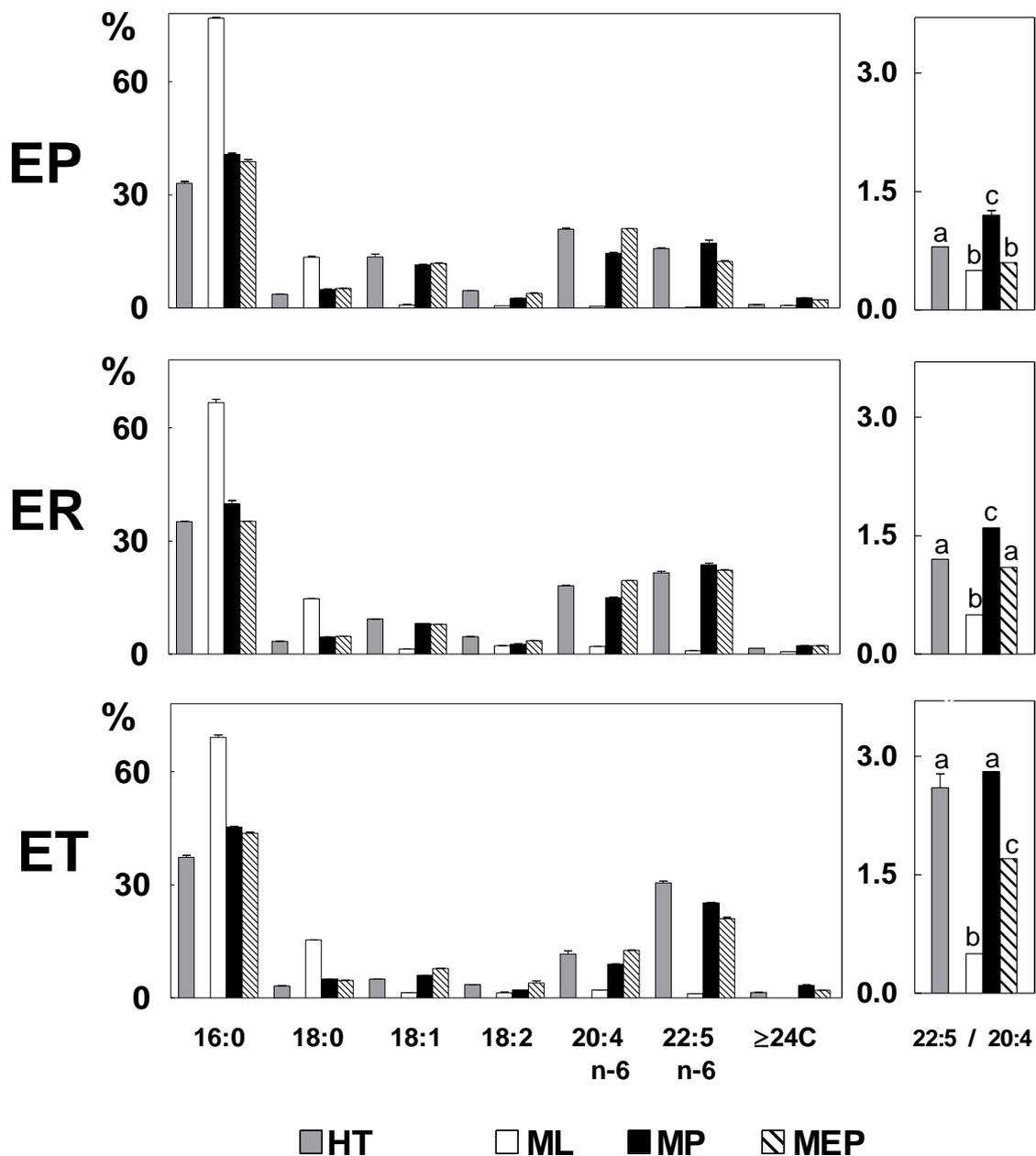


Figura 16. Ácidos grasos de los GPL de fracciones ML, MP y MEP de tres poblaciones de células espermatozógenas. Luego de recuperar los GPL por TLC, sus ácidos grasos se analizaron por GC. A la izquierda, se muestra la composición porcentual (%) de los ácidos grasos de GPL de los HT y de cada una de las tres fracciones de membrana que se obtuvieron a partir de espermatozoides en paquiteno (EP), espermátidas redondas (ER) y espermátidas tardías (ET). En la fracción ML, la suma de 16:0 y 18:0 resultó ser cercana o mayor al 90% de los ácidos grasos, indicando prevalencia en ella de especies moleculares “disaturadas” de GPL. A la derecha, se graficaron las relaciones entre los % de 22:5 y 20:4. Letras distintas indican diferencias significativas *entre* las fracciones en *cada* tipo celular. Para esta relación se usó intencionalmente la misma escala para cada tipo celular, a fin de destacar la constancia de dicha relación en la fracción ML y el notorio aumento de la misma con el avance de la diferenciación celular, contribuido *más* por la fracción MP que por la MEP.

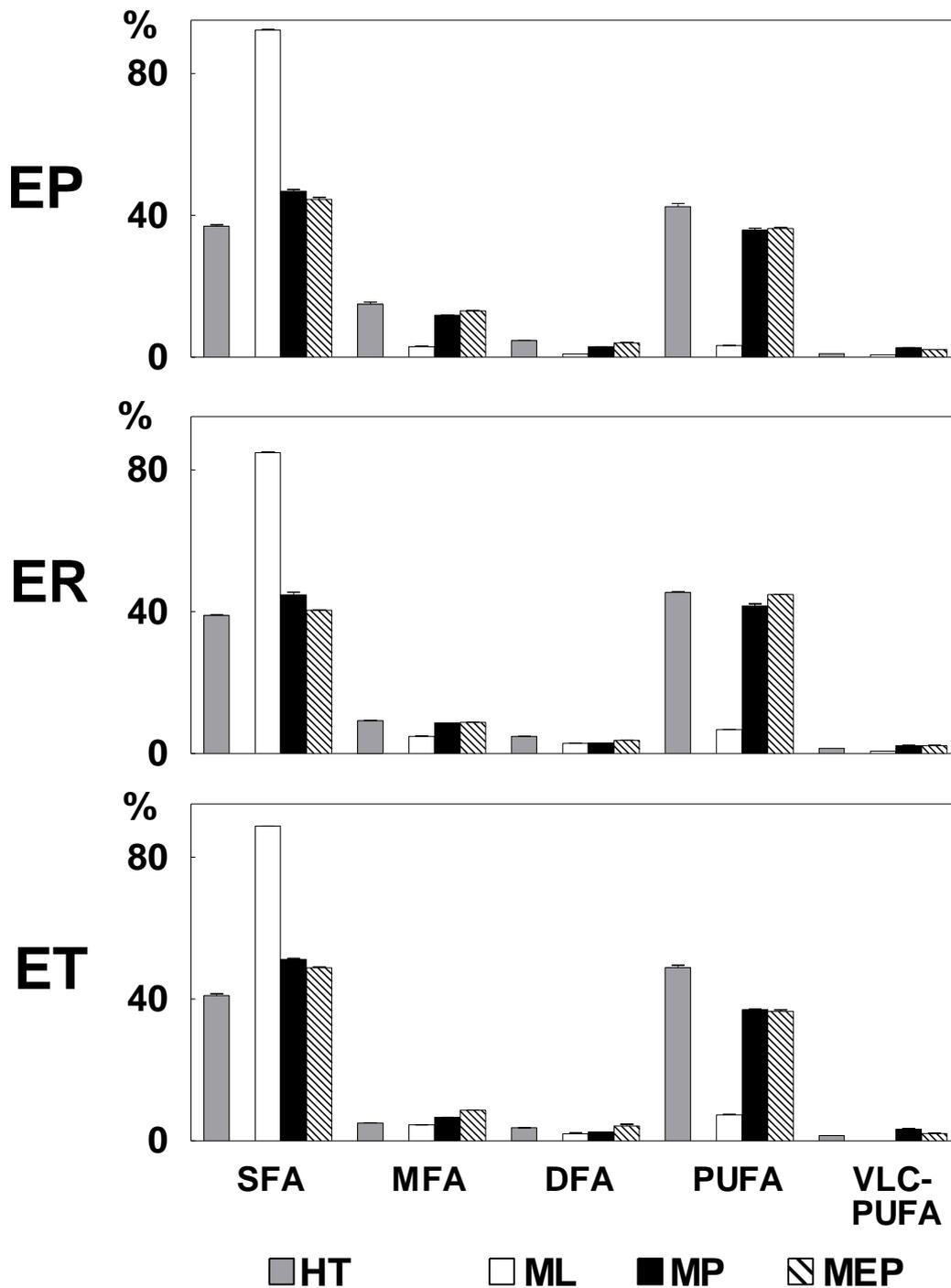
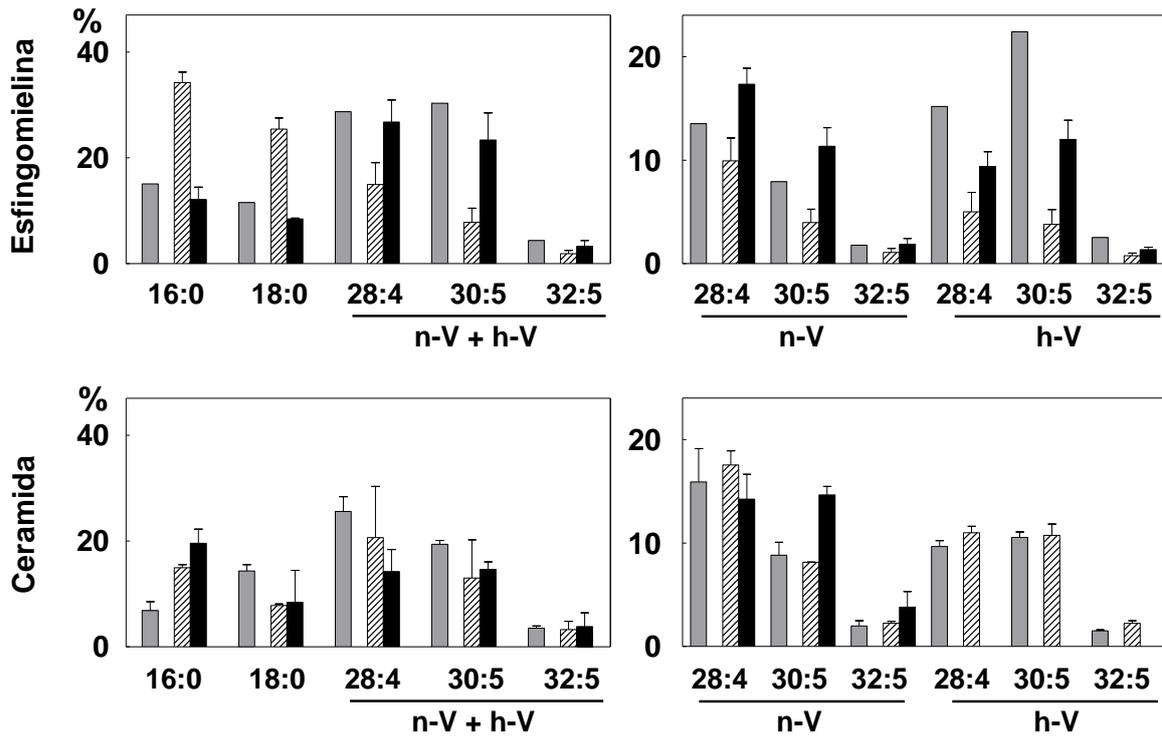


Figura 17. Diferencias en el *tipo* de ácidos grasos que predomina en los GPL de la fracción ML con respecto a los que abundan en las otras dos fracciones de membrana. Los % de ácidos grasos de GPL, obtenidos como se indica en la Fig. 13 para homogenados totales y fracciones de membrana de espermatoцитos en paquitenos (EP), espermátidas redondas (ER) y espermátidas tardías (ET), se agruparon en saturados, monoenoicos, dienoicos, y poliinsaturados de hasta 22 y de 24 o más carbonos (SFA, MFA, DFA, PUFA y VLCPUFA respectivamente). Mientras los GPL de MP y MEP fueron ricos en PUFA+SFA, los SFA predominaron claramente en los GPL de la fracción ML.

A



B

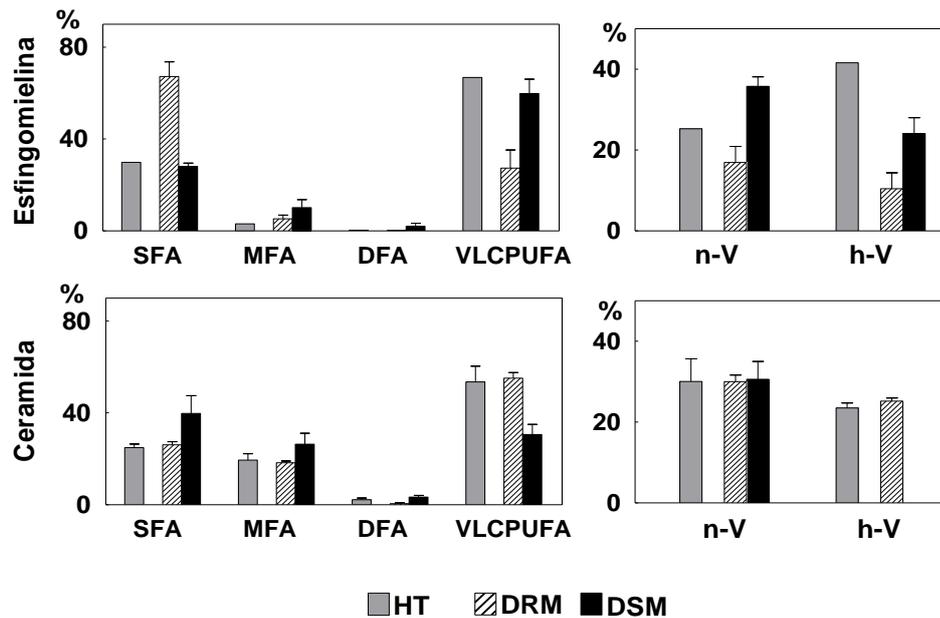


Figura 18. Ácidos grasos de las SM y Cer recuperadas de las fracciones DRM y DSM de células espermatogénicas totales de rata. Luego de aislar los dos lípidos desde los homogenados totales (HT) de partida y desde las dos fracciones, sus ácidos grasos se convirtieron en metil ésteres y se analizaron por cromatografía gaseosa. **A:** Composición porcentual, mostrando a la izquierda las proporciones de los principales ácidos grasos: dos saturados y tres VLCPUFA, y a la derecha, los n-V y los h-V individuales. **B:** Grupos de ácidos grasos, mostrando a la izquierda sumas de saturados (SFA), monoenoicos (MFA), dienoicos (DFA) y VLCPUFA (n-V+ h-V) y a la derecha, estos VLCPUFA, agrupados en n-V y h-V. Los datos de la Cer de la fracción DSM no se muestran por no haber podido recuperársela a causa de la interferencia del detergente en los extractos lipídicos de esta fracción (ver Fig. 4).

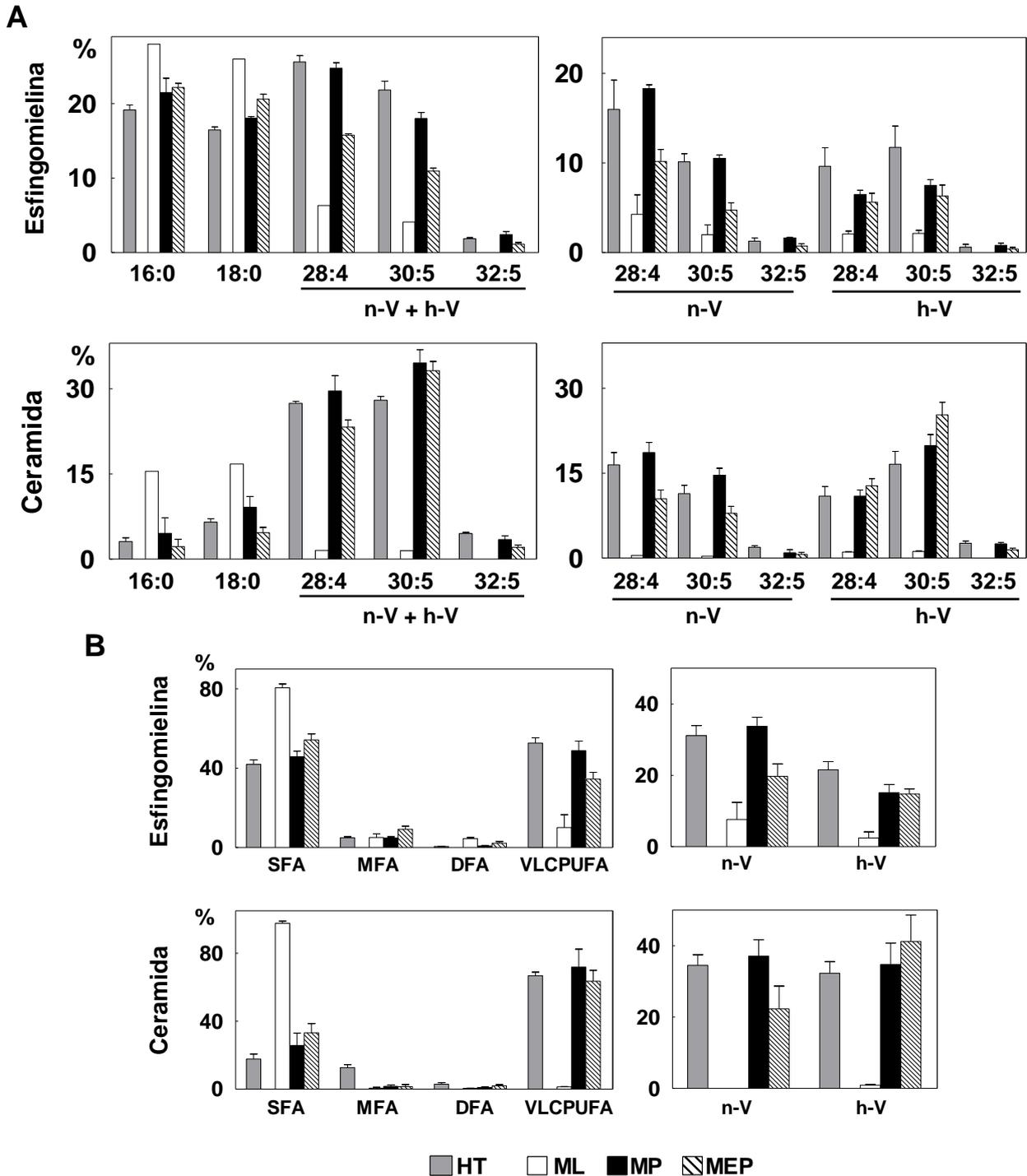


Figura 19. Ácidos grasos de las SM y Cer recuperadas de las fracciones de membrana ML, MP y MEP de células espermatogénicas totales de rata. Luego de aislar los dos lípidos de homogenados totales (HT) y de las tres fracciones, sus ácidos grasos se convirtieron en metil ésteres y se analizaron por cromatografía gaseosa. **A:** Composición porcentual, mostrando a la izquierda las proporciones de los principales ácidos grasos: dos saturados y tres VLCPUFA, y a la derecha, los n-V y los h-V individuales. **B:** Grupos de ácidos grasos, mostrando a la izquierda las sumas de saturados (SFA), monoenoicos (MFA), dienoicos (DFA) y VLCPUFA (suma de n-V+ h-V) y a la derecha, estos VLCPUFA agrupados en n-V y h-V.

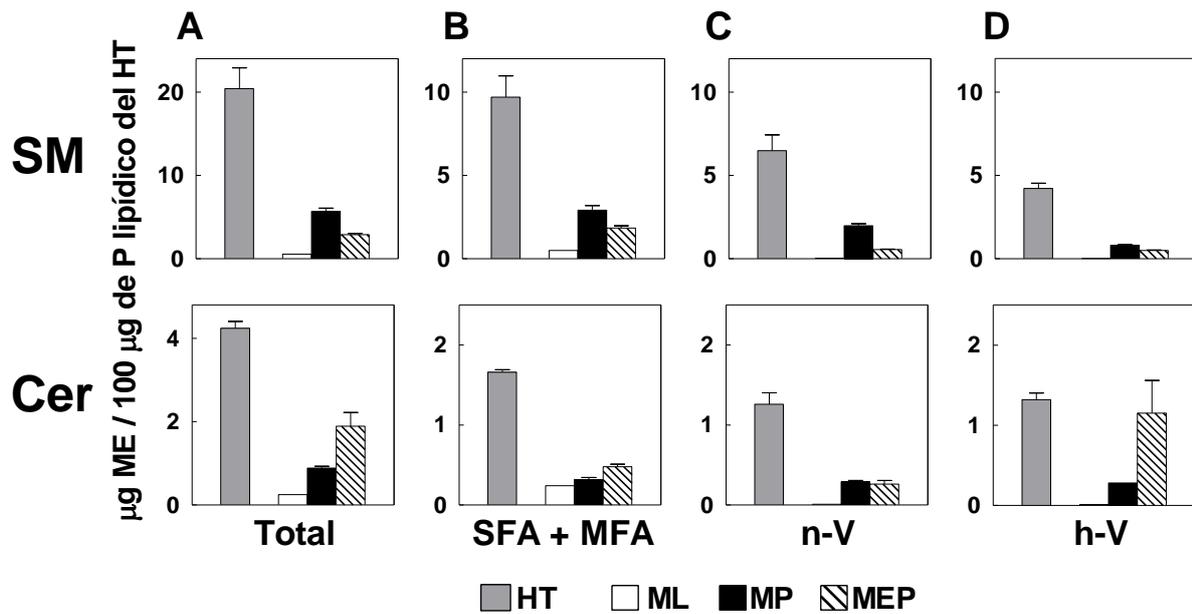
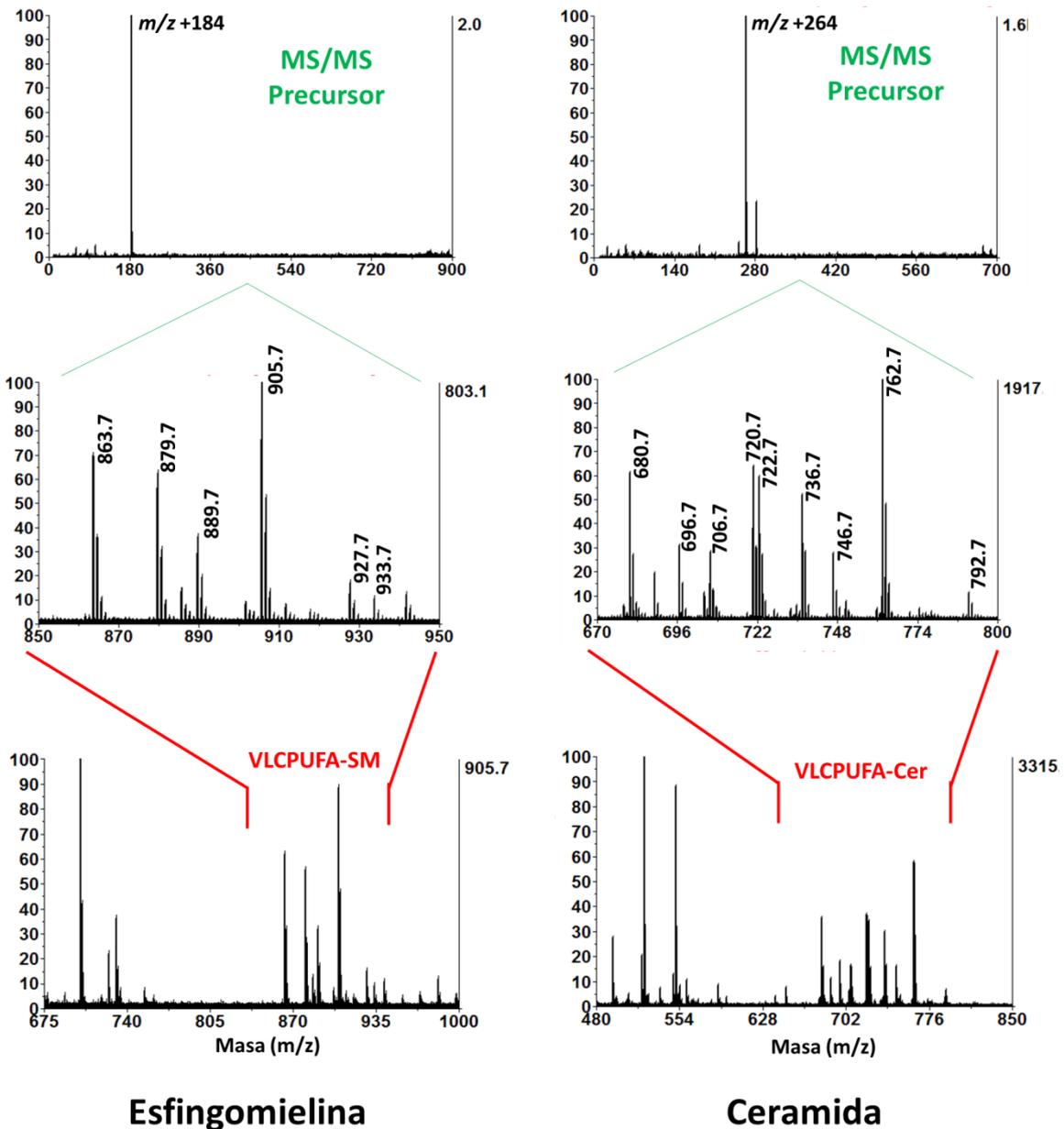


Figura 20. Contenido de SM y Cer en fracciones ML, MP y MEP de CT de rata, y de sus principales grupos de ácidos grasos. Los ácidos grasos de los dos lípidos se convirtieron en metil ésteres (ME) y éstos se cuantificaron por cromatografía gaseosa usando estándares internos. Los resultados se refirieron a una cantidad comparable del homogenado total (HT) de partida, fijada en 100 µg de P lipídico. **A:** Cantidades de ácidos grasos totales en SM y Cer. **B:** Cantidades de SFA + MFA. **C:** Cantidades de n-V. **D:** Cantidades de h-V, en cada lípido.

Tabla 6
Identificación de especies moleculares de esfingomielina (SM) y ceramida (Cer)
mediante espectrometría de masas MALDI-TOF.

ESFINGOMIELINAS		CERAMIDAS	
m/z	Especie molecular	m/z	Especie molecular
675.6	SM (d18:1/14:0) + H ⁺	492.6	Cer (d18:1/14:0) + H ⁺ - H ₂ O
703.5	SM (d18:1/16:0) + H ⁺	520.6	Cer (d18:1/16:0) + H ⁺ - H ₂ O
725.6	SM (d18:1/16:0) + Na ⁺	548.6	Cer (d18:1/18:0) + H ⁺ - H ₂ O
731.6	SM (d18:1/18:0) + H ⁺	574.6	Cer (d18:1/20:0) + H ⁺ - H ₂ O
753.6	SM (d18:1/18:0) + Na ⁺	576.6	Cer (d18:1/20:1) + H ⁺ - H ₂ O
757.6	SM (d18:1/20:0) + H ⁺	602.6	Cer (d18:1/22:1) + H ⁺ - H ₂ O
759.6	SM (d18:1/20:1) + H ⁺	604.7	Cer (d18:1/22:0) + H ⁺ - H ₂ O
785.6	SM (d18:1/22:1) + H ⁺	630.7	Cer (d18:1/24:1) + H ⁺ - H ₂ O
787.7	SM (d18:1/22:0) + H ⁺	632.7	Cer (d18:1/24:0) + H ⁺ - H ₂ O
813.7	SM (d18:1/24:1) + H ⁺	680.7	Cer (d18:1/28:4) + H ⁺ - H ₂ O
815.7	SM (d18:1/24:0) + H ⁺	696.7	Cer (d18:1/h28:4) + H ⁺ - H ₂ O
863.6	SM (d18:1/28:4) + H ⁺	706.7	Cer (d18:1/30:5) + H ⁺ - H ₂ O
879.7	SM (d18:1/h28:4) + H ⁺	720.7	Cer (d18:1/28:4) + Na ⁺
889.7	SM (d18:1/30:5) + H ⁺	722.7	Cer (d18:1/h30:5) + H ⁺ - H ₂ O
905.7	SM (d18:1/h30:5) + H ⁺	734.7	Cer (d18:1/32:5) + H ⁺ - H ₂ O
917.7	SM (d18:1/32:5) + H ⁺	736.7	Cer (d18:1/h28:4) + Na ⁺
927.7	SM (d18:1/h30:5) + Na ⁺	746.7	Cer (d18:1/30:5) + Na ⁺
933.7	SM (d18:1/h32:5) + H ⁺	750.7	Cer (d18:1/h32:5) + H ⁺ - H ₂ O
		762.7	Cer (d18:1/h30:5) + Na ⁺
		792.7	Cer (d18:1/h32:5) + Na ⁺

Las SM y Cer totales, purificadas a partir de testículo de rata, se analizaron mediante espectrometría de masas MALDI-TOF, lo cual permitió asignar una especie molecular para cada una de las principales señales detectadas. En la primera columna de cada tabla se muestra la relación masa/carga (m/z) de las especies moleculares detectadas para cada esfingolípido en modo positivo. En el caso de la SM, este valor corresponde al peso molecular (PM) de la molécula entera más un protón, ganado en la ionización que carga a la molécula de manera positiva. En el caso de la Cer, el valor m/z hace también referencia al PM de la molécula ionizada más un protón y menos una molécula de agua, ya que las Cer se deshidratan al ionizarse. Además, se incluyen aductos de sodio (+Na⁺) detectados para ciertas especies. Todas las especies moleculares de SM fueron identificadas mediante la presencia del producto iónico de $m/z +184$ correspondiente a la fosforilcolina (cabeza polar) cargada positivamente en el patrón de fragmentación, como se muestra en la Fig. 21. Las especies moleculares de Cer fueron identificadas mediante la presencia de fragmentos correspondientes a la esfingosina doblemente deshidratada, con un valor de $m/z +264$ (Fig. 21). Tanto las SM como las Cer detectadas contuvieron esfingosina (d18:1) como base esfingoidea en todas sus especies. Las SM y Cer con n-V y h-V están coloreadas en rojo y en azul, respectivamente.



Esfingomiolina

Ceramida

Figura 21. Identificación de especies moleculares de SM y Cer por patrones de fragmentación característicos generados por MALDI-TOF MS. En la parte inferior se muestran espectros de masas obtenidos al analizar muestras de SM y Cer purificadas obtenidas de células espermatogénicas, amplificadas en los rangos m/z correspondientes a las especies con VLCPUFA respectivas para cada esfingolípido. Arriba se presenta el mismo patrón de fragmentación obtenido para cada una de las especies de SM y Cer analizadas, con el pico de gran intensidad correspondiente a su producto iónico característico ($m/z +184$ para SM y $m/z +264$ para Cer).

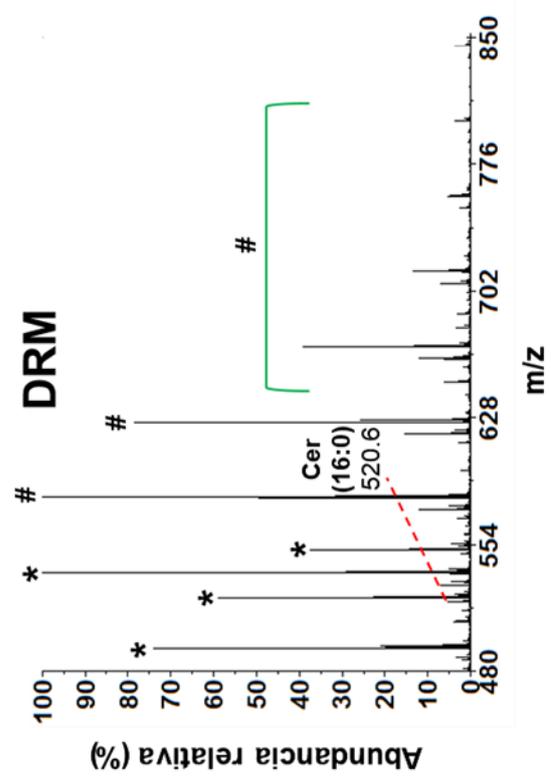
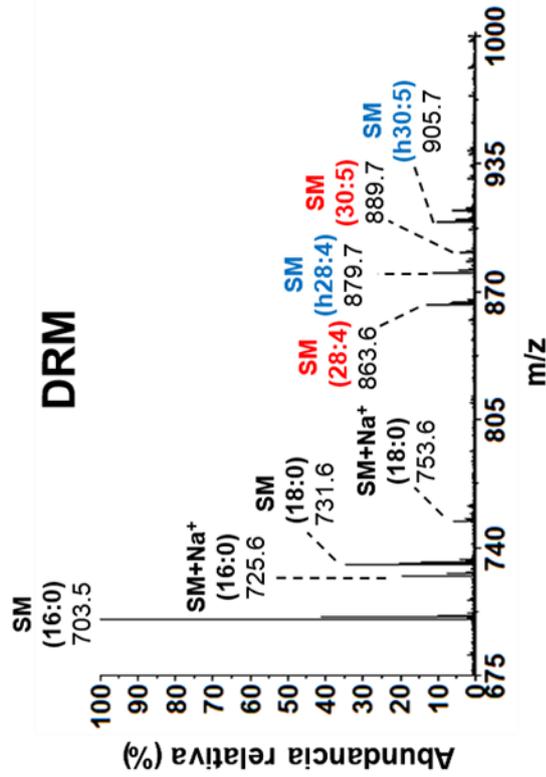
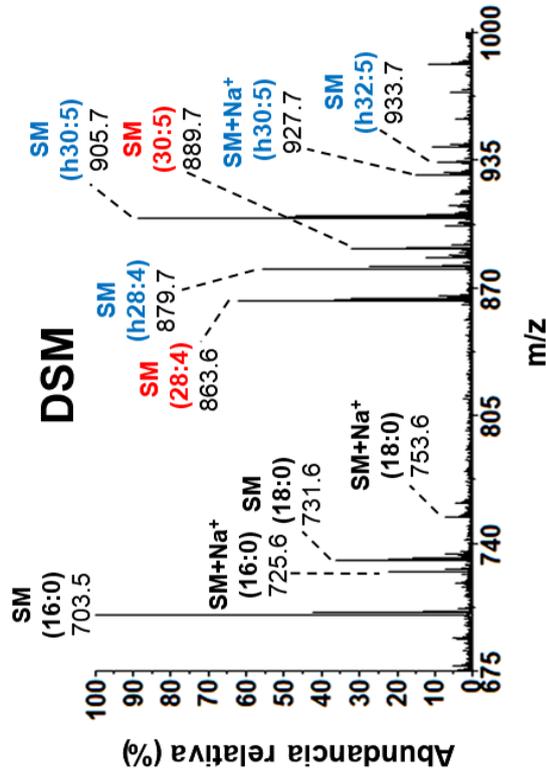


Figura 22. Análisis mediante espectrometría de masas MALDI-TOF de especies moleculares de esfingomielina (SM) y ceramida (Cer) en las fracciones de membrana obtenidas mediante el método que emplea detergente a partir de las células totales (CT) del epitelio seminífero de rata. Las especies moleculares se identificaron por los valores de m/z previamente obtenidos (Tabla 6). Todas las SM fueron identificadas mediante el producto iónico de $m/z +184$ en su patrón de fragmentación y poseen la misma base esfingoides (d18:1). Los picos señalados representan especies de SM protonadas o presentes en forma de aductos de sodio. Se muestra el espectro de una muestra de Cer de la fracción DRM, para ilustrar la cantidad traza de 16:0 Cer en esta fracción (m/z 520.6), y la dificultad que representó el tener que concentrar mucho la muestra para poder detectarla. Eso aumentó la intensidad relativa de señales atribuidas a la matriz (*) y a cantidades traza de productos (#) que podrían provenir de restos del detergente o de contaminantes de los solventes. Ninguno de ellos presentó el producto de fragmentación de $m/z +264$ propio de las Cer. El espectro de la Cer de la fracción DSM no se muestra por no representar en forma completa a la Cer con sus dos subclases (n-V Cer y h-V Cer), por los motivos expuestos en el texto.

SM

Cer

Células espermatogénicas totales

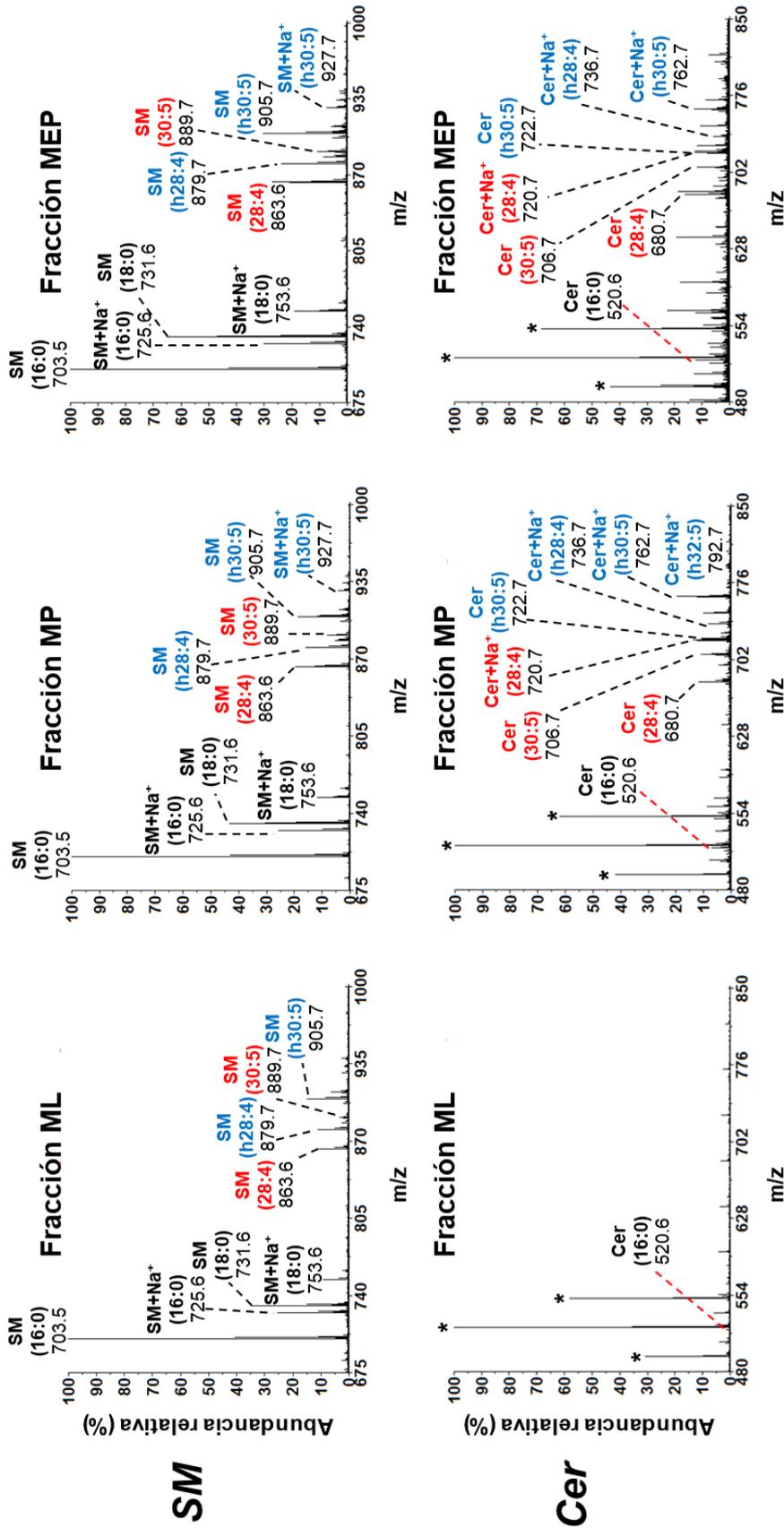


Figura 23. Análisis mediante espectrometría de masas MALDI-TOF de especies moleculares de esfingomielina (SM) y ceramida (Cer) de las fracciones de membrana obtenidas mediante el método libre de detergente a partir de las células totales (CT) del epitelio seminífero de rata. El eje de coordenadas indica la abundancia relativa (%) de cada señal respecto al pico de mayor intensidad, al cual se le asigna el valor de 100%. En cada espectro se encuentran señaladas las especies moleculares principales, identificadas como se especifica en la Tabla 6. En la fracción ML se detectaron pequeñas cantidades de 16:0 Cer (m/z 520.6) y estuvieron ausentes las Cer con VLCPUFA, que sí se hallaron en las fracciones MP y MEP. Los picos marcados con un asterisco (*) corresponden a señales iónicas de la matriz.

Espermaticitos en paquiteno

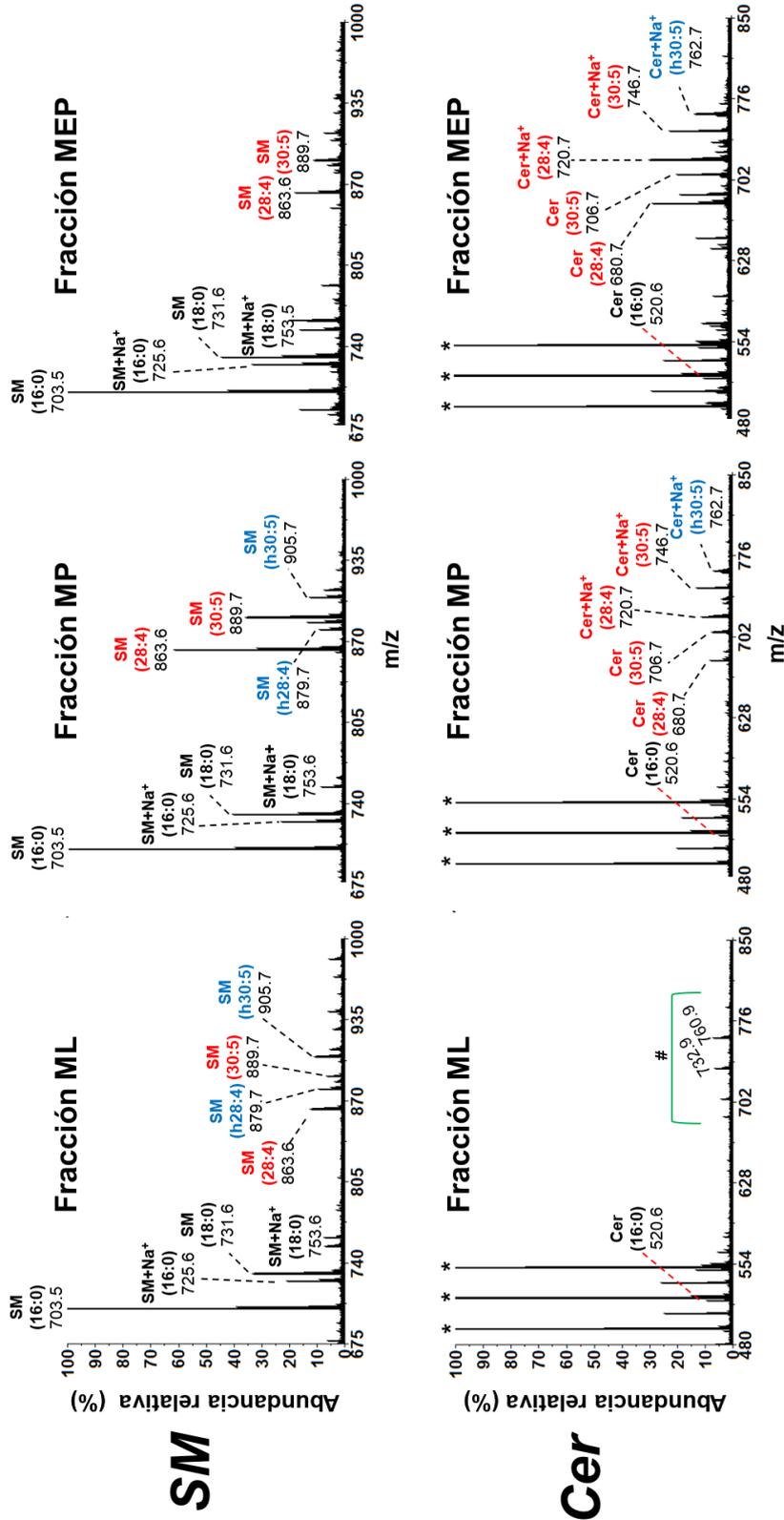


Figura 24. Análisis mediante MALDI-TOF MS de especies moleculares de esfingomielina (SM) y ceramida (Cer) en las fracciones de membrana obtenidas mediante el método libre de detergente a partir de espermaticitos en paquiteno. Los detalles en los espectros son los mismos que se describen en las Figuras 22 y 23. En cada espectro se señalan las principales especies moleculares detectadas y aquellas conteniendo n-V y h-V aparecen en color rojo y azul, respectivamente. Los picos indicados con un asterisco (*) corresponden a señales iónicas de la matriz. El rango m/z debajo del símbolo # corresponde a señales sin identificar

Espermátidas redondas

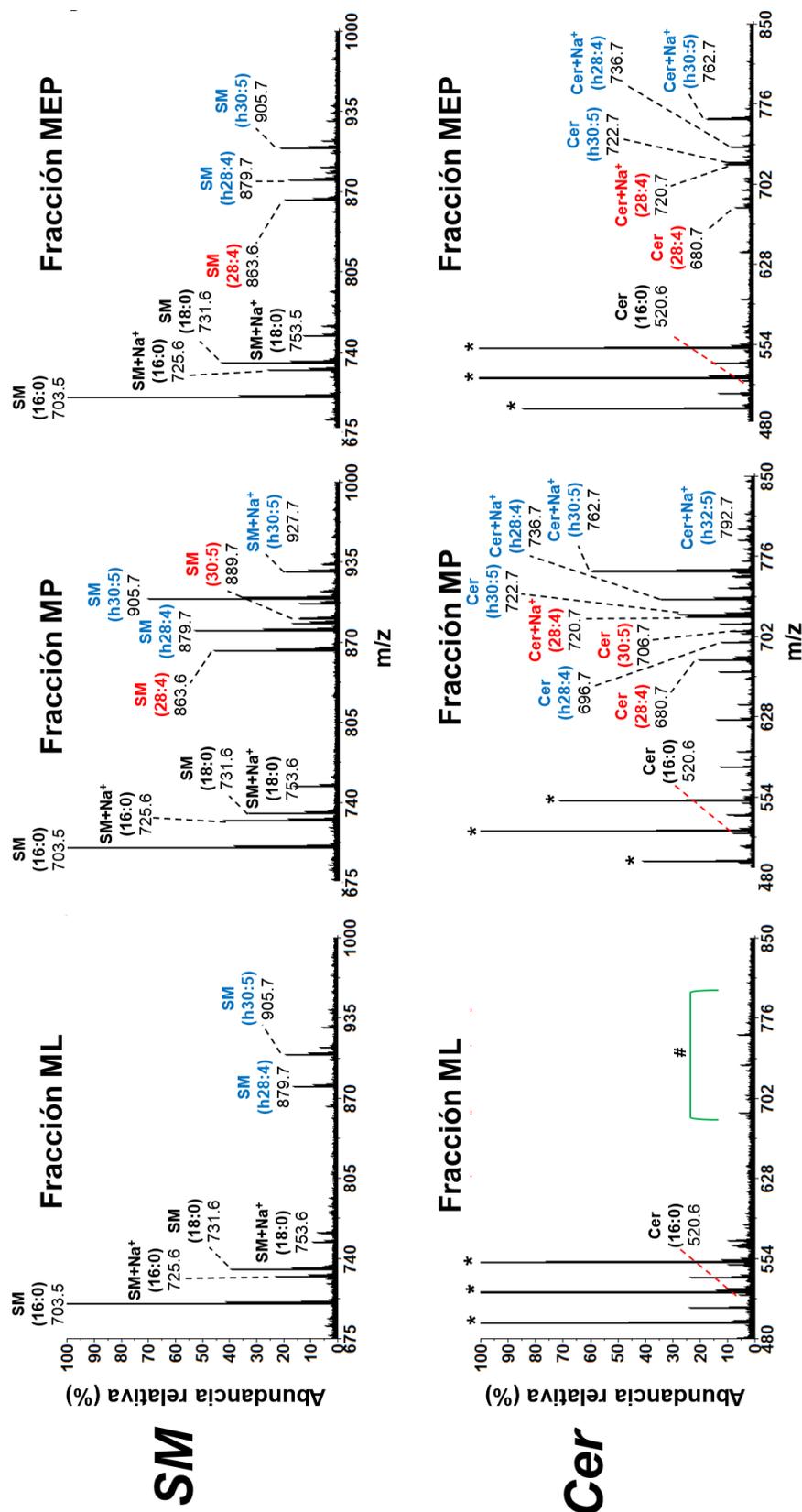


Figura 25. Análisis mediante MALDI-TOF MS de especies moleculares de esfingomielina (SM) y ceramida (Cer) en las fracciones de membrana obtenidas mediante el método libre de detergente a partir de espermátidas redondas. Los detalles en los espectros son los mismos que se describen en las Figuras 22 a 27. En cada espectro se señalan las principales especies moleculares detectadas y aquellas conteniendo n-V y h-V aparecen en color rojo y azul, respectivamente. Los picos indicados con un asterisco (*) corresponden a señales iónicas de la matriz. El rango de m/z debajo del símbolo # corresponde a señales sin identificar. En la fracción MP se detectó una señal de m/z 792.7 correspondiente a (d18:1/h32:5)n-6 + Na⁺ Cer.

Espermáticas tardías

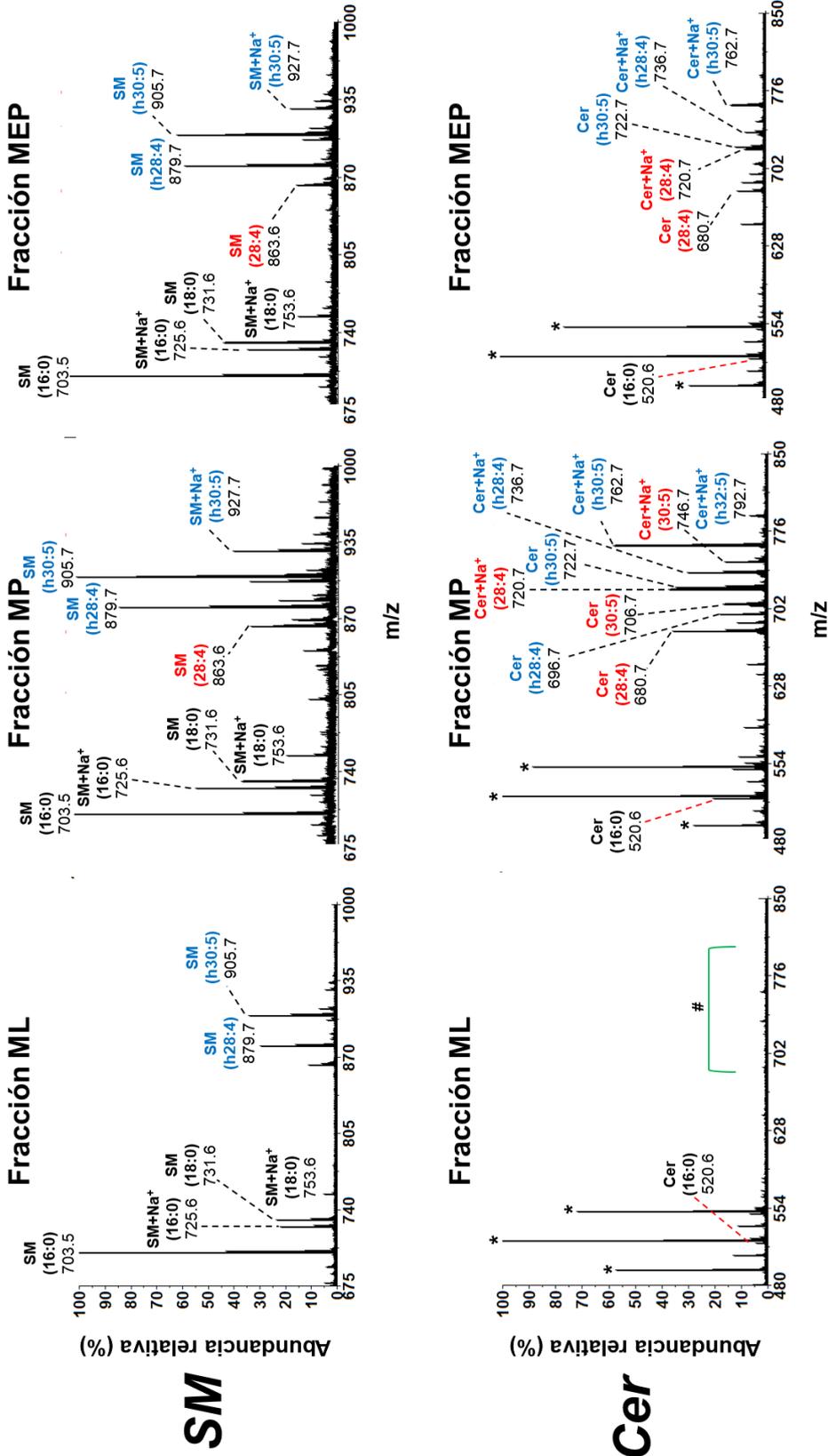


Figura 26. Análisis mediante MALDI-TOF MS de especies moleculares de esfingomielina (SM) y ceramida (Cer) en las fracciones de membrana obtenidas mediante el método libre de detergente a partir de espermáticas tardías. Los detalles en los espectros son los mismos que se describen en las Figuras 22 a 27. En cada espectro se señalan las principales especies moleculares detectadas y aquellas conteniendo n-V y h-V aparecen en color rojo y azul, respectivamente. Los picos indicados con un asterisco (*) corresponden a señales iónicas de la matriz. El rango m/z debajo del símbolo # corresponde a señales sin identificar. Al igual que en las ER, en la fracción MP se detectó una señal de m/z 792.7 correspondiente a (d18:1/h32:5n-6 + Na⁺) Cer.

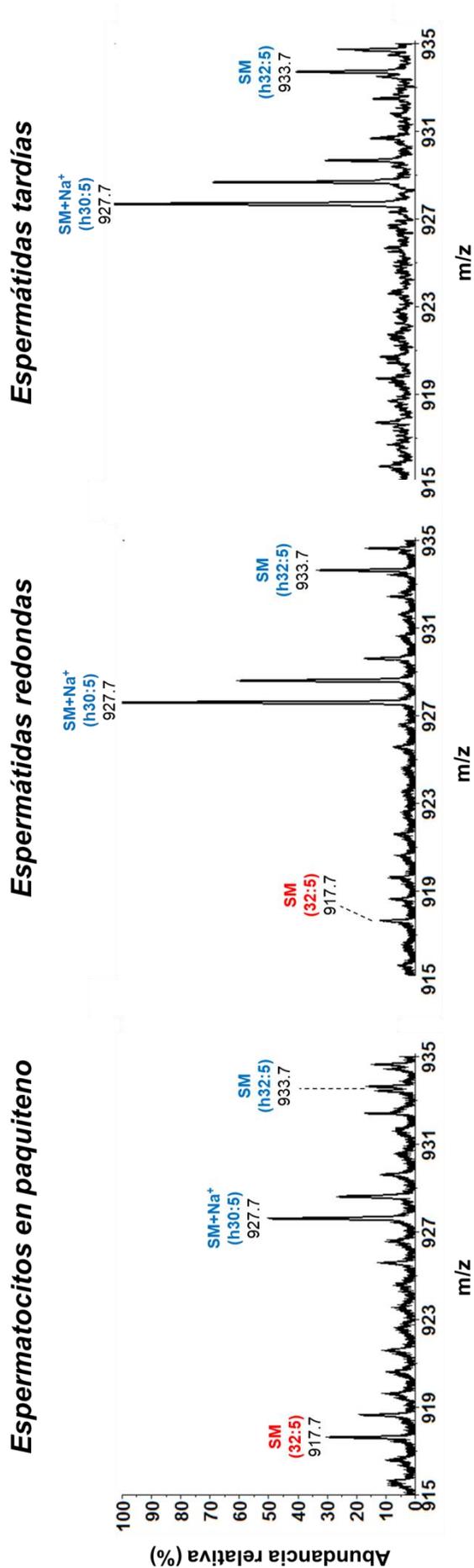


Figura 27. Magnificación del espectro de masas MALDI-TOF MS de especies moleculares de esfingomielina (SM) de la fracción MP de células espermátogénicas en tres estadios de su diferenciación. Una mayor amplificación de la región m/z 915-935 de los espectros de masas de la fracción MP de las figuras anteriores permitió la detección de especies moleculares de SM conteniendo n-V y h-V con 32 átomos de carbono. Las señales de m/z 917.7 y m/z 933.7 corresponden a d18:1/32:5n-6 SM y d18:1/h32:5n-6 SM, respectivamente.

***RESULTADOS -
CAPÍTULO II***

II. EXPRESIÓN DE ELONGASAS Y DE 2-HIDROXILASA DE ÁCIDOS GRASOS EN EL TESTÍCULO DE RATA DURANTE EL DESARROLLO POSTNATAL Y LA DIFERENCIACIÓN CELULAR

En esta parte de la tesis nos propusimos reunir evidencia directa acerca de la capacidad de las células germinales para sintetizar los característicos PUFA de 20 y 22 carbonos de los glicerofosfolípidos y de los VLCPUFA de 24 a 30 o más átomos de carbono que forman parte de las moléculas de SM y Cer de las membranas de las células germinales. La pregunta a responder era si éstas poseen autónomamente dicha capacidad, o si, como se pensaba décadas atrás (Beckman y Coniglio, 1979; Griswold, 1993), los PUFA son biosintetizados en las células de Sertoli para ser provistos a las germinales, tal como ocurre con muchos metabolitos y sustratos energéticos.

Nos propusimos entonces estudiar la expresión, en células espermatogénicas y de Sertoli, de las elongasas de ácidos grasos, con un foco especial sobre la Elov14 porque fue la enzima identificada en 2008 como responsable de la biosíntesis de los VLCPUFA presentes en la fosfatidilcolina de la retina (Agbaga *et al.*, 2008). En este contexto, también fueron incluidas en este estudio otras elongasas (Elov15, Elov12), cuya actividad es necesaria para producir, no sólo los muy abundantes PUFA de 20 y 22 carbonos de los glicerofosfolípidos, sino los PUFA de 24 carbonos que van a ser elongados por la Elov14 para producir los VLCPUFA de los esfingolípidos.

Por otra parte, en vista de la alta proporción de VLCPUFA 2-hidroxiados (h-V) en la SM y Cer de células germinales de rata en estadios avanzados de su diferenciación (Oresti *et al.*, 2010b; Zanetti *et al.*, 2010 y Capítulo I de esta tesis), incluimos en el estudio a la enzima 2-hidroxiada de ácidos grasos (Fa2h). En el presente capítulo se muestran los resultados obtenidos al comparar los niveles de expresión (ARNm) de los genes de las elongasas *Elov12*, *Elov14*, *Elov15* y de la hidroxiada *Fa2h* en el testículo inmaduro durante el desarrollo postnatal y en el testículo de animales adultos durante la diferenciación celular.

Para el estudio de los cambios en los niveles de ARNm durante la diferenciación se utilizaron poblaciones de células aisladas del epitelio seminífero de rata en los estadios de espermátocitos en paquiteno (**EP**), espermátidas redondas (**ER**) y espermátidas tardías (**ET**) y cuerpos residuales (**CR**). Se utilizaron además poblaciones de células de Sertoli (**SC**) puras, esto es, previamente desprovistas de células germinales. Además, se describen interesantes hallazgos sobre la expresión de las proteínas codificadas por los genes *Elov14* y *Fa2h*. También se presenta evidencia de la capacidad de las células germinales aisladas y en cultivo para sintetizar PUFA y VLCPUFA, como manifestación de la actividad enzimática conjunta de Elov15, Elov12 y Elov14.

1. EXPRESIÓN DE GENES DE LA FAMILIA DE LAS ELONGASAS (*Elov*)

En trabajos previos de nuestro grupo se había visto que los genes *Elov2* y *Elov5*, que codifican enzimas involucradas en la elongación de PUFA de 18 y 22 carbonos, se expresan a nivel ARNm en EP y ER de rata (Oresti *et al.*, 2010b). En el presente trabajo de tesis hemos extendido el estudio a los demás miembros conocidos de la familia *Elov*, y a otros estadios de la diferenciación además de haber incluido a los túbulos seminíferos (TS) y a las células de Sertoli (SC) (**Figura 1**).

Exceptuando a *Elov3*, seis de los siete miembros de la familia de genes *Elov* descritos para mamíferos se expresaron en los TS de rata y en las células aisladas a partir de los mismos. Los ARNm de *Elov1*, *Elov2*, *Elov4*, *Elov5* y *Elov6* se expresaron activamente tanto en los EP y las ER como en las SC. Por su parte, aunque débilmente, el ARNm de *Elov7* se expresó únicamente en las SC. En términos semicuantitativos, el transcrito más abundante en las SC fue el de *Elov6*.

2. EXPRESIÓN CUANTITATIVA DEL ARNm DE LOS GENES *Elov5*, *Elov2*, *Elov4* Y *Fa2h*

Con la hipótesis de que *Elov4* y *Fa2h* están involucradas en distintos pasos de la biosíntesis de los VLCPUFA (n-V y h-V) presentes en las células espermatogénicas se investigaron los cambios cuantitativos en los niveles de expresión de estos genes durante el desarrollo postnatal y durante la diferenciación de las células germinales. En paralelo se hizo lo mismo para los niveles de ARNm de las enzimas *Elov2* y *Elov5*, involucradas en producir los PUFA de 24 carbonos que sirven como sustrato a la *Elov4*.

En la **Figura 2** se muestran las curvas de eficiencia de amplificación por qPCR de los cuatro genes en estudio (*Elov2*, *Elov4*, *Elov5* y *Fa2h*), y de 5 candidatos a genes de referencia, utilizando los pares de *primers* especificados en la Tabla 2 de la sección Materiales y Métodos. Para ambos tipos de genes, las eficiencias (E) calculadas a partir de las curvas fueron de valores similares y cercanos al valor máximo 1 (cercanas al 100%, entre 104% y 110%). Esto confirma que los *primers* diseñados permiten una amplificación eficiente (el producto se duplica en cada ciclo), y asegura una comparación confiable y precisa de la cantidad de producto amplificado entre los genes de interés y los genes de referencia, validando así las cantidades relativas descritas a continuación.

Además, al resolver los productos amplificados en un gel agarosa, para cada gen se obtuvo una única banda de peso molecular coincidente con el esperado para la secuencia amplificada, confirmando la especificidad de los *primers* utilizados y la ausencia de productos no específicos (**Figura 3**).

2.1. *Elov15*, *Elov12* y *Elov14*

• **Expresión durante el desarrollo postnatal**

En la **Figura 4** se comparan los niveles de transcritos para cada una de estas tres elongasas medidos en testículos de rata a los siguientes días postnatales (P): P14, P21, P25, P30, P37, P45, P60 y P90.

Elov15 fue la isoforma que se expresó en forma más estable durante el desarrollo postnatal en el testículo de rata, mostrando que los niveles del transcritos no variaron significativamente desde la edad infantil (P14) hasta la adultez en los testículos.

En cambio, los niveles de ARNm de *Elov12* fueron muy bajos en los estadios tempranos del desarrollo (P14). Estos aumentaron significativamente en el P21 y P25, en coincidencia con la aparición de la primera generación de espermátocitos en paquiteno. Luego mostraron un notorio incremento desde P25 a P30, concurrentemente con el tiempo de aparición en el testículo de la primera generación de espermátidas, para permanecer en niveles elevados hasta la adultez.

Muy llamativamente, el patrón de expresión de *Elov14* durante el desarrollo del testículo mostró la tendencia opuesta. Los niveles más altos de transcritos de este gen se encontraron a la edad infantil (P14), disminuyeron significativamente hacia el día P25 y, aunque más lentamente, continuaron disminuyendo durante el período siguiente hasta alcanzar una meseta y niveles relativamente estables en la edad adulta (P90).

Al comparar los niveles de expresión del ARNm de las tres elongasas en los extremos de las edades estudiadas, P14 y P90 (**Figura 5**), quedó claro que *Elov14* fue la isoforma que se expresó en forma predominante en testículos infantiles (P14) seguida de *Elov15* y en tercer lugar de *Elov12*. Por el contrario, en el testículo adulto (P90), predominó la expresión de *Elov12* seguida de niveles relativamente similares de *Elov14* y *Elov15*.

• **Expresión en células del epitelio seminífero**

En la **Figura 6** se comparan los niveles de expresión de cada una de las tres elongasas en estudio en tres poblaciones de células espermátogénicas (EP, ER y ET), en cuerpos residuales (CR) y en células de Sertoli (SC) de rata.

Elov15 mostró niveles de ARNm similares en ambos tipos de espermátidas (ER \approx ET) y en éstas varias veces superior a los de los EP. Los CR presentaron un nivel intermedio entre las espermátidas y los EP. En estos últimos los niveles de expresión de *Elov15* fueron de un orden similar al registrado en las SC.

Elov2 se expresó muy intensamente en los tres tipos de células espermatogénicas, con niveles de ARNm similarmente altos en EP y ER, que decrecieron significativamente con la diferenciación a ET, y hallándose niveles del transcrito significativamente menores en los CR. Sin ser despreciable (valor Cq= 24, habitualmente valores por encima de Cq= 30 se consideran de muy baja expresión) la expresión de *Elov2* fue significativamente más baja en las SC, en comparación con las células de la línea germinal.

Llamativamente, se encontraron altos niveles del transcrito de *Elov4* en las células de Sertoli (Fig. 6). Esta observación, si bien nos sorprendió, aportó una explicación a la elevada expresión de este gen en el testículo al día P14 (Fig. 4), teniendo en cuenta que en ese momento del desarrollo el epitelio seminífero está compuesto principalmente por estas células (65% de las células testiculares). Considerando que las presentes preparaciones de células de Sertoli fueron obtenidas de testículos prepúberes (P14) y cultivadas por dos semanas con cambios periódicos del medio de cultivo *antes* de extraer su ARNm, y sabiendo que estas células son fagocíticas, por lo que en ese período eliminan células y restos celulares, es poco probable que tal ARNm pertenezca a células espermatogénicas (principalmente espermatogonias) que potencialmente podrían estar contaminando las muestras. Por lo tanto, los niveles elevados del ARNm de *Elov4* encontrados en las preparaciones de células de Sertoli aquí analizadas pueden ser considerados constitutivos.

Entre las células espermatogénicas aisladas del epitelio seminífero adulto, los niveles del ARNm de *Elov4* fueron cada vez mayores a medida que progresó la diferenciación celular en el sentido EP→ER→ EP, concentrándose aún más en los CR. Esto sugiere que gran parte este ARNm, contenido durante la diferenciación en el citoplasma de las células germinales, termina por ser acumulado en los CR en las últimas fases de la espermiogénesis, para ser metabolizado en las células de Sertoli. Apoya esta idea el hecho de que el producto de este ARNm, la proteína Elov4, no se detectó en los CR, como veremos más adelante.

Al comparar los niveles de ARNm de cada una de las tres elongasas entre sí en cada uno de los tipos de células espermatogénicas, observamos que tanto en los EP como en las espermátidas predominó la expresión de *Elov2*, seguida de la de *Elov5*, siendo *Elov4* la elongasa de PUFA con menor expresión en todos los casos (Fig. 6). Esto es consistente con la composición de los lípidos que vimos en el Capítulo I, dado que los PUFA de 20 a 22 carbonos son los ácidos grasos mayoritarios en los GPL totales de estas células (Capítulo I), mientras que los de 26 a 32 carbonos se concentran en una parte de los esfingolípidos, por lo que representan una proporción menor de los ácidos grasos totales de estas células.

El hecho de que en las células de Sertoli aisladas se observó lo opuesto, esto es, que los niveles de ARNm de *Elov14* fueran mayores que los de *Elov15*, y éstos mayores que los de *Elov12* (Fig. 6) fue consistente con lo observado en testículos prepúberes y adultos (Fig. 5). Así, la supremacía de estas células en el epitelio seminífero de los testículos prepúberes explica las cantidades relativamente altas del ARNm de *Elov14* en relación al de las otras dos elongasas en el P14. El hecho de que en el testículo adulto el número de estas células es muchas veces inferior al de las células espermatogénicas totales en diferenciación, explica las cantidades relativamente más altas del ARNm de *Elov12* que del de *Elov14*.

2.2. *Fa2h*

Durante el desarrollo postnatal, los niveles del ARNm de *Fa2h* fueron indetectables en el testículo hasta el P25, aumentaron rápidamente de P25 a P30, en coincidencia con la aparición de las primeras ER, y mostraron un incremento aún más abrupto entre P30 a P35, en coincidencia con el tiempo en que las espermátidas comienzan su elongación (**Figura 7**). Luego de este pico, los niveles del ARNm sufrieron una significativa aunque temporaria caída desde P35 a P45, seguido de un aumento menos pronunciado, pero constante, a partir de entonces hasta la edad adulta (P90).

A diferencia de los altos niveles del ARNm de *Elov14* encontrados en las células de Sertoli, el ARNm de *Fa2h* estuvo virtualmente ausente en ellas (**Figura 8**). Entre las células espermatogénicas, los niveles del transcrito de *Fa2h* fueron más bajos en los EP meióticos que en ambos tipos de espermátidas, siendo mayores en las ER. Si bien los CR contuvieron algo del ARNm de *Fa2h*, su expresión fue mucho menor en ellos que en las células espermatogénicas.

2.3. *Expresión de Elov15, Elov12, Elov14, y Fa2h en testículos adultos desprovistos de células espermatogénicas*

Como se explicó en el Capítulo 1, las exposiciones cortas (15 minutos) y repetidas (una por día) de los testículos de ratas adultas a hipertermia moderada (43°C) resultan en una pérdida significativa de las células espermatogénicas con permanencia de las células de Sertoli en los túbulos seminíferos (Furland *et al.*, 2011). Aunque se ven afectadas en algunas de sus funciones, estas últimas permanecen viables junto con las espermatogonias (Vallés *et al.*, 2014) por lo que tiempo después la espermatogénesis recomienza. Si las exposiciones mencionadas se repiten durante 5 días consecutivos, los testículos se hallarán despoblados de células germinales 2 semanas después, parcialmente repoblados 6 semanas después, y habrán retornado a un estado cercano a la normalidad 12 semanas después (Furland *et al.*, 2011).

Como una medida indirecta de determinar si los altos niveles del ARNm de *Elov4* observados en las células de Sertoli y testículos prepúberes ricos en ellas eran también una característica de estas células en el testículo adulto, utilizamos este modelo experimental para obtener testículos adultos relativamente enriquecidos en células de Sertoli. En ratas controles y sometidas al protocolo de hipertermia, estudiamos, 2 semanas y 6 semanas después, sus efectos sobre la expresión de los genes *Elov5*, *Elov2*, *Elov4* y *Fa2h*.

Dos semanas después de los episodios de hipertermia, se comprobó una notable reducción del diámetro de los túbulos seminíferos asociada a la pérdida de células germinales (**Figura 9**). Estas células fueron eliminadas de los túbulos, y a las 2 semanas post-hipertermia las células de Sertoli fueron el tipo principal de células que quedaron presentes en los mismos, junto con algunas espermatogonias indiferenciadas. A la semana 6 post-hipertermia la mayoría de los túbulos había aumentado su tamaño para acoger a nuevas generaciones de células germinales que surgieron a partir de esas espermatogonias (Figura 9). El epitelio seminífero había comenzado a ser repoblado por las células espermatogénicas, con preeminencia de EP, y pudieron observarse en algunos túbulos incipientes poblaciones de espermátidas.

A la semana 2 post-hipertermia, los cambios celulares descritos fueron acompañados por un marcado descenso de la expresión de *Elov2* (**Figura 10**). Al mismo tiempo, los niveles del ARNm de *Elov4* no sólo no disminuyeron, sino que mostraron una tendencia al aumento, aunque éste no fue significativo. Por su parte, los niveles de expresión de *Elov5* aumentaron notablemente. Esto sugiere que la mayor parte de la expresión elevada de estos dos últimos genes podría estar ocurriendo en las células de Sertoli, en este momento las mayoritarias en el epitelio seminífero.

A la semana 6 post-hipertermia, los niveles de ARNm de *Elov4* y *Elov5* habían disminuido con respecto a la semana 2, retornando a los niveles típicos del control. A su vez, el de *Elov2* se había elevado significativamente con respecto a la semana 2, alcanzando una recuperación parcial de un $\approx 60\%$ del valor control (Figura 10).

En el caso de *Fa2h*, la expresión del transcripto prácticamente desapareció en paralelo con las células espermatogénicas a la semana 2 post-hipertermia (**Figura 11**). Ello indicó que este ARNm no sólo se encuentra virtualmente ausente de las células de Sertoli obtenidas de testículos prepúberes (Figura 8), sino también en aquellas presentes en adultos. Como en el caso de *Elov2*, la tendencia a la restitución del epitelio seminífero a la semana 6 fue acompañada por la recuperación parcial de los niveles del ARNm de *Fa2h*.

A semejanza de lo ocurrido en el testículo inmaduro normal durante el desarrollo postnatal entre P14 (semana 2) y P37-P45 (semanas 5.3-6.4, esto es, \approx semana 6) (Figs. 4

y 7), entre las semanas 2 y 6 post-hipertermia en el testículo maduro los niveles relativos del ARNm de *Elov12* y *Fa2h* tendieron a aumentar y los de *Elov14* a disminuir (Figuras 10 y 11). El factor común a ambas condiciones es que el tejido testicular, en ese intervalo de 4 semanas, pasó de ser "predominantemente Sertoli" a "predominantemente espermatogénicas" desde el punto de vista celular.

3. EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA Elov14 EN EL TEJIDO TESTICULAR

Al inicio de esta tesis no se había reportado en la literatura la presencia de la proteína Elov14 en el testículo de rata. Se sabía sin embargo que se encuentra fuertemente expresada en la retina de mamíferos (Zhang *et al.*, 2001; Lagali *et al.*, 2003), donde es requerida para la biosíntesis de los VLCPUFA típicos de la fosfatidilcolina de las células fotorreceptoras (Agbaga *et al.*, 2008; Harkewicz *et al.*, 2012). Es por ello que en nuestros estudios utilizamos retinas de ratas adultas como control positivo para poner a punto los ensayos de inmunodetección de Elov14 mediante *Western blot* (WB) e inmunohistoquímica.

En el WB que se muestra en la **Figura 12 A** se pudo comprobar que la proteína Elov14 se expresa en los túbulos seminíferos (TS) de ratas adultas. Al emplear un anticuerpo específico para esta proteína, previamente validado en un control positivo como es la retina (Agbaga *et al.*, 2008), la banda obtenida coincidió con la esperada.

Usando el mismo anticuerpo en cortes histológicos de retina como control positivo, se lograron determinar las condiciones adecuadas para la detección de Elov14 *in situ* en un corte de tejido. Como se reportó previamente (Agbaga *et al.*, 2008) la expresión de Elov14 estuvo confinada a los segmentos internos (IS) de los fotorreceptores y al citoplasma que rodea los núcleos de los mismos, dispuestos en la capa nuclear externa (ONL) (**Figura 12 B**). La especificidad de la inmunofluorescencia detectada en esta figura se confirmó cuando no se observó fluorescencia al omitir el anticuerpo primario (**Figura 12 C**).

3.1. Expresión durante el desarrollo postnatal y la diferenciación celular

En notable contraste con los altos niveles del ARNm de *Elov14*, la proteína codificada por este gen estuvo *ausente* en estadios tempranos del desarrollo testicular (P14) (**Figura 13**). Elov14 fue detectada mediante WB recién a partir del P21, en coincidencia con la aparición de los primeros EP y permaneció presente en el testículo hasta la adultez.

La cuantificación mostró que la expresión relativa de esta proteína alcanzó su máximo en el P25, edad en la que el epitelio seminífero se encuentra mayormente poblado por EP. En los estadios posteriores del desarrollo, la expresión de Elov14 disminuyó significativamente, permaneciendo en niveles similares desde P37 (cuando ya ha comenzado la espermiogénesis) en adelante (Figura 13).

El tiempo de aparición de esta proteína en el testículo fue confirmado mediante inmunofluorescencia (**Figura 14**). Se pudo apreciar claramente la ausencia de marca correspondiente a Elov14 en cortes de testículos infantiles (P14). Su presencia se hizo evidente a partir del P21, tiempo al cual ya ha comenzado la fase meiótica de la espermatogénesis y persistió hasta la adultez.

Al examinar con mayor detalle la distribución de Elov14 entre las células del testículo durante el desarrollo se observó que la marca se restringió a células intratubulares, más específicamente a células espermatogénicas en diferenciación (**Figura 15**). Así, las células de Sertoli (SC, en la figura) y las espermatogonias (EG) indiferenciadas que entre ambas conforman todo el espesor del epitelio seminífero en la edad infantil (P14) no expresaron la proteína. Lo mismo ocurrió con estas células en el P21, donde aparecen dispuestas en una única fila, con sus núcleos muy cercanos entre sí, formando una capa adyacente a la membrana basal (MB) de los túbulos. Sorprendentemente, la intensa marca detectada en esta edad correspondió a la primera generación de espermátocitos primarios (E1°), mayormente en la fase paquiteno de la meiosis I.

En el adulto, en que el epitelio seminífero se encuentra constituido mayormente por células espermatogénicas en diferentes estadios de su diferenciación, la proteína Elov14 se continuó expresando fuertemente en los EP, pero también se detectó en las espermátidas (ER y elongadas, incluyendo ET). Sin embargo, no se detectó su presencia en los espermatozoides testiculares ubicados en la luz tubular, indicando que su expresión sólo ocurre durante el ciclo espermatogénico, no necesitándola las gametas una vez liberadas del epitelio seminífero.

Consistentemente, los ensayos de WB confirmaron la ausencia de la proteína Elov14 en las células de Sertoli (**Figura 16**) y su presencia en los tres estadios de células espermatogénicas aisladas del epitelio seminífero adulto, siendo más abundante en los EP que en ER y en ET. Además, no se detectó en los CR.

En diferentes secciones del epitelio seminífero adulto la marca correspondiente a Elov14 se concentró en los EP adluminales, se hizo un poco más tenue en la población de espermátidas redondas, y reapareció más intensa en las espermátidas en elongación (EE) cercanas a la luz tubular (**Figura 17**).

Fue interesante observar que la intensidad de la marca detectada en los EP varió con el estadio del ciclo espermatogénico (ver Fig. 17 de Figuras y Tablas- Capítulo II y esquema representativo del ciclo de diferenciación de las células espermatogénicas en rata y de los estadios tubulares asociados en Fig. 4 de la sección Introducción), que fue muy intensa en los EP que estaban en los estadios tubulares II-IV y VII-VIII, se volvió mucho más débil en

aquellos EP de los estadios V-VI, IX-XI y XII-XIV. Esto sugirió que la concentración de la enzima por célula disminuye en el último período de esta larga fase meiótica.

Al mismo tiempo, la disposición intracelular de la marca correspondiente a Elov14 en las espermátidas elongadas (EE) también dependió del estadio tubular (Fig. 17). En los estadios tubulares IX-XI y XII-XIV, donde las espermátidas se encuentran en las fases más tempranas de la elongación, la proteína se distribuyó en forma difusa en el citoplasma de las mismas. En cambio, en los estadios más avanzados de la diferenciación de las espermátidas, Elov14 apareció fuertemente concentrada en estructuras en forma de punto en el área cercana a la luz tubular, como se puede observar en los estadios tubulares II-IV, V-VI y VII-VIII.

El análisis mediante microscopía confocal nos permitió corroborar que la localización de Elov14 fue citoplasmática en los EP, y más intensa en el área perinuclear, como era de esperar para una enzima cuyas isoformas en su mayoría se ubican en el retículo endoplásmico (**Figura 18**). Notoriamente, también en las ER, se observó una mayor concentración de la proteína en una estructura distintivamente más condensada ubicada muy cerca del núcleo. Por la forma aplanada y cóncava hacia el núcleo de esta estructura, la proteína podría estar localizada en la membrana de la vesícula acrosomal en formación. En las EE, la Elov14 estuvo aún más concentrada, en forma de una estructura densamente empaquetada, de ubicación citoplásmica variable, en una región que probablemente correspondiente al lóbulo citoplásmico de estas células.

4. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE ELONGASAS EN CÉLULAS AISLADAS DEL EPITELIO SEMINÍFERO

Como complemento de su expresión, la actividad enzimática capaz de elongar PUFA se estudió en cultivos de túbulos seminíferos (TS) y de células aisladas a partir de ellos, incluyendo células espermatogénicas y de Sertoli. Antes de los ensayos se necesitaba asegurarse de que cultivos de células espermatogénicas aisladas del epitelio seminífero permanecieran viables durante 20 horas en presencia del sustrato a utilizar, el cual era [³H]20:4n-6 que se había combinado con 20:4n-6 no marcado para alcanzar un nivel de radioactividad adecuado y una concentración de 2.5 μM. En los cultivos suplementados únicamente con suero 5% (v/v) o con lactato 6 mM, habíamos observado mediante la incorporación de yoduro de propidio (**Figura 19**) que el porcentaje de células viables era muy bajo (8.6% y 11.2%, respectivamente). El medio rico en glucosa no había mejorado dichos porcentajes. Únicamente la combinación de suero y lactato (en concentraciones 5% v/v y 6 mM, respectivamente) permitió mantener viables un alto porcentaje de células espermatogénicas (83%) luego de permanecer 20 horas en cultivo, lo cual determinó que

ambos suplementos fueran utilizados en todos los ensayos sobre biosíntesis de lípidos realizados en el transcurso de esta tesis doctoral (Capítulos II y III).

4.1. Distribución del [^3H]20:4n-6 entre clases lipídicas

Luego de 20 horas en cultivo, el ácido graso marcado disponible en el medio fue más activamente incorporado por las células de Sertoli y los EP que por las ER y por éstas a su vez más activamente que por las ET. Así, la radioactividad incorporada en los extractos lipídicos de los EP representó casi el doble de aquella presente en las ER, y \approx seis veces la incorporada por las ET (**Figura 20**). En los cultivos de túbulos (TS) enteros, donde las ER representan la población celular mayoritaria, la radioactividad incorporada fue similar a la observada en los cultivos de estas células.

En la **Figura 21** se muestra la distribución porcentual del [^3H]20:4 n-6 entre los lípidos polares y neutros de los TS y en las células aisladas a partir de los mismos. No se incluye en este gráfico la distribución entre lípidos de las ET ya que, habiendo ya determinado que la radioactividad incorporada por estas células era tan baja (Fig. 20), se decidió reservar las muestras marcadas de ET para cumplir el objetivo de determinar si eran capaces de elongar al sustrato radioactivo, para lo cual se emplearon en todos los casos los ácidos grasos de los lípidos totales.

En los TS, el [^3H]20:4n-6 se incorporó principalmente en los lípidos neutros (75%) y en menor medida en lípidos polares (25%), permaneciendo una pequeña cantidad (sólo 3%) como ácido graso libre (AGL).

De forma inversa, el precursor marcado fue incorporado mayormente en los lípidos polares, tanto en las SC (85%) como en los EP (75%), mientras los correspondientes lípidos neutros incorporaron un 12% y 21%, respectivamente. En estas células una proporción muy pequeña del [^3H]20:4n-6 captado del medio permaneció como AGL.

Por el contrario, aproximadamente la mitad del [^3H]20:4n-6 presente en las ER permaneció como AGL, mientras que el restante porcentaje se distribuyó en proporciones similares entre lípidos polares (30%) y lípidos neutros (23%) (Fig. 21). Por lo tanto, estas células no sólo fueron menos activas que los EP en la captación del sustrato del medio, sino además en la esterificación del mismo en los lípidos.

La mayor parte de la radioactividad esterificada en los lípidos polares de los TS (55%), de los EP (67%) y de las ER (66%) se concentró en los glicerofosfolípidos de colina (CGP), seguido muy por debajo por proporciones similares (cerca al 15%) los glicerofosfolípidos de etanolamina (EGP) y del fosfatidilinositol (PI), y en tercer lugar por la fosfatidilserina (PS). En el caso particular de las SC, aproximadamente un 30% de la radioactividad esterificada en los lípidos polares fue incorporada en el PI, acercándose a la

proporción detectada en los CGP (42%). Fosfolípidos minoritarios, como el ácido fosfatídico (PA), el difosfatidilglicerol (DPG) y la lisofosfatidilcolina (LPC) mostraron porcentajes de incorporación de [^3H]20:4 n-6 menores al 3% en todos los casos.

La mayor parte de la radioactividad esterificada en los lípidos neutros de los TS TS (67%), de los EP (56%) y de las ER (62%) se concentró en los triacilgliceroles (TAG), seguidos por los diacilglicéridos (DAG) en el caso de los TS y las ER (24% y 17%, respectivamente), y por los alquil-diacilglicéridos (ADG) en el caso de los EP (21%) (Fig. 21).

En contraste con las células germinales, en las de Sertoli, el 82% del [^3H]20:4n-6 esterificado en los lípidos neutros luego de 20 horas de cultivo se concentró en los DAG, mientras los TAG incorporaron tan sólo el 15% del mismo. A excepción de los ADG de los EP (21%), otros lípidos neutros incorporaron bajos porcentajes (menores al 13%) de la radioactividad recuperada de los lípidos neutros en todos los casos.

4.2. Elongación de [^3H]20:4n-6 y desaturación de los productos

Por trabajos previos se sabe que los PUFA de 20 átomos de carbono, incluido el 20:4n-6 utilizado aquí como sustrato radioactivo en nuestros ensayos, son elongados en la misma medida por las enzimas Elov15 y Elov12 a PUFAs de 22 átomos de carbono (C22) (Gregory *et al.*, 2013). En cambio, el paso de elongación de los PUFA de 22 a PUFA de 24 átomos de carbono es llevado a cabo exclusivamente por la Elov12 (Gregory *et al.*, 2011).

Como se observa en la **Figura 22**, al cabo de 20 horas en cultivo, los segmentos de TS y las diferentes células aisladas a partir de los mismos (de Sertoli y espermatogénicas) fueron capaces de llevar a cabo la reacción de elongación del sustrato [^3H]20:4n-6 a [^3H]22:4n-6 y posteriormente a [^3H]24:4n-6, confirmando la presencia de las enzimas Elov15 y Elov12 activas en los diferentes cultivos.

Notoriamente, las células de Sertoli no fueron capaces de producir cantidades detectables de VLCPUFA de más de 24 átomos de carbono (Fig. 22), lo cual fue consistente con la ausencia de la proteína Elov14 en estas células (Fig. 16). Únicamente en las células espermatogénicas se detectaron proporciones significativas de radioactividad en PUFA de longitud de cadena mayor a C24 (hasta C28), confirmando la expresión en estas células de una enzima Elov14 activa, que utilizó como sustrato el [^3H]24:4 n-6 generado *in situ* en los cultivos (Fig. 22).

Entre las células analizadas, y sobre la base de una misma cantidad de proteína para todas las células en estudio, los EP mostraron la mayor capacidad para producir PUFA tetraenoicos como el 22:4n-6 y 24:4n-6 a partir del 20:4, siendo esta actividad \approx 3 veces superior a la observada en células de Sertoli. Comparada con la de los EP, en las ER la radioactividad detectada en estos ácidos grasos fue \approx 20 veces más baja, y en las ET aún

menor. Estos resultados indican que la actividad enzimática de Elovl5 y de Elovl2 disminuye con el avance de la diferenciación.

Por otra parte, la cantidad relativa de marca en 22:4n-6 y en 24:4n-6 difirió según el tipo celular. Tanto en las SC como en las ER se vio favorecida la elongación inicial del 20:4n-6 a 22:4n-6, mientras que en los EP la cantidad de 24:4n-6 producida superó a la de su precursor 22:4n-6. Esto, sumado a que el 24:4n-6 fue el ácido graso que los EP sintetizaron en mayor abundancia, señala que Elovl2 es la elongasa que presenta mayor actividad en los espermatozoides, y es consistente con los altos niveles de ARNm de Elovl2 presentes en los EP (Fig. 6). Por su parte, si bien muy bajas, las ET formaron cantidades similares de 22:4n-6 y 24:4n-6. Sin embargo produjeron más 26:4n-6 que 24:4n-6, poniendo en evidencia que este último había sido en parte elongado por la Elovl4.

Al comparar la radioactividad incorporada en los VLCPUFA tetraenoicos de más de C24 en cada tipo celular (suma de 26:4n-6 y 28:4n-6 en la Fig. 22), los EP produjeron ≈ 7 veces más de estos ácidos grasos que las ER, y $\approx 8-9$ veces más que las ET. Esto implica que, tal como también se infirió para la actividad de la Elovl5 y la Elovl2, la actividad enzimática de Elovl4 tendió a disminuir en las células espermatozoides con el progreso de la diferenciación. Es de destacar aquí que la cantidad de proteína Elovl4 (Fig. 16) en EP, ER y ET (estimada también tomando como base la misma cantidad de proteína por preparación), si bien tendió a disminuir, no lo hizo con tanta intensidad como lo hizo su actividad. Esta observación es interesante porque sugiere, tomada en conjunto con el incremento en las estructuras compactas ricas en Elovl4 que acompañan a la diferenciación ER→ET (Fig. 18) que la proteína Elovl4 no pierde actividad con la diferenciación porque se degrade en las células espermatozoides, sino porque es secuestrada y concentrada en forma inactiva junto con otros materiales de desecho en dichas estructuras.

Paralelamente a la actividad de las elongasas, una parte importante de los PUFA producidos por ellas fueron “retirados” del *pool* de productos de la Elovl4 al ser activamente *desaturados* a PUFA pentaenoicos. Así, una proporción substancial de la radioactividad originalmente en [³H]20:4 terminó acumulándose en PUFA pentaenoicos como el [³H]22:5n-6, seguido del [³H]24:5n-6. La formación de estos dos PUFA confirma no sólo la actividad de Elovl2 y Elovl5 sino también de activas desaturasas utilizando a los productos de estas elongasas como sustratos. Esto tuvo lugar en todas las células del epitelio seminífero aquí estudiadas, incluyendo a las de Sertoli.

Muy llamativamente, en las células espermatozoides, el [³H]24:5n-6 producido fue evidentemente utilizado como sustrato por la Elovl4, ya que en ellas se observaron [³H]pentaenos de 26 a 32 átomos de carbono (suma de 26:5, 28:5, 30:5 y 32:5 en la Fig. 22).

Los EP fueron las células más activas en la biosíntesis de los ácidos grasos pentaenoicos, tanto los de 22 y 24 carbonos como los de 26 a 32 carbonos.

Tomando como base la radioactividad en [^3H]24:4 por una parte y la *suma* de la radioactividad detectada en los productos [^3H]26:4 y 28:4 por otra, la relación precursor/productos aumentó, desde 0.1 en los EP hasta 2.5 en las ET. Calculando una relación similar entre la marca presente en [^3H]24:5 y la *suma* en los productos [^3H]26:5 a 32:5, su relación aumentó desde un valor de 0.3 en los EP a 2.6 en las ET.

A diferencia de la elongación, la actividad de desaturación mostró una tendencia a aumentar con el progreso de la diferenciación. Así, la relación entre el total de ácidos grasos pentaenoicos y el total de tetraenoicos marcados fue de 0.42, 0.98 y 1.7 para EP, ER y ET, respectivamente. Este aumento se debió principalmente al aporte de la radioactividad detectada en el [^3H]22:5n-6 más que en los VLCPUFA. Cabe destacar que en las ET el [^3H]22:5n-6 fue el ácido graso sintetizado en mayor proporción.

5. EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA Fa2h EN EL TEJIDO TESTICULAR

En consistencia con la expresión del ARNm de *Fa2h* (Figs. 7, 8 y 11) la proteína codificada por este gen estuvo presente en el testículo de ratas adultas (**Figura 23**). La enzima fue detectada mediante WB e inmunofluorescencia en este tejido utilizando un anticuerpo específico contra Fa2h y tejido cerebral como control positivo. En la **Figura 23 A** se muestra un WB representativo en el que se observa, en ambos tejidos, una banda proteica de 55 kD, peso molecular correspondiente al esperado para Fa2h.

En cortes de cerebro incubados con el anticuerpo anti-Fa2h, se puso a punto la detección de la proteína mediante inmunofluorescencia (**Figura 23 B**). La marca correspondiente a Fa2h en tejido cerebral se observó más fuertemente en el citoplasma de células que poseían un núcleo grande y teñido débilmente con el colorante Hoechst. Es probable que tales células correspondan a oligodendrocitos de la neuroglia cerebral, dado que en la mielina de estas células de sostén se ha reportado la participación de la enzima Fa2h en la síntesis de las abundantes galactosilceramidas 2-hidroxiladas que contiene (Alderson *et al.*, 2006).

Realizando los controles positivos y negativos correspondientes (**Figura 23 C**), en los cortes de testículo adulto fue evidente la intensa marcación de la proteína Fa2h, principalmente en las células más cercanas a la luz tubular.

5.1. Expresión de Fa2h durante el desarrollo postnatal y la diferenciación celular

Consistentemente con el ARNm (Fig. 7), los niveles de la proteína Fa2h en el testículo aumentaron a medida que este órgano fue madurando (**Figura 24**), en paralelo con el

aumento en la proporción de los h-V en la SM y Cer testicular asociado a la edad previamente reportado (Zanetti *et al.*, 2010).

Con el anticuerpo empleado, Fa2h fue detectada débilmente en los WB antes del P25, cuando mostró un notable aumento (Fig. 24). Este tiempo coincidió con el comienzo de la segunda división meiótica y el surgimiento de las primeras espermátidas haploides. Los gráficos de cuantificación mostraron que la máxima expresión de la proteína se dio en la edad peri-pubertal (P37), y continuó en niveles similares hasta la adultez (P90).

Analizando mediante inmunofluorescencia diferentes secciones del testículo adulto observamos que la proteína Fa2h se expresó únicamente en las células intratubulares, y entre éstas, sólo en las espermatogénicas en diferenciación (**Figura 25**), estando ausente en las espermatogonias (EG) y las células de Sertoli. La fluorescencia verde correspondiente a Fa2h fue muy tenue en los EP y aumentó en las espermátidas, concentrándose muy notoriamente en las espermátidas elongadas. Así, la expresión de la proteína entre las células del epitelio seminífero adulto acompañó el enriquecimiento en los esfingolípidos conteniendo h-V asociado con la progresión EP→ER→ET (Oresti *et al.*, 2010b).

Llamativamente, los niveles de expresión y la localización intracelular de Fa2h en las espermátidas elongadas (EE) de los TS adultos variaron en forma dependiente del estadio tubular (Fig. 25).

La proteína alcanzó su máxima expresión en las espermátidas elongadas que están en los estadios III-IV, V-VI, IX-XI y XII-XIV del ciclo espermatogénico. En los túbulos en los estadios IX-XI, cuando las espermátidas están en los primeros pasos de su elongación (pasos 9 a 11 de la espermiogénesis), la localización de esta proteína fue citoplasmática. En cambio y para nuestra sorpresa, en los otros tres estadios, Fa2h se concentró en la región posterior de la estructura que luego será la cabeza espermática, cubriendo parcialmente el núcleo. Estos tres estadios espermatogénicos contuvieron espermátidas elongadas atravesando los pasos más avanzados de la espermiogénesis (hasta el paso 17 y 18).

Fa2h fue observada claramente sobre los núcleos con forma de hoz de estas espermátidas, cubriéndolos en forma parcial: la fluorescencia se concentró intensamente en la parte posterior de la cabeza de las espermátidas, es decir, aquella apuntando a la luz tubular. En cambio, los ápices de las cabezas de estas espermátidas, muy delgados y ligeramente curvados (apuntando hacia el interior del epitelio), no estuvieron cubiertos por esta proteína. Esto se percibe claramente en las microfotografías de la Fig. 25, donde la porción anterior de la cromatina nuclear coloreada de azul apareció sobresaliendo de la fluorescencia verde hacia el interior del epitelio.

Sin embargo, la gran concentración de Fa2h en esta área de las espermátidas tardías fue transitoria. Así, en los estadios VII-VIII, que contienen espermátidas en el paso que precede a la espermiación (paso 19), Fa2h desapareció por completo, estando ausente también en los espermatozoides libres localizados en el interior de la luz tubular.

La **Figura 26 A** corresponde a un corte de un túbulo seminífero adulto en el estadio XII-XIV, en el cual el epitelio seminífero se encuentra compuesto mayormente por espermátidas tardías (ET) y espermatocitos meióticos, cuyos núcleos se tiñeron de rojo. Mediante microscopía confocal se confirmó que en las ET la intensa marca verde correspondiente a Fa2h se concentró muy cerca del núcleo, más precisamente en una ubicación que pareció coincidir con la de la estructura conocida como “manchete”. Esta estructura en forma de copa aparece en forma transitoria durante el ciclo espermatogénico y rodea la cabeza de las espermátidas durante su elongación, al igual que hizo Fa2h en los resultados mostrados aquí. En cambio, en los espermatocitos que están desarrollando la meiosis, la marca correspondiente a Fa2h fue muy tenue y se encontró distribuida uniformemente en el citoplasma celular.

En la **Figura 26 B** se puede apreciar, mediante microscopía confocal y la observación en el eje Z, que la localización de la proteína Fa2h en las EE fue extranuclear, ya que se la encontró apoyada sobre la envoltura nuclear en estrecho contacto con la misma.

Estos hallazgos fueron muy estimulantes, ya que los cambios en los niveles de expresión de Fa2h con la diferenciación celular descritos en este capítulo guardan una estrecha relación con el aumento de VLCPUFA 2-hidroxiados (h-V) que ocurrió en la SM y la Cer de las *membranas* de las células espermatogénicas con el desarrollo demostradas en el Capítulo I, involucrando a la Fa2h como protagonista en la biosíntesis de estos notables ácidos grasos.

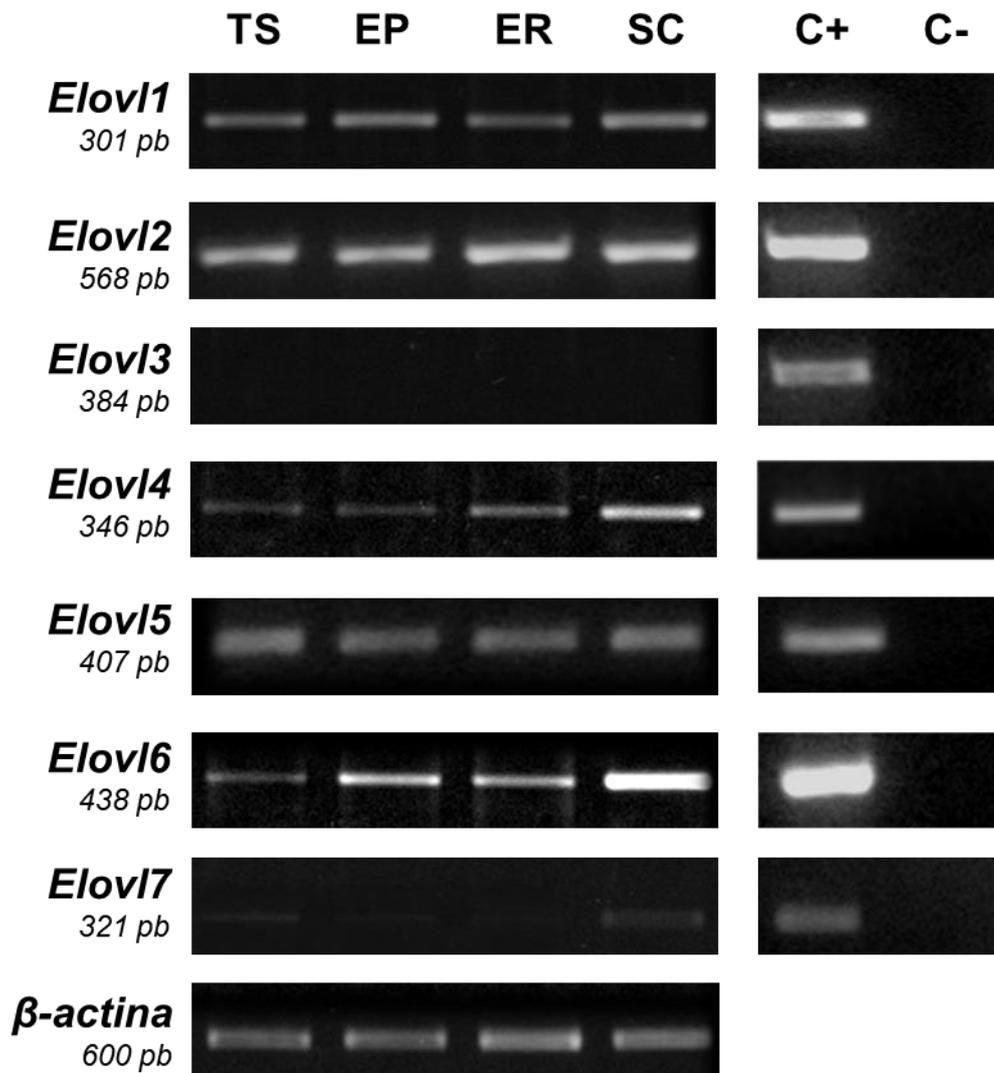


Figura 1. Detección de transcritos de los miembros de la familia de genes *Elov* en túbulos seminíferos (TS) de rata y en células aisladas a partir de ellos, mediante PCR convencional. EP, espermatoцитos en paquiteno; ER, espermátidas redondas; SC, células de Sertoli. Se indica el tamaño de los amplicones obtenidos para cada gen, los cuales coinciden con el tamaño esperado al usar las secuencias específicas de *primers* descritas en la Tabla 1 de Materiales y Métodos. Los controles positivos (C+), mostrados para comparación, contenían ADNc retrotranscripto a partir de ARN total de hígado (para *Elov1*, *Elov2*, *Elov5* y *Elov6*), tejido adiposo pardo (*Elov3*), retina (*Elov4*), y glándula adrenal (*Elov7*). Se utilizó β -actina como control interno. En los controles negativos (C-) el ADNc fue reemplazado por agua libre de RNasas en las reacciones de amplificación.

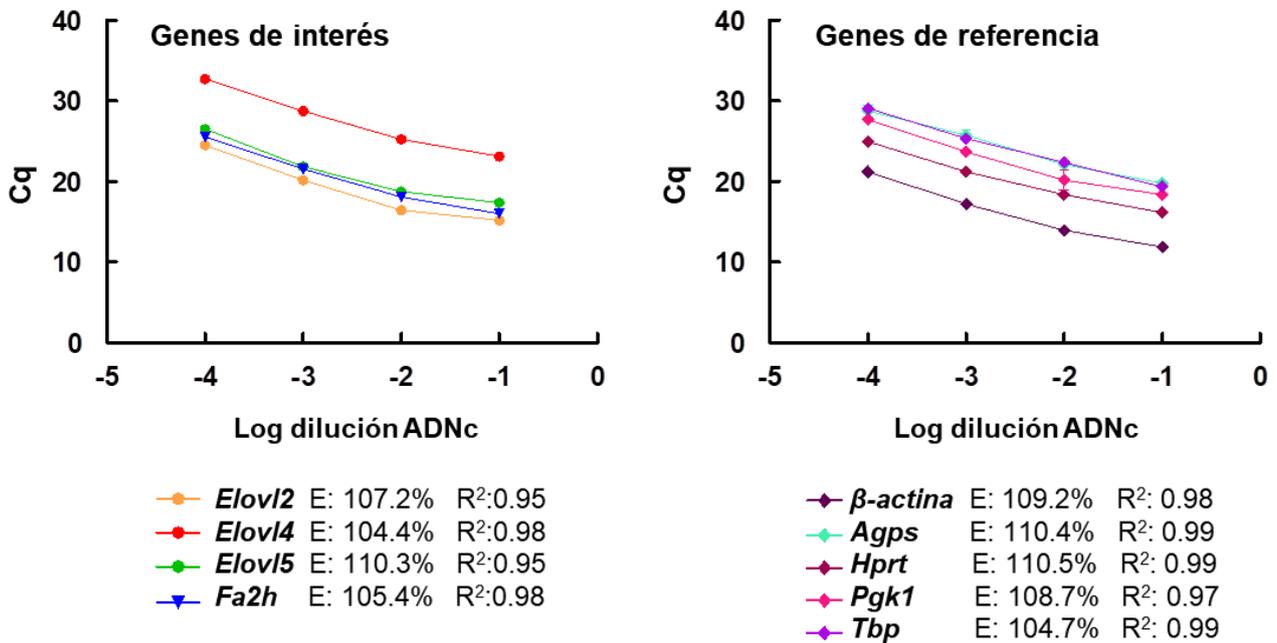


Figura 2. Eficiencia de los primers utilizados para la amplificación de genes específicos mediante qRT-PCR. Se muestran las curvas de eficiencia estándar generadas para los genes de interés (izquierda) y para los distintos genes de referencia (derecha) mediante regresión lineal de los ciclos de cuantificación (Cq) versus el logaritmo de la concentración de ADNc de testículo para cada reacción de qPCR. Se observa que la eficiencia (E) de amplificación fue adecuada (104- 110%) en todos los casos, con una tendencia lineal de R² óptimo (0.95-0.99), indicando que el producto de amplificación se duplica en cada ciclo.

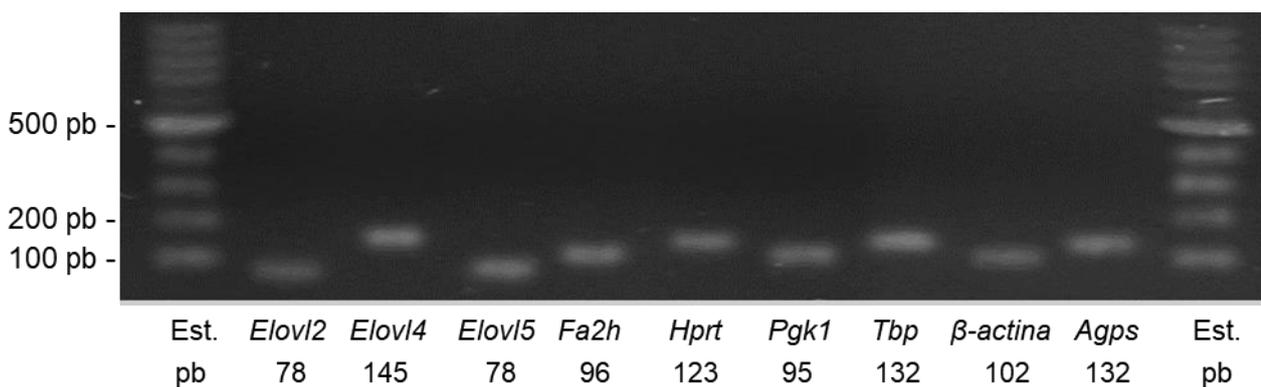


Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa (1%) de amplicones obtenidos mediante RT-qPCR teñidos con bromuro de etidio. Los productos coincidieron con el tamaño esperado para los pares de primers utilizados (ver Tabla 2 de Materiales y Métodos). Las calles a la izquierda y la derecha corresponden al estándar (Est.) de peso de ADN de 100 pares de bases (pb).

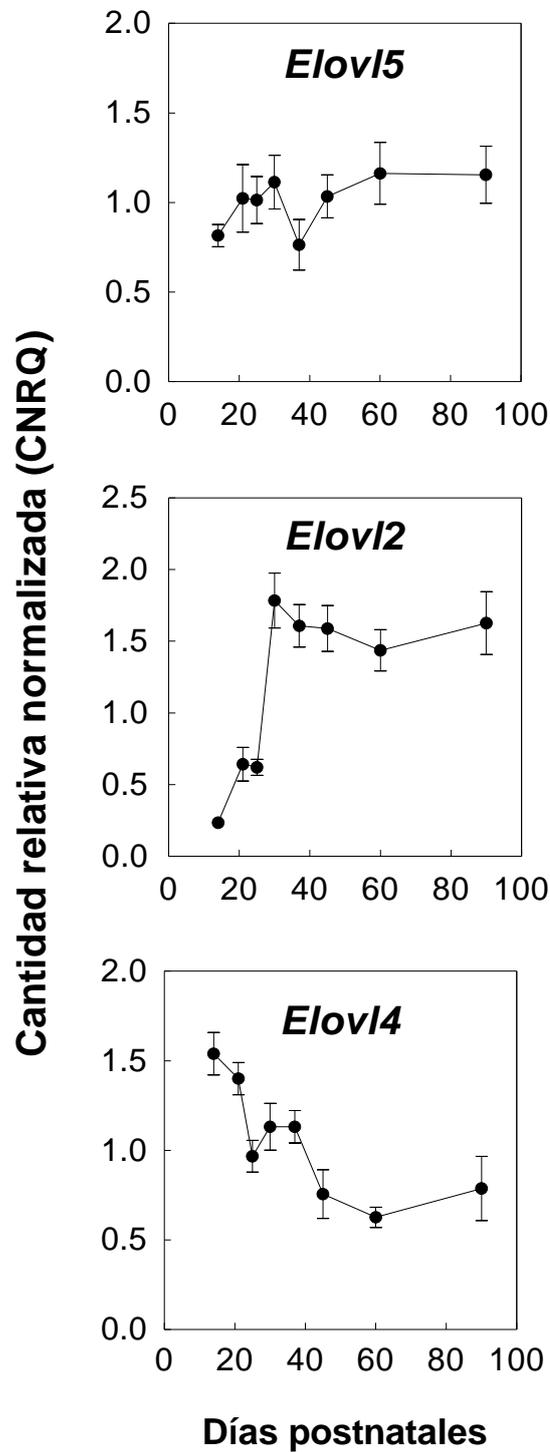


Figura 4. Niveles de expresión del ARNm de *Elov15*, *Elov12* y *Elov14* en testículo durante el desarrollo postnatal medidos por RT-qPCR. Los datos se muestran como cantidades relativas normalizadas de cada transcrito, en unidades arbitrarias (CNRQ \pm SEM).

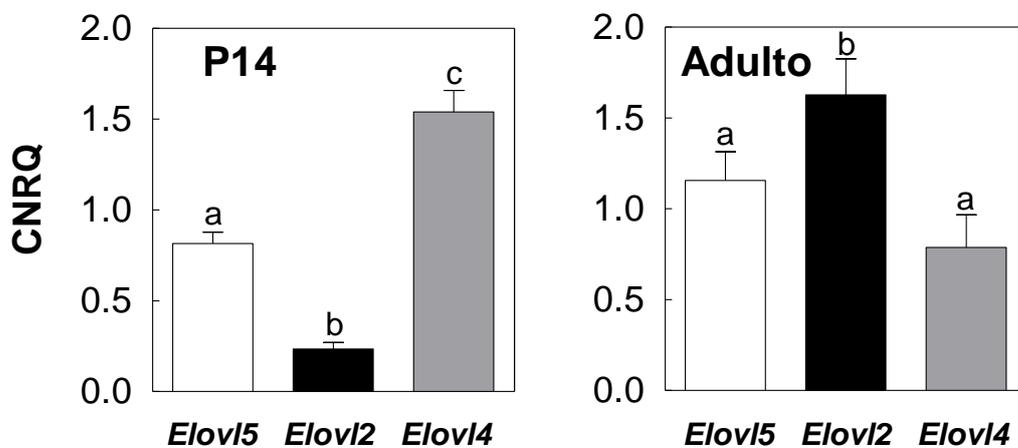


Figura 5. Comparación de los niveles de expresión del ARNm de *Elovl5*, *Elovl2* y *Elovl4* en testículo de ratas infantiles (P14) y adultas (P90). Los datos se muestran como cantidades relativas normalizadas del transcrito en unidades arbitrarias (CNRQ \pm SEM), determinadas mediante RT-qPCR. Las barras con diferentes letras (a-c) indican diferencias significativas entre los niveles de expresión de los genes de *Elovl*s ($p < 0.05$, ANOVA).

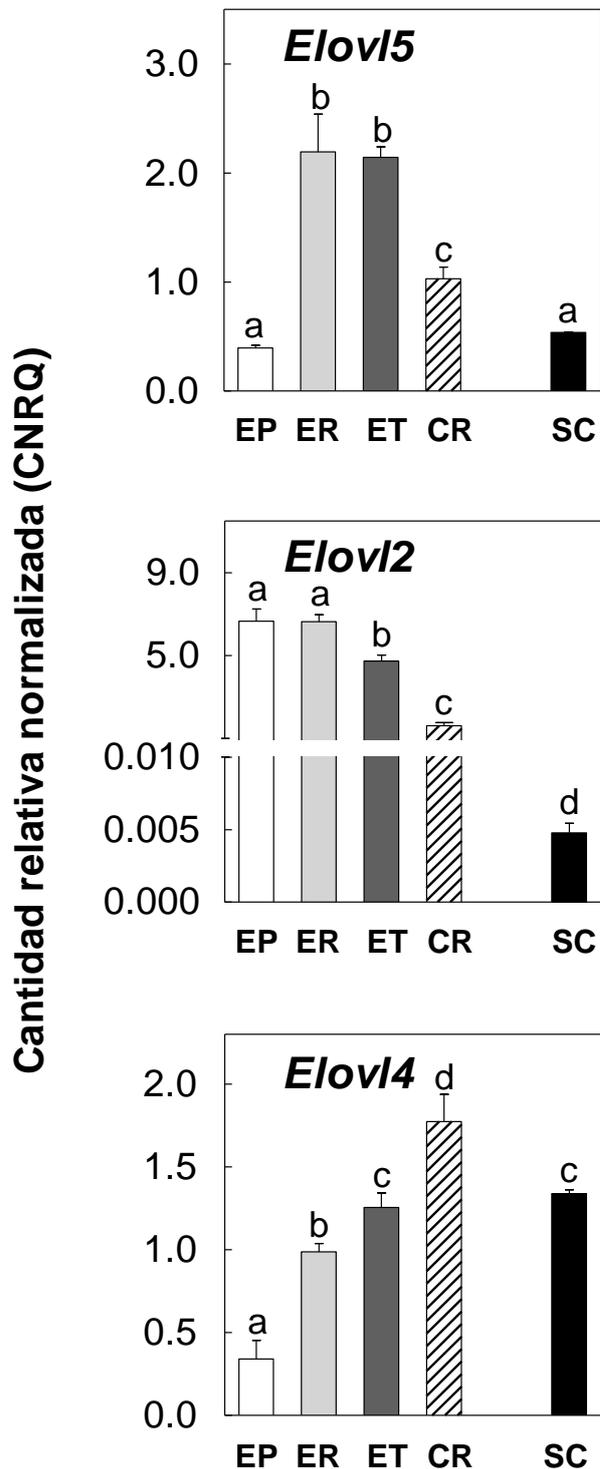


Figura 6. Niveles de expresión del ARNm de *Elov15*, *Elov12* y *Elov14* en células aisladas de túbulos seminíferos de rata, medidos por RT-qPCR. Se analizaron espermatoцитos en paquiteno (EP), espermátidas redondas (ER), espermátidas tardías (ET) y cuerpos residuales (CR) y células de Sertoli (SC). Los datos se muestran como cantidades relativas normalizadas del transcrito en unidades arbitrarias (CNRQ \pm SEM). Los valores con letras diferentes (a-d) indican diferencias significativas entre los tipos celulares ($p < 0.05$, ANOVA).

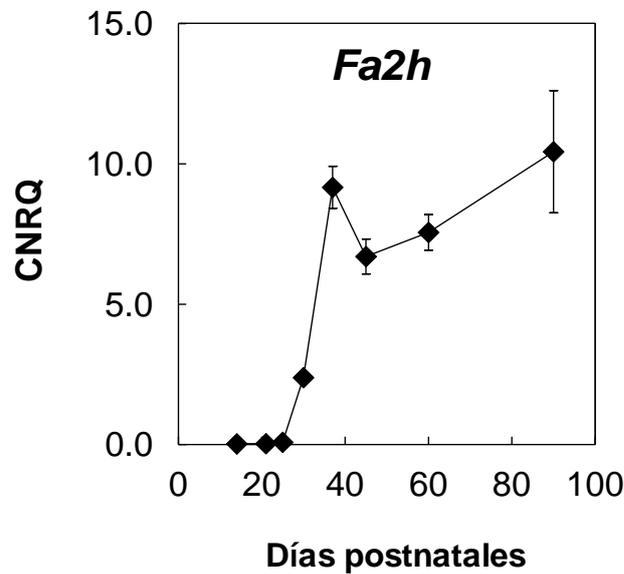


Figura 7. Niveles de expresión del ARNm de *Fa2h* en testículo de rata durante el desarrollo postnatal, medidos por RT-qPCR. Los datos se muestran como cantidades relativas normalizadas del transcrito en unidades arbitrarias (CNRQ).

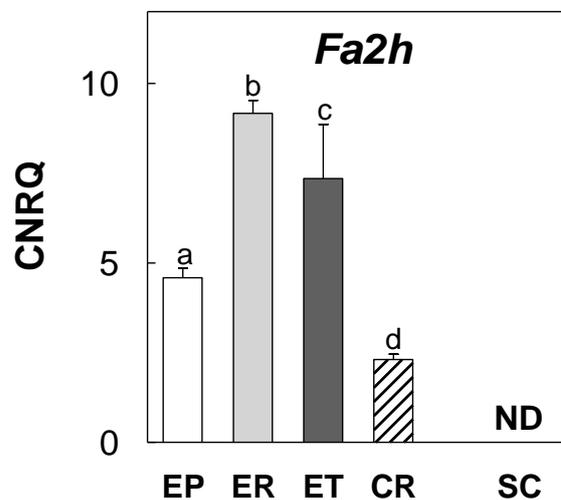


Figura 8. Niveles de expresión del ARNm de *Fa2h* en los diferentes tipos de células aisladas de túbulos seminíferos de rata medidos por RT-qPCR. Se analizaron espermatoцитos en paquitenio (EP), espermátidas redondas (ER), espermátidas tardías (ET) y cuerpos residuales (CR) y células de Sertoli (SC) prepúberes. Los datos se muestran como cantidades relativas normalizadas del transcrito en unidades arbitrarias (CNRQ \pm SEM). Los valores con letras diferentes (a-d) indican diferencias significativas entre los tipos celulares ($p < 0.05$, ANOVA). ND, no detectable.

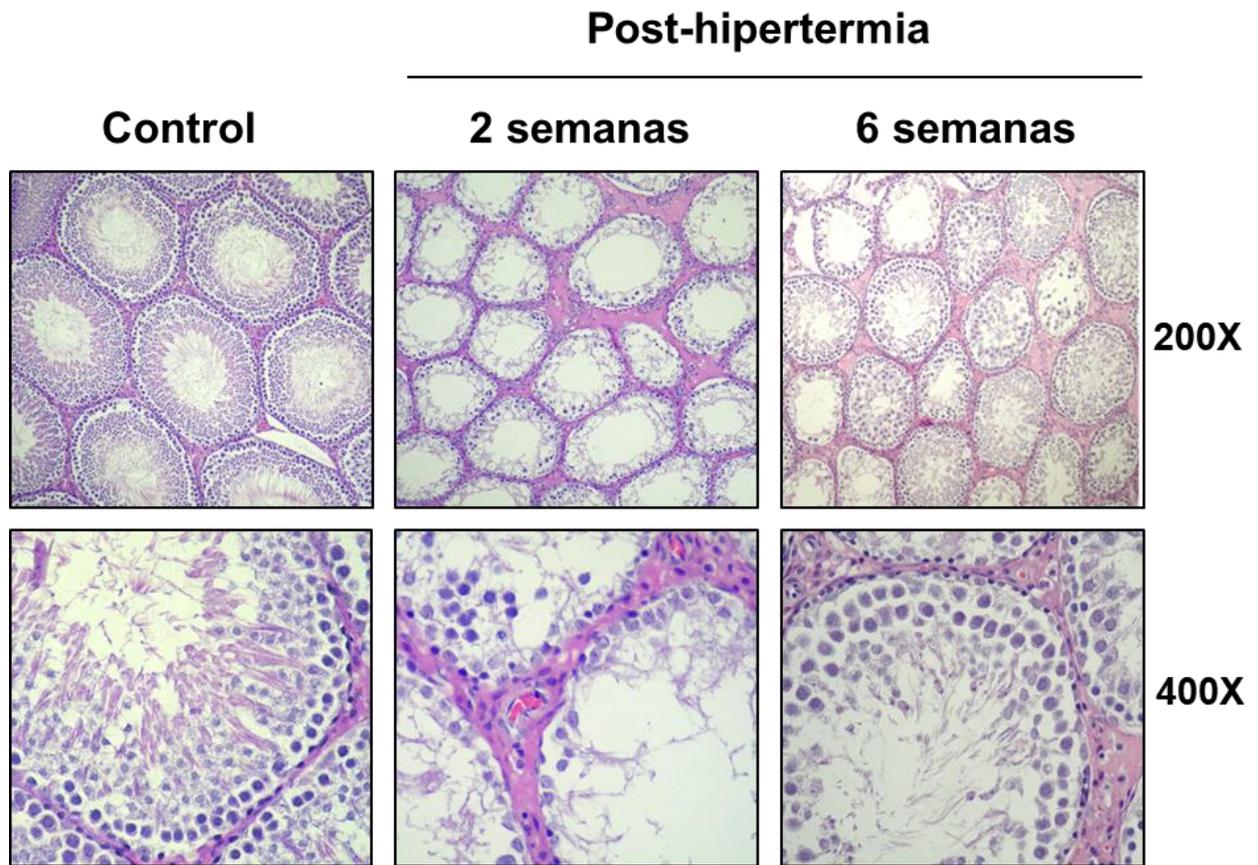


Figura 9. Cambios en la histología testicular en ratas adultas luego de la exposición a hipertermia moderada. Se comparan secciones de testículo 2 y 6 semanas después de haber finalizado el tratamiento de hipertermia en comparación con un control, coloreadas con hematoxilina-eosina, a dos aumentos (200X y 400X). Nótese la disminución del espesor del epitelio germinal y del diámetro de los túbulos seminíferos a la semana 2 post-hipertermia, debido a la pérdida de la mayoría de las células espermatogénicas maduras, permaneciendo las células de Sertoli y espermatogonias. A la semana 6, el epitelio seminífero había comenzado a repoblarse de células espermatogénicas.

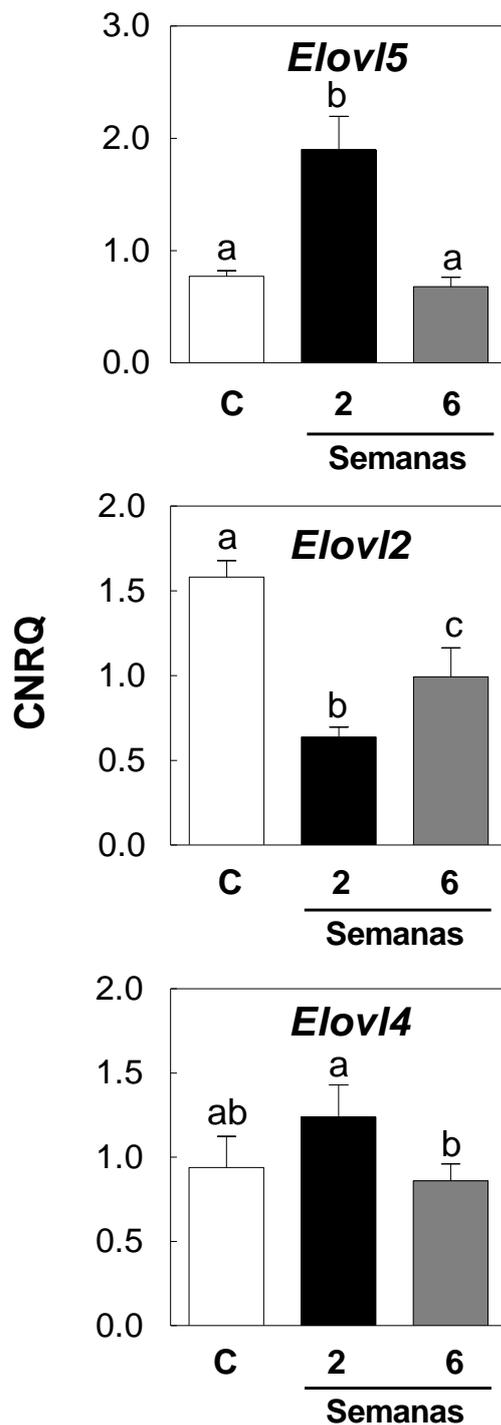


Figura 10. Efectos diferenciales de la pérdida de células espermatogénicas sobre la expresión *in vivo* del ARNm de *Elov15*, *Elov12* y *Elov14* en testículo de rata adulta. Se muestran los niveles de transcritos, cuantificados mediante RT-qPCR, en testículos controles (C) en comparación con aquellos que habían sido sometidos a hipertermia moderada y analizados 2 y 6 semanas después. Los datos se expresan como cantidades relativas de cada transcrito, normalizadas en unidades arbitrarias (CNRQ \pm SEM). Los valores con letras diferentes (a-c) indican diferencias significativas ($p < 0.05$, ANOVA).

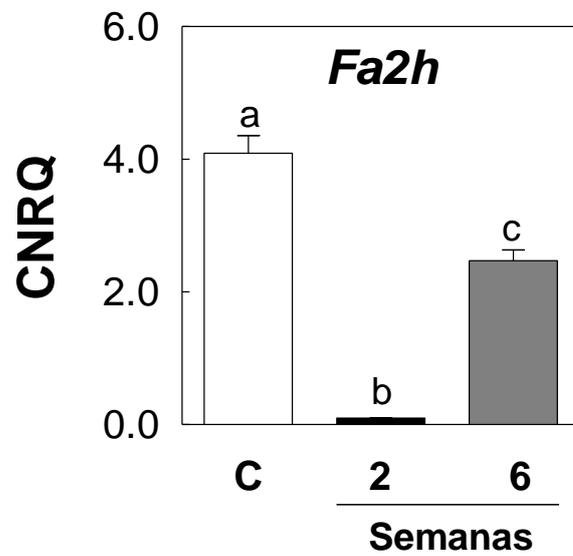


Figura 11. Efectos diferenciales de la pérdida de células espermatogénicas sobre la expresión *in vivo* del ARNm de *Fa2h* en testículo de rata adulta. Se muestran los niveles del transcripto, cuantificados mediante RT-qPCR, en testículos controles (C) en comparación con aquellos que habían sido sometidos a hipertermia moderada y analizados 2 y 6 semanas después. Los datos se expresan como cantidades relativas de cada transcripto, normalizadas en unidades arbitrarias (CNRQ \pm SEM). Los valores con letras diferentes (a-c) indican diferencias significativas ($p < 0.05$, ANOVA).

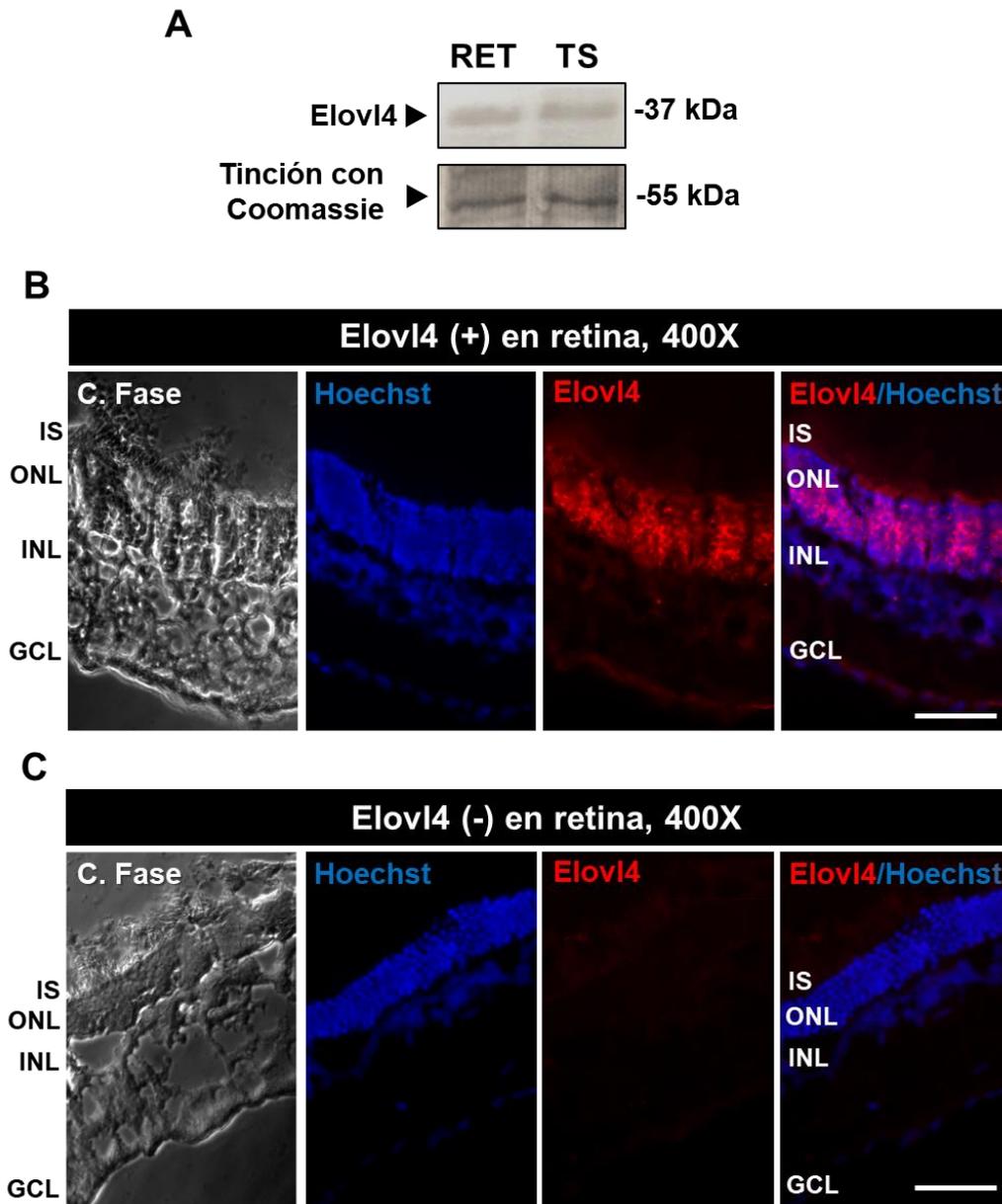


Figura 12. Inmunolocalización de la proteína Elovl4 en retina de rata (control positivo). **A:** Detección mediante *Western blot* de la proteína Elovl4 en retina (RET) y túbulos seminíferos (TS) de rata adulta empleando un anticuerpo específico contra Elovl4. En ambos tejidos se detectó una banda correspondiente a un peso de 37 kDa. **B:** Inmunolocalización de la proteína Elovl4 (rojo) en cortes histológicos de retina mediante epifluorescencia. Se reconocen diferentes capas de células típicas de la retina: IS (del inglés *inner segments*), segmentos internos de los bastones y los conos; ONL, capa nuclear externa (del inglés *outer nuclear layer*); INL, capa nuclear interna (del inglés *inner nuclear layer*); GCL, capa de células ganglionares (del inglés *ganglion cells layer*). **C:** Control negativo (-) del mismo tejido de retina incubado con solución de bloqueo en ausencia del anticuerpo anti-Elovl4. Los núcleos fueron teñidos con Hoechst y se ven de color azul. Barras = 50 μ m.

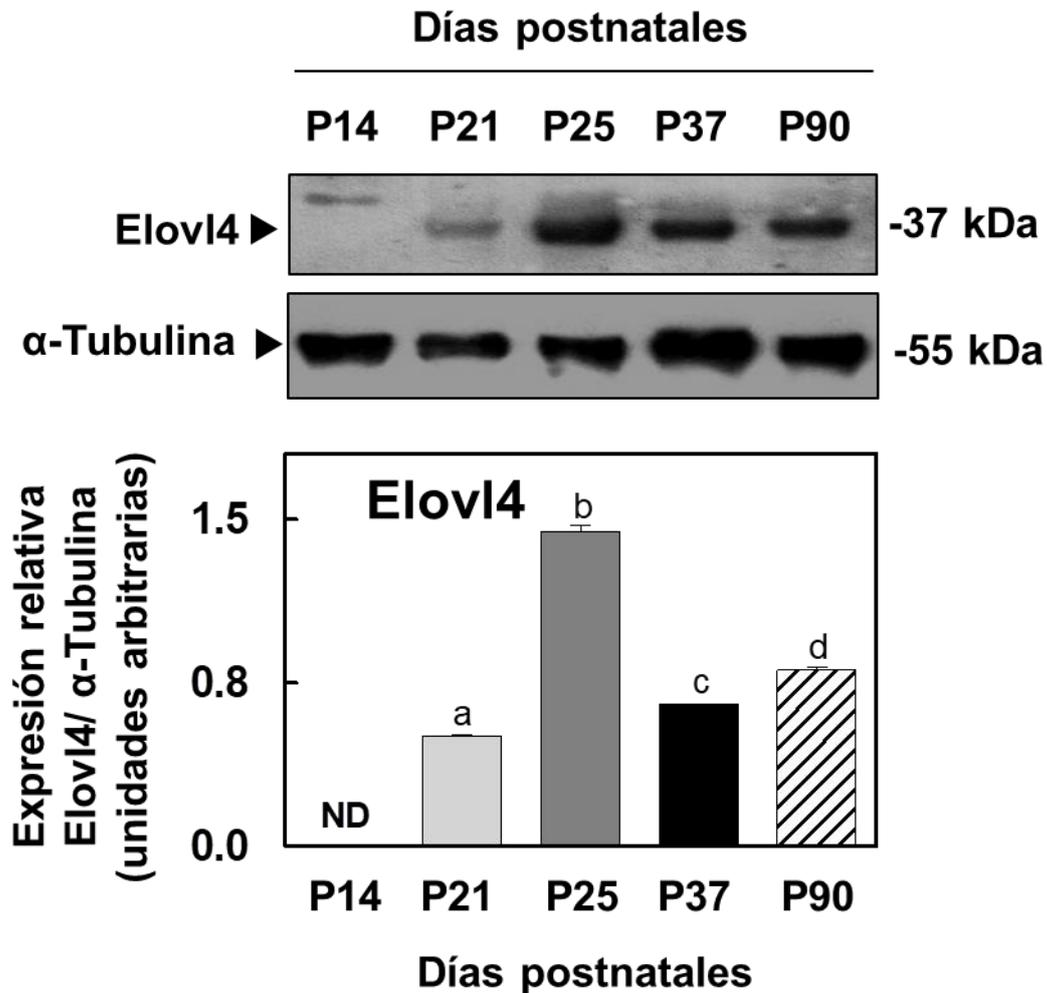


Figura 13. Cambios en la expresión de la proteína Elov14 en el testículo durante el desarrollo postnatal. Se muestra un *Western blot* representativo de los niveles de expresión de la proteína en los días postnatales (P) indicados. Los números de la derecha indican peso molecular. El gráfico de barras muestra la densidad correspondiente a la expresión de Elov14 en relación con la del control de carga (α -Tubulina). Letras diferentes (a-d) indican diferencias significativas ($p < 0.05$, ANOVA). ND, no detectable.

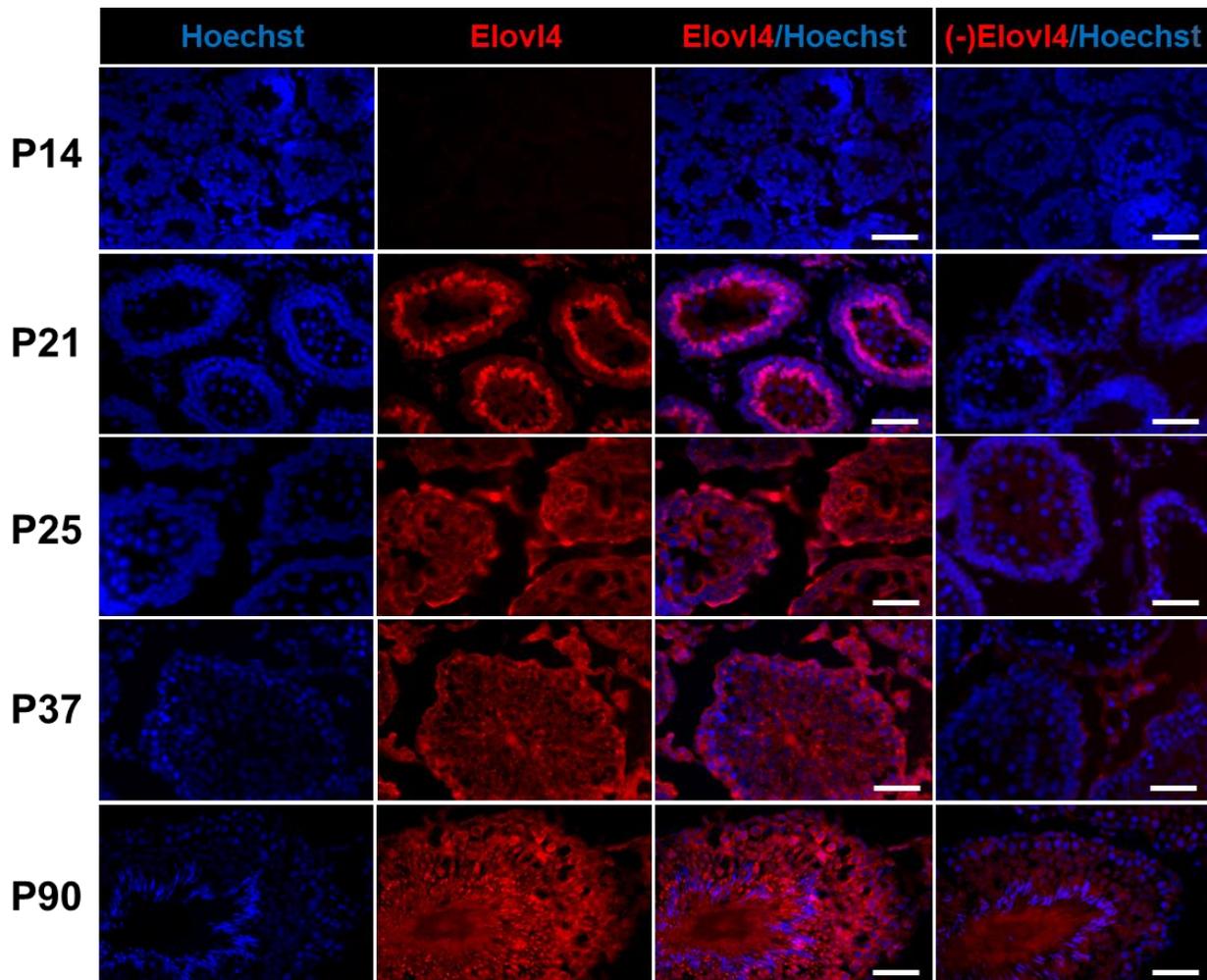


Figura 14. Patrón de expresión de la proteína Elov14 durante el desarrollo postnatal en el testículo de rata. Se muestran fotomicrográficas de inmunofluorescencia en cortes de testículo a los días postnatales (P) indicados. La marca roja corresponde a Elov14 y la azul a los núcleos, teñidos con Hoechst. A la derecha se incluyen los controles negativos (-) correspondientes a cada edad, procesados del mismo modo pero en ausencia del anticuerpo específico contra Elov14. Puede observarse que la Elov14 comienza a detectarse a partir de la edad juvenil (P21) y continúa presente hasta la adultez (P90). Aumento 400X. Barras = 100 μ m.

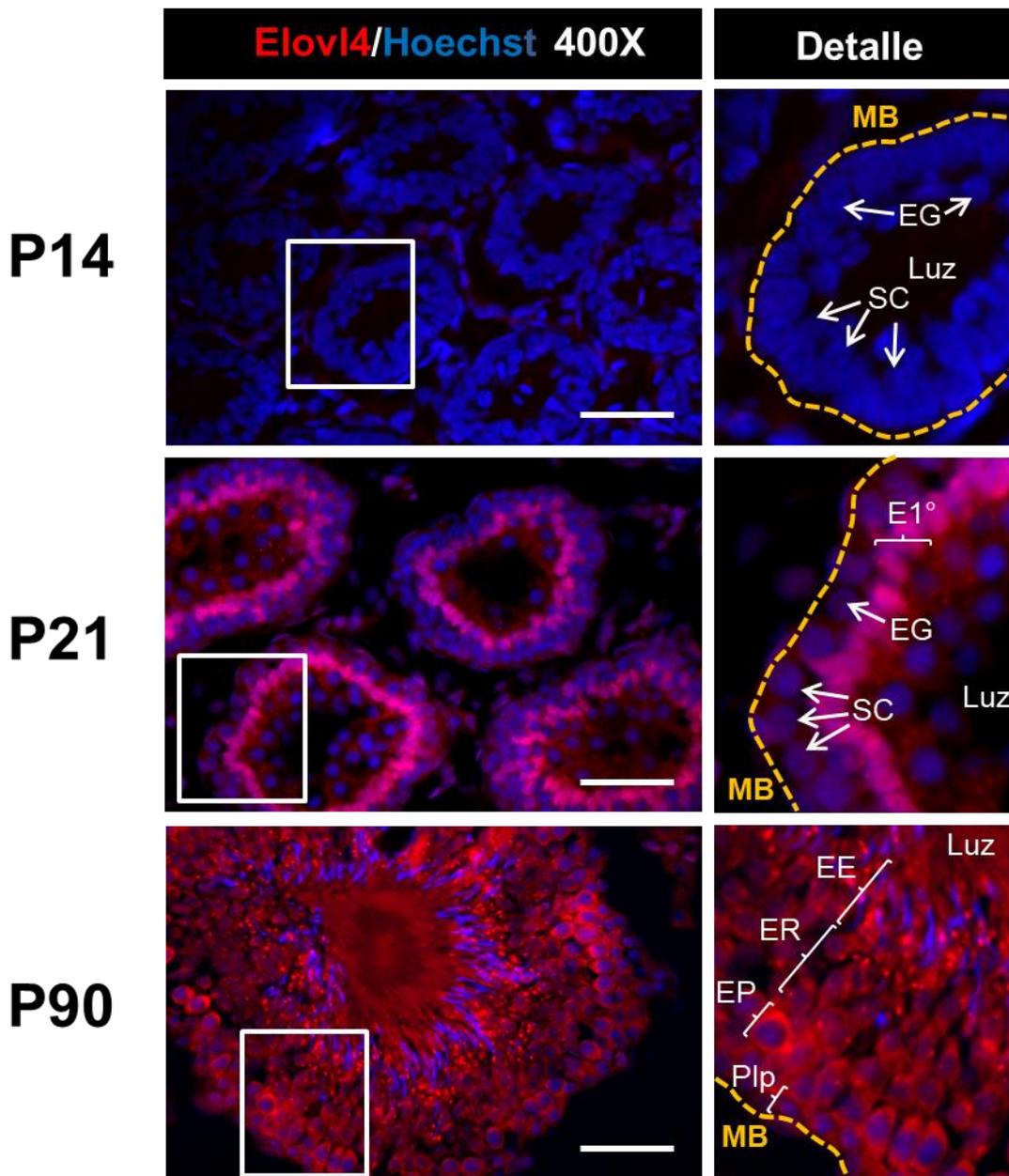


Figura 15. Inmunodetección de la proteína Elov14 (rojo) en el epitelio seminífero en tres etapas diferenciadas del desarrollo postnatal. Se comparan fotomicrografías de inmunofluorescencia en cortes de testículo infantil (P14), juvenil (P21) y adulto (P90) (barras = 100 μ m). Los rectángulos blancos delimitan el área mostrada en detalle a la derecha. La proteína no se expresa en P14, cuando el epitelio seminífero se encuentra compuesto por células de Sertoli (SC) y espermatogonias (EG). En P21, el círculo de células marcadas intensamente corresponde a los primeros espermatocitos primarios ($E1^\circ$) que se dividen por meiosis. En el adulto, Elov14 se continúa expresando en estas células (EP) y se detecta también en células espermatogénicas postmeióticas (espermátidas ER y EE) (P90, estadio tubular VII-VIII). Se indican la luz del túbulo y la membrana basal (MB, líneas punteadas amarillas). Plp, espermatocitos en preleptoteno.

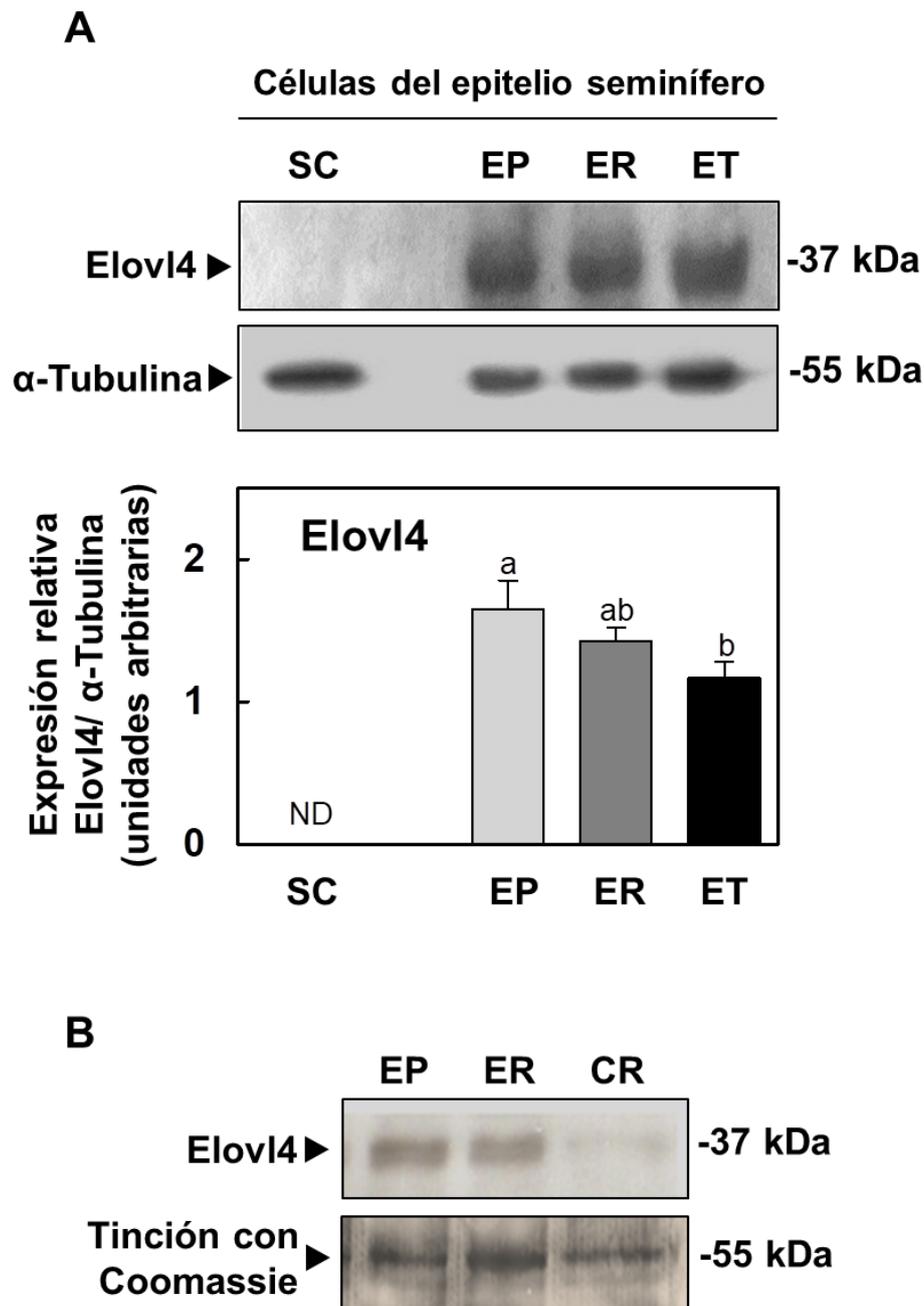


Figura 16. Expresión de la proteína Elovl4 en células aisladas del epitelio seminífero.

A: *Western blot* representativo de los niveles de expresión de la proteína en células de Sertoli (SC), y en poblaciones de espermatoцитos en paquiteno (EP), espermátidas redondas (ER) y espermátidas tardías (ET) purificadas a partir de túbulos seminíferos. Se sembraron cantidades equivalentes de proteína en cada caso. En los 3 tipos de células espermatoгénicas se detectó una banda de 37 kDa correspondiente a Elovl4 como se determinó anteriormente en retina (control positivo), la cual estuvo ausente en las SC (ND, no detectable). El gráfico de barras representa la densidad correspondiente a la expresión de Elovl4 en relación con la del control de carga (α-Tubulina). Letras diferentes (a-b) indican diferencias significativas entre los tipos celulares ($p < 0.05$, ANOVA). **B:** Se muestra un *Western blot* que incluye a los cuerpos residuales (CR) aislados del epitelio seminífero adulto con fines comparativos, en los cuales no se detectó la proteína.

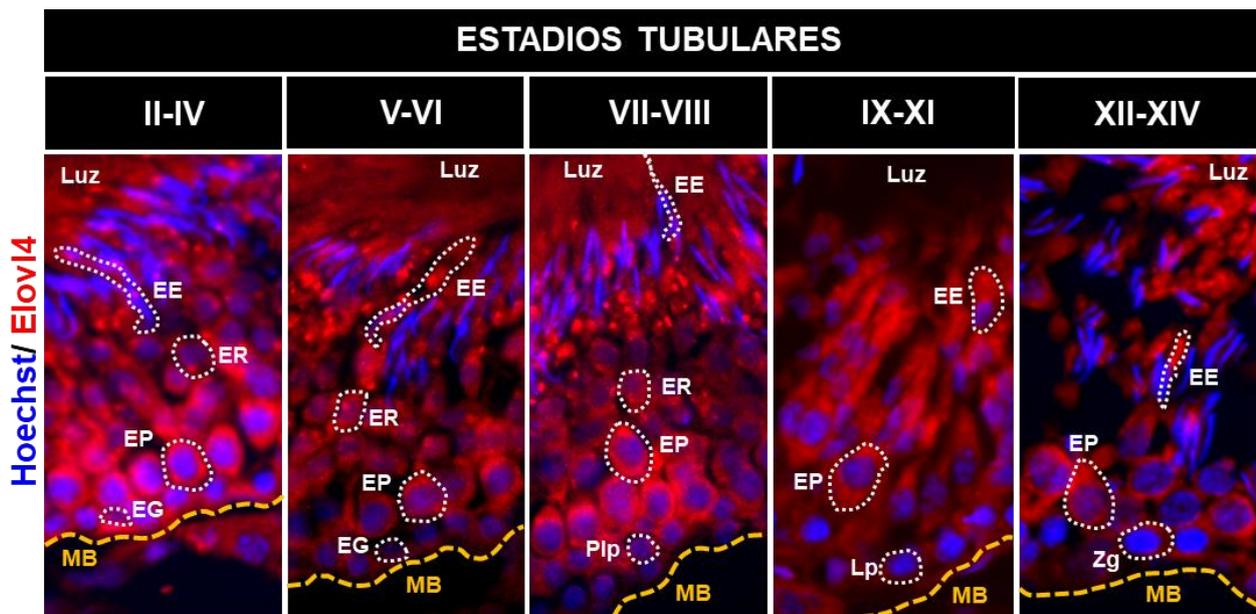


Figura 17. Distribución de la proteína Elov14 en el testículo adulto de rata en los estadios del ciclo del epitelio seminífero indicados. La proteína se expresó fuertemente en los espermatocitos primarios ($E1^{\circ}$) meióticos, principalmente en la fase de paquiteno (EP), en forma dependiente del estadio tubular. La marca detectada en este tipo celular fue más intensa en los estadios II-IV y VII-VIII, siendo débil en los estadios V-VI, IX-XI, y XII-XIV. La tinción de la proteína fue débil en las espermatidas redondas (ER) y reapareció concentrada en pequeñas estructuras en forma de punto en las espermatidas elongadas (EE) tempranas y tardías. EG, espermatogonias; Plp, espermatocitos en preleptoteno; Lp, espermatocitos en leptoteno; Zg, espermatocitos en zigoteno. Se indica la membrana basal (MB) con líneas punteadas amarillas.

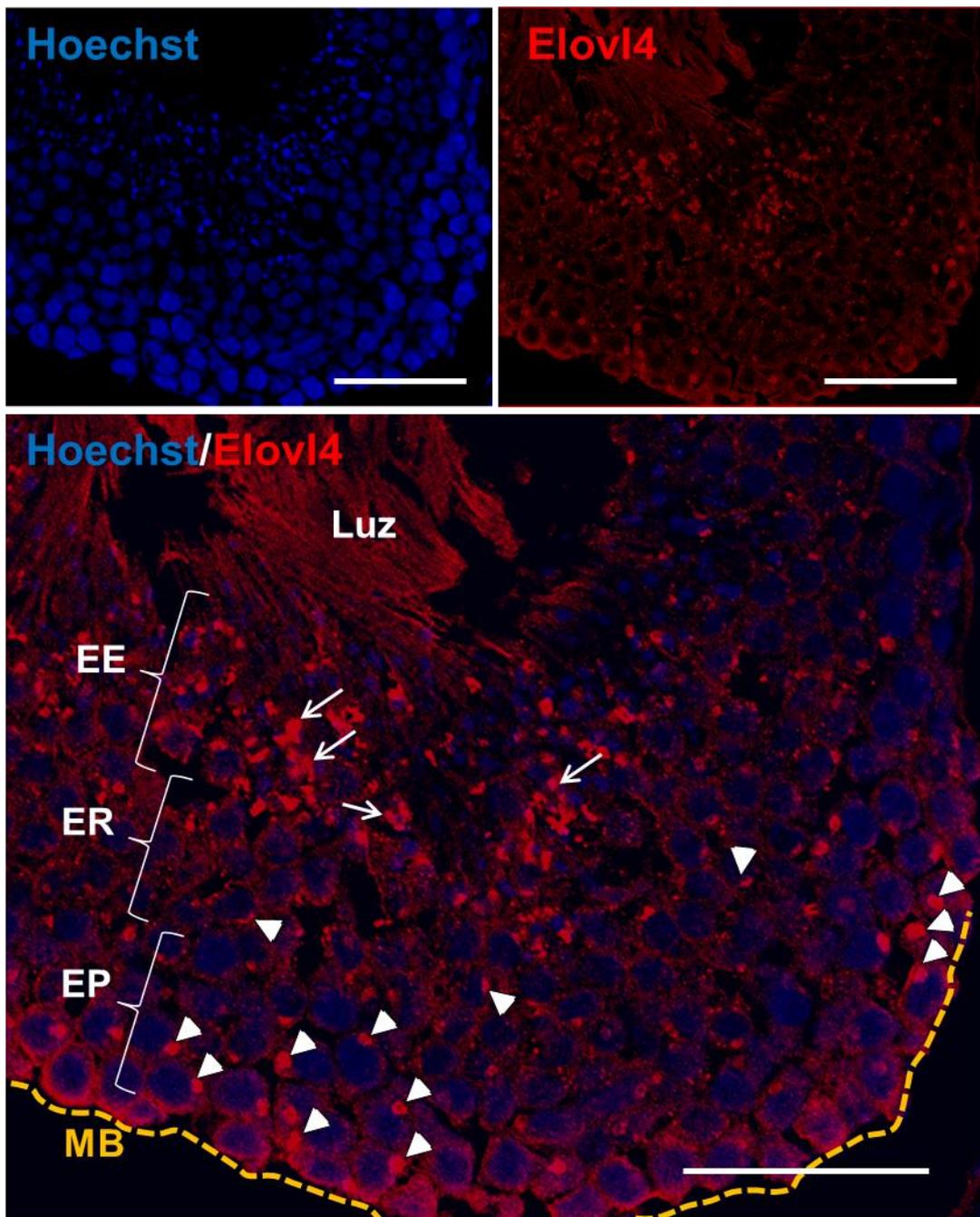


Figura 18. Inmunolocalización de la proteína Elov14 en células del epitelio seminífero adulto. Se muestran imágenes de fluorescencia de microscopía confocal para Elov14 (rojo) en cortes de testículo adulto. Los núcleos se tiñeron de azul con Hoechst. La localización de Elov14 fue mayormente perinuclear en los espermatocitos primarios, incluidos los paquiteno (EP) y en espermatidas redondas (ER) (puntas de flecha). En las espermatidas elongadas (EE) la proteína apareció densamente empaquetada con una localización indeterminada en el citoplasma (flechas). Se indica la membrana basal (MB) con líneas punteadas amarillas. Barras= 50 μ m.

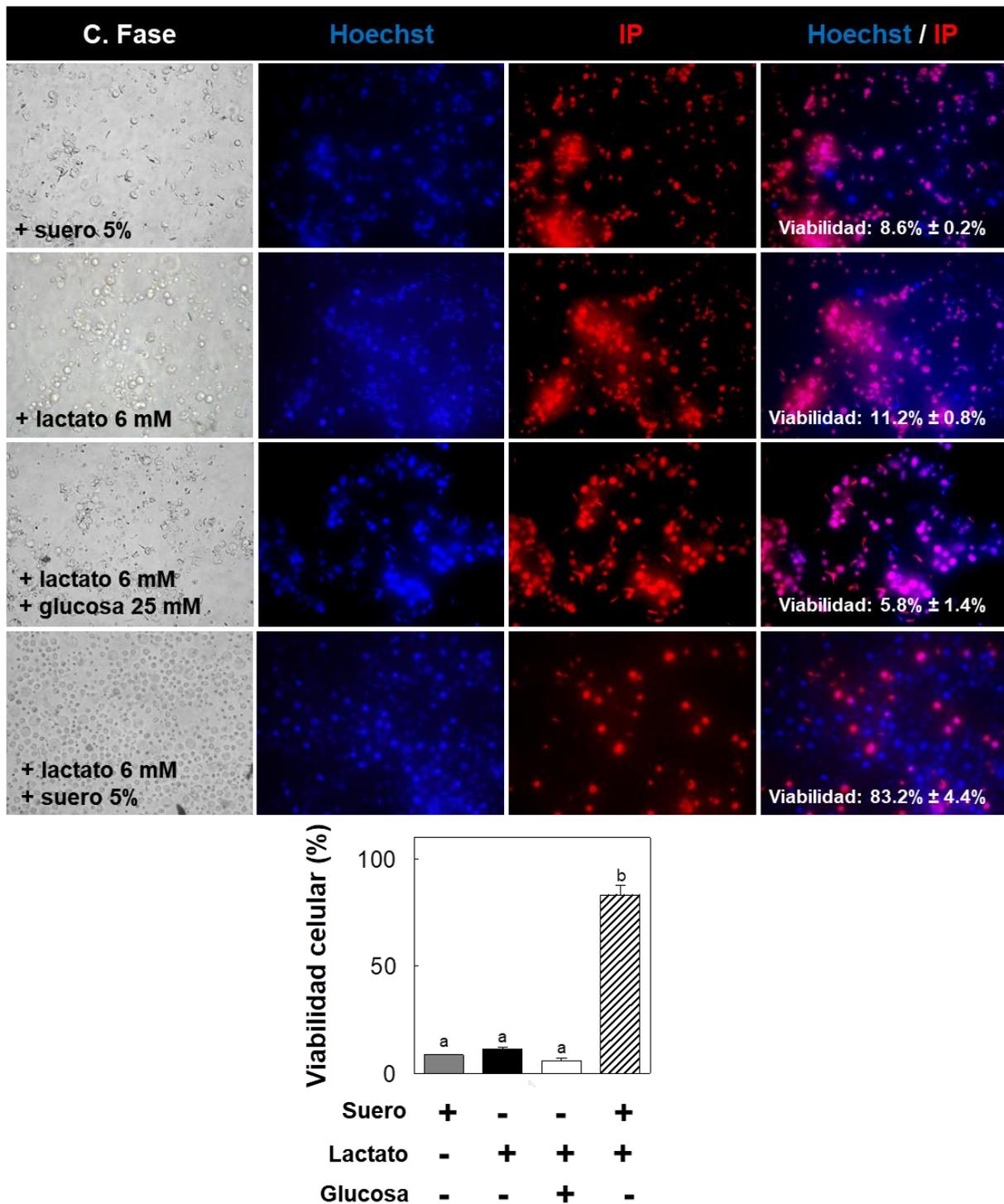


Figura 19. Determinación de viabilidad de células espermatogénicas totales aisladas en cultivo, incubadas con diferentes suplementos en presencia de ácido araquidónico (20:4n-6). Se muestran fotomicrografías de contraste de fase (C. Fase) y de fluorescencia de las células luego de que hubieran sido incubadas durante 20 horas con 20:4n-6 2.5 μ M en medio DMEM sin glucosa en presencia de los suplementos indicados. Los núcleos azules, teñidos con Hoechst, marcan las células presentes, tanto viables como no viables. Los rojos, teñidos con yoduro de propidio (IP), indican las no viables. Debajo se presenta el porcentaje de viabilidad celular, correspondiente a la media \pm SD de 10 campos elegidos al azar para cada condición. Nótese que el medio suplementado con una combinación de lactato y suero (barra rayada) fue el único en el cual las células mostraron un porcentaje alto (\approx 80%) de supervivencia. Letras diferentes (a-b) indican diferencias significativas entre los medios ($p < 0.05$, ANOVA).

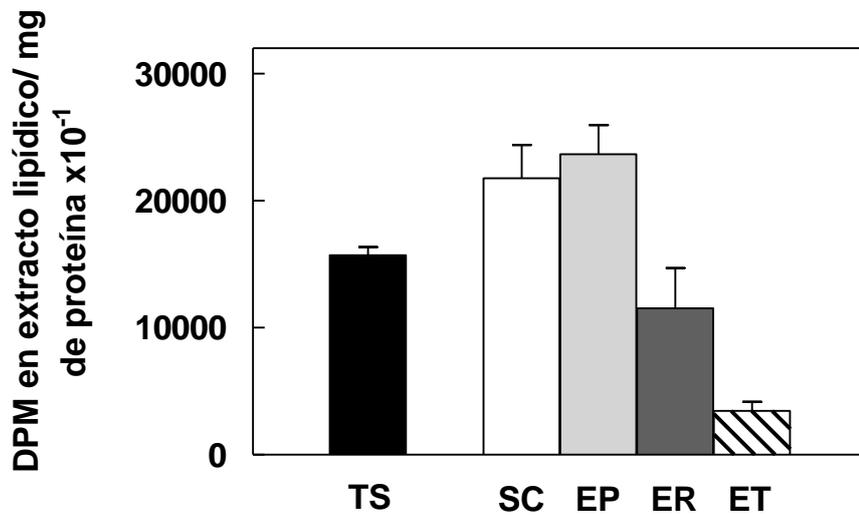


Figura 20. Incorporación de $[^3\text{H}]20:4n-6$ en lípidos totales de túbulos seminíferos y de células aisladas a partir de ellos. Luego de 20 horas de cultivo de túbulos seminíferos (TS), células de Sertoli (SC), espermatoцитos en paquitenio (EP), espermátidas redondas (ER) y espermátidas tardías (ET) en presencia de $1 \mu\text{Ci}$ de $[^3\text{H}]20:4n-6$, se obtuvieron extractos lipídicos totales y la radioactividad en ellos fue cuantificada mediante conteo por centelleo líquido. Los datos representan la radioactividad presente en los extractos lipídicos de cada muestra por cada mg de proteína (media \pm SD; $n=3$).

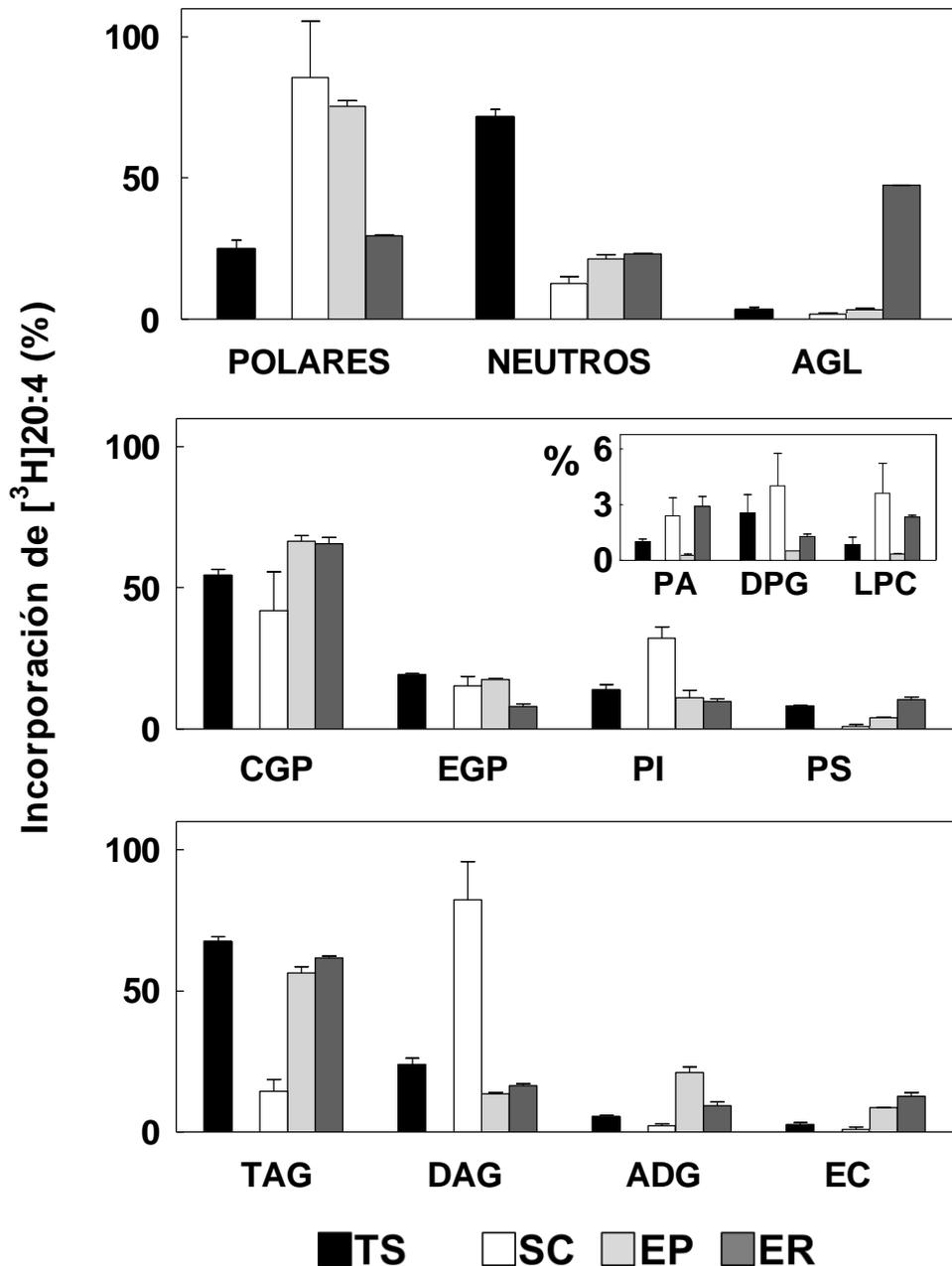


Figura 21. Distribución porcentual (%) del $[^3\text{H}]20:4n-6$ entre clases de lípidos en túbulos seminíferos y células aisladas a partir de ellos. Los extractos lipídicos totales de túbulos seminíferos (TS), células de Sertoli (SC), espermatoцитos en paquiteno (EP) y espermátidas redondas (ER) en cultivo fueron separados en clases de lípidos polares y neutros. La radioactividad incorporada en cada fracción lipídica se midió mediante centelleo líquido. En el panel superior se compara la distribución general de la marca (%) de $[^3\text{H}]20:4n-6$ entre lípidos polares y neutros en comparación con la que permaneció como ácido graso libre (AGL). En el panel del medio se muestra la distribución (%) de la radioactividad esterificada entre las clases de fosfolípidos, CGP y EGP, glicerofosfolípidos de colina y de etanolamina, respectivamente; PI, fosfatidilinositol; PS, fosfatidilserina. En el inserto se muestran fosfolípidos minoritarios, PA, ácido fosfatídico; DPG, difosfatidilglicerol; LPC, lisofosfatidilcolina. En el panel inferior, aparece la distribución (%) entre las clases de lípidos neutros, TAG y DAG, triacil- y diacil-glicéridos, respectivamente; ADG, alquil-DAG; EC, ésteres del colesterol.

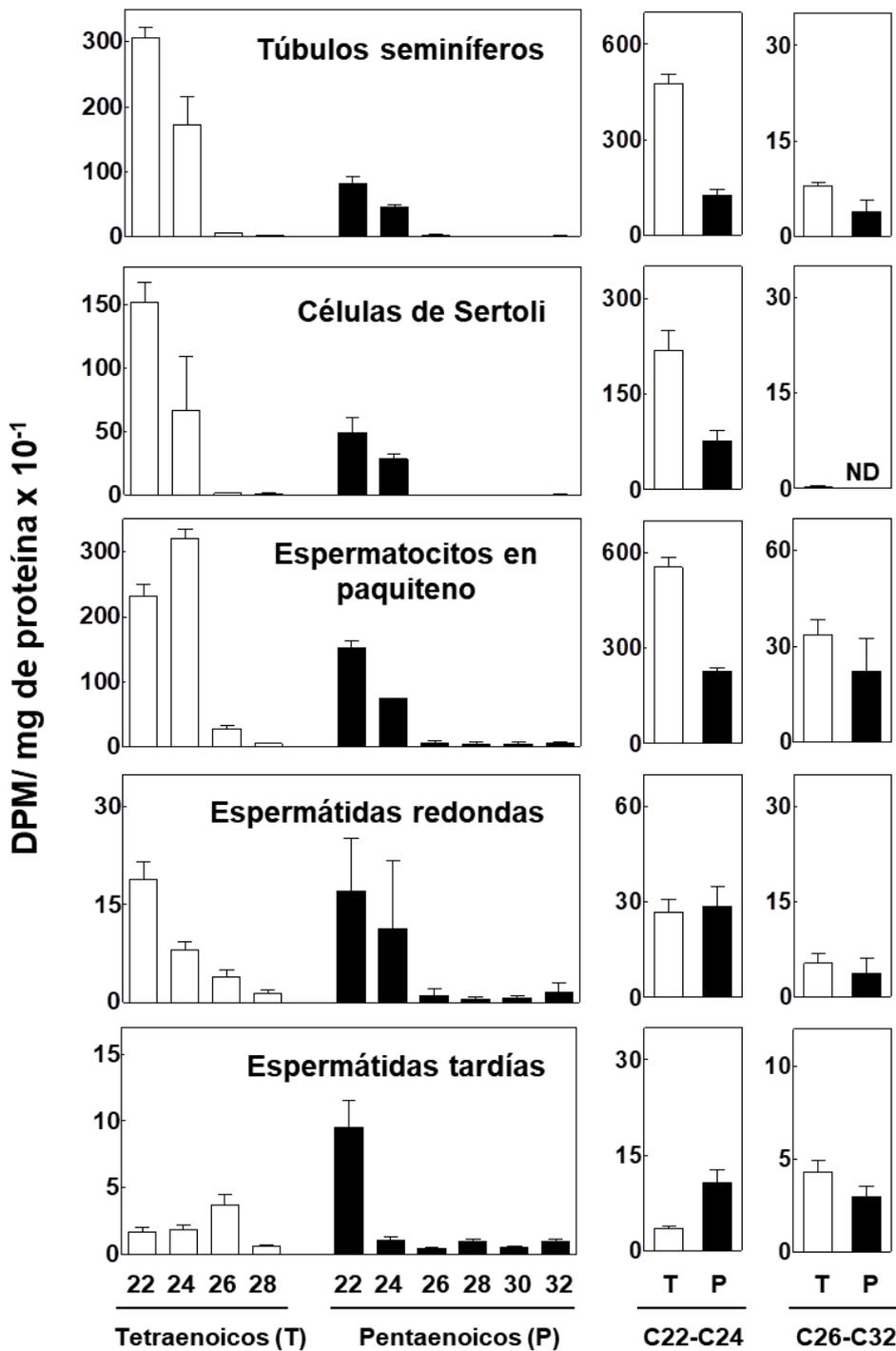


Figura 22. Transformaciones sufridas por el $[^3\text{H}]20:4n-6$ en poblaciones celulares del epitelio seminífero de rata en cultivo. Los túbulos seminíferos y las células indicadas, fueron mantenidas en forma independiente en cultivo durante 20 horas en presencia del precursor $[^3\text{H}]20:4n-6$. En todos los casos, a partir de los extractos lipídicos, se prepararon metil ésteres (ME) de ácidos grasos, que se separaron de acuerdo a su grado de insaturación para recuperar las fracciones con ME tetraenoicos (T) y pentaenoicos (P). Los componentes individuales de cada fracción se resolvieron de acuerdo a su longitud de cadena mediante HPLC, se colectaron, y su marca ($[^3\text{H}]$) se cuantificó por centelleo líquido. Los resultados se normalizaron sobre la base de la misma cantidad de proteína en cada preparación (DPM/ mg de proteína $\times 10^{-1}$, valores medios \pm SD, $n = 3$). En los paneles de la derecha, se comparan resumidamente las transformaciones sufridas por el $[^3\text{H}]20:4n-6$. Se muestran las *sumas* de radioactividad en ácidos grasos T y P de 22 a 24 carbonos por una parte, y las *sumas* de radioactividad en ácidos grasos T y P de 26 a 32 carbonos por otra.

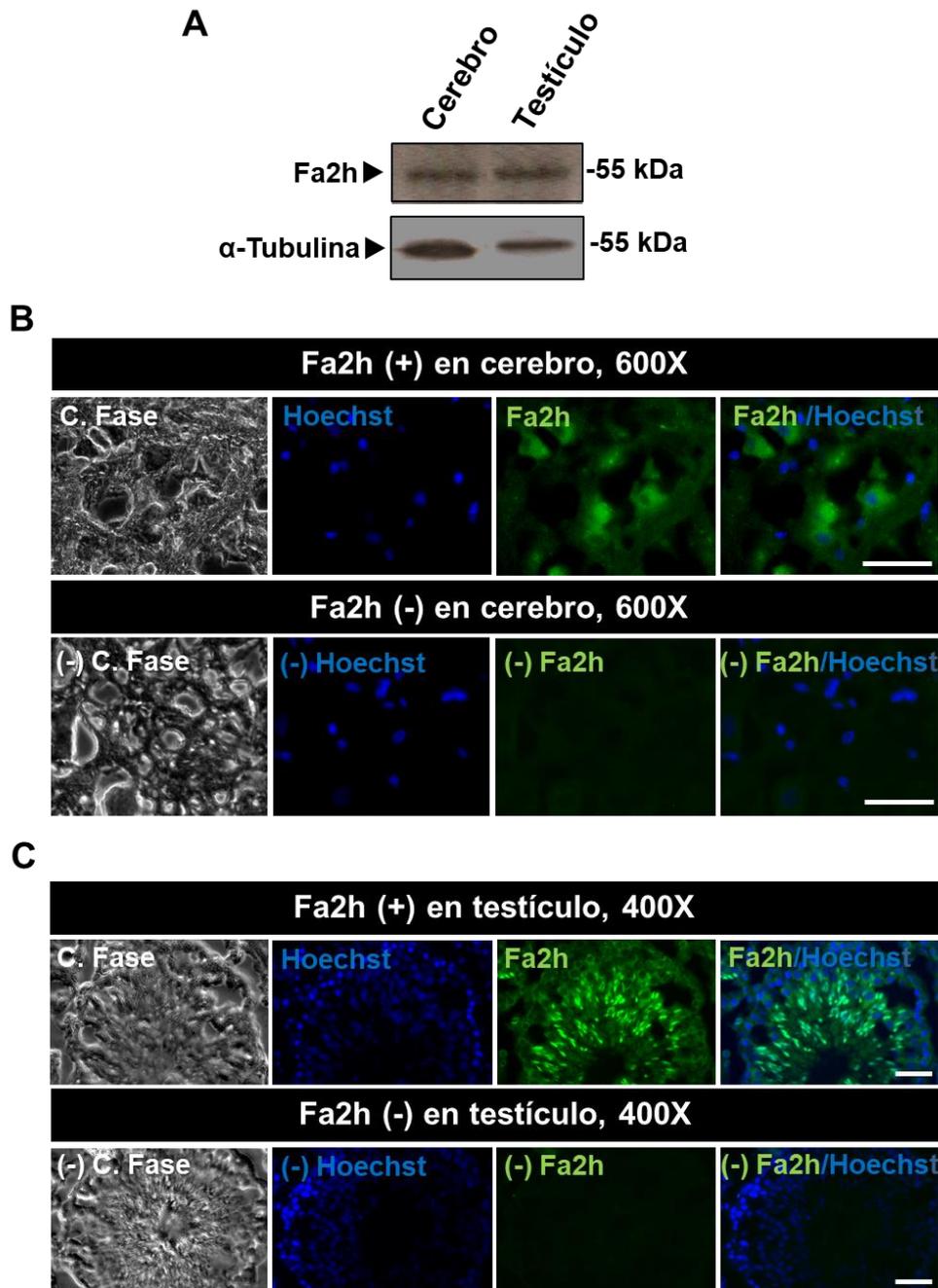


Figura 23. Inmunodetección de la proteína Fa2h en cerebro (control positivo) y testículo de rata adulta. **A:** Detección mediante *Western blot* de la proteína Fa2h en cerebro y testículo de rata adulta (P90) usando un anticuerpo específico contra Fa2h. Se sembraron cantidades equivalentes de proteína en cada caso. En ambos tejidos se detectó una banda correspondiente a un peso de 55 kDa. La proteína α -Tubulina fue utilizada como control de carga. **B:** Immunolocalización de la proteína Fa2h (verde) en cortes histológicos de cerebro mediante epifluorescencia. Debajo se muestra el control negativo (-) del mismo tejido de cerebro incubado con solución de bloqueo en ausencia del anticuerpo anti-Fa2h, comprobando la especificidad de la marca detectada arriba. **C:** Immunofluorescencia de la proteína Fa2h (verde) en cortes histológicos de testículo de rata adulta (estadio VII-VIII) usando un anticuerpo específico contra Fa2h. La marca fue específica para la proteína de interés ya que en el control negativo (-) no se detectó la misma. Los núcleos fueron teñidos con Hoechst y se ven de color azul. Barras = 50 μ m.

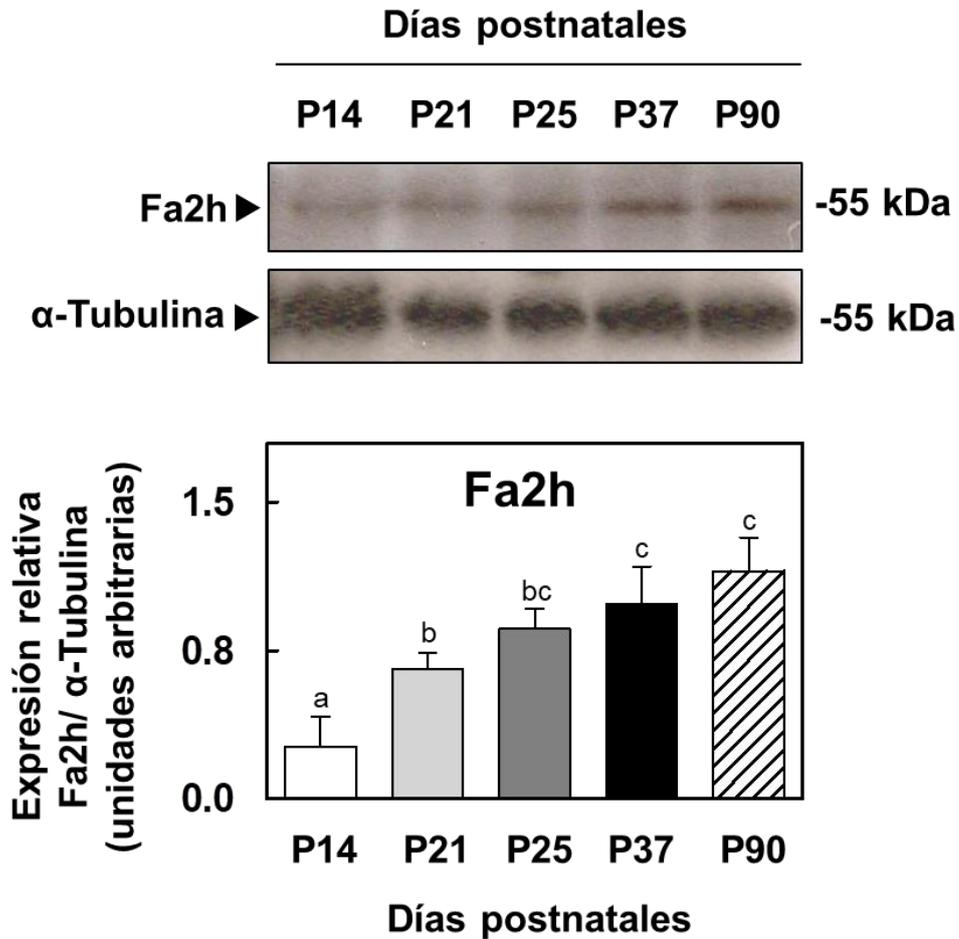


Figura 24. Cambios en la expresión de la proteína Fa2h en el testículo durante el desarrollo postnatal. Se muestra un *Western blot* representativo de los niveles de expresión de la proteína en los días postnatales (P) indicados. Los números de la derecha indican los pesos moleculares. El gráfico de barras muestra la densidad correspondiente a la expresión de Fa2h en relación con la del control de carga (α -Tubulina). Letras diferentes (a-c) indican diferencias significativas ($p < 0.05$, ANOVA).

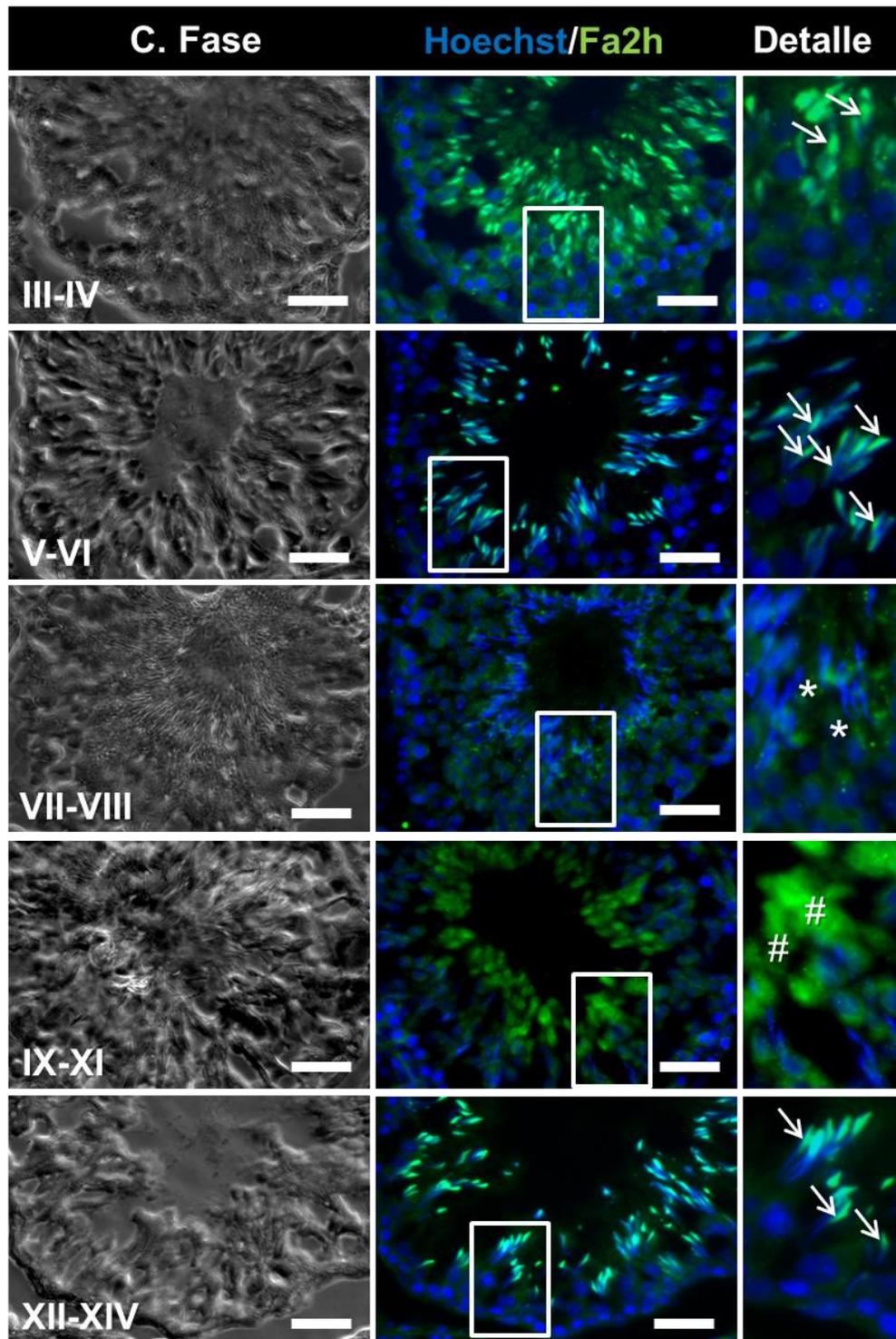


Figura 25. Distribución diferencial de la proteína Fa2h en el testículo adulto de rata en los estadios del ciclo del epitelio seminífero indicados. Fa2h (verde) se expresó exclusivamente en células de la línea germinal, principalmente espermátidas elongadas. En estas células se detectó más intensamente en los estadios tubulares III-IV, V-VI, IX-XI y XII-XIV. De estos estadios, la localización de la proteína fue citoplasmática (#) en IX-XI (pasos 9-11 de la espermiogénesis) mientras que, en el resto de los estadios, que contienen espermátidas más avanzadas (pasos 12-18), Fa2h estuvo concentrada alrededor de la cromatina muy condensada de los núcleos celulares (teñidos de azul con Hoechst, flechas). En las espermátidas más tardías (estadios VII-VIII, paso 19 de la espermiogénesis), ya no se detectó una marca intensa correspondiente a Fa2h (*), indicando que su expresión es temporaria en estas células. Barras= 50 μ m.

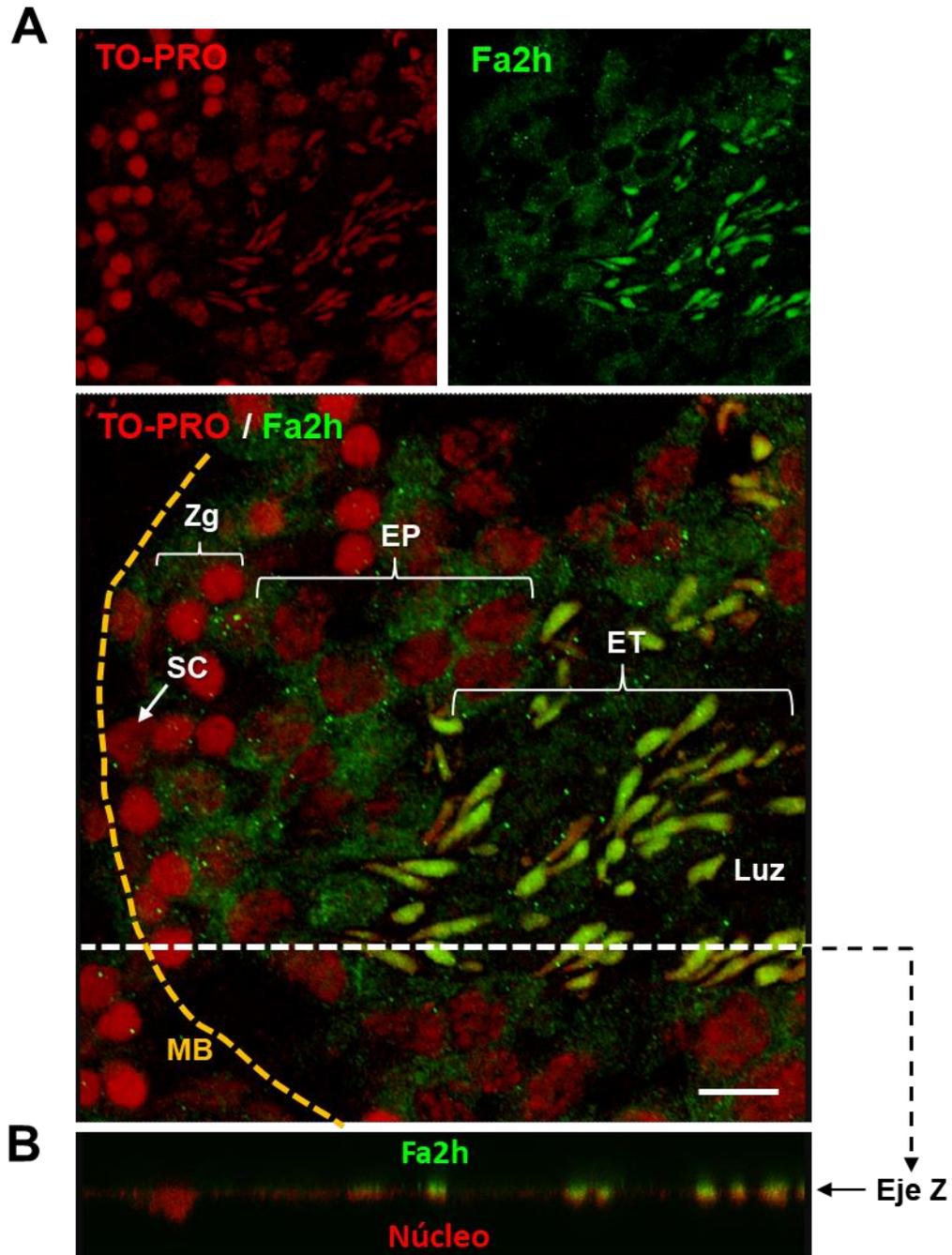


Figura 26. Inmunolocalización de la proteína Fa2h en células del epitelio seminífero adulto. **A:** Se muestran imágenes de fluorescencia de microscopía confocal para Fa2h (verde) en cortes de testículo adulto en los estadios XII-XIV (barra= 10 μ m). Los núcleos se tiñeron de rojo con la sonda fluorescente TO-PRO. Fa2h apareció concentrada cerca del núcleo de las espermatídicas tardías (ET). Los espermatocitos meióticos en zigoteno (Zg) y en paquiteno (EP) presentaron una débil marca de localización citoplasmática difusa. Se pueden distinguir algunas células de Sertoli (S) que no expresan la proteína. La línea de corte blanca punteada indica la sección de tejido analizada mediante seccionamiento ortogonal que se muestra en la imagen de abajo. Se indica la membrana basal (MB) con líneas punteadas amarillas. **B:** Sección a través del eje Z en donde se puede apreciar que Fa2h reposa en estrecho contacto con la membrana nuclear de las espermatídicas tardías (pasos 12-14 de la espermiogénesis).

***RESULTADOS -
CAPÍTULO III***

III. BIOSÍNTESIS DE ESFINGOLÍPIDOS EN CÉLULAS ESPERMATOGÉNICAS

En el capítulo anterior mostramos cómo se expresan a nivel ARNm y proteína enzimas involucradas en la síntesis de los VLCPUFA no hidroxilados (n-V) e hidroxilados (h-V) que forman parte de las SM y Cer presentes en las membranas de las células espermatoogénicas. En el presente capítulo nos propusimos reunir evidencia que permitiera definir la capacidad que tienen las células germinales en distintos estadios de su diferenciación para biosintetizar por sí mismas Cer, SM y glucosilceramidas (GlcCer). En cultivos primarios de células germinales, tanto totales como poblaciones en distintos estadios de su diferenciación, evaluamos distintos pasos de la vía que conduce a dicha biosíntesis, empleando inicialmente un precursor fluorescente (la NBD-C6-Cer) y luego en mayor profundidad un precursor radioactivo (el [³H]16:0). En este último caso, enfocamos nuestro estudio sobre la Cer, la SM y la GlcCer, si bien este precursor marca prácticamente todas las clases lipídicas de las células. Como estrategia para poner en evidencia pasos esenciales de la ruta biosintética clásica, se utilizaron inhibidores específicos de enzimas clave de la misma, como la L-cicloserina (**CS**) y la fumonisina B1 (**FB1**). Además, se estudió el posible efecto, sobre la marcación de los 3 esfingolípidos, de la testosterona (**Tes**) y de factores solubles liberados al medio de cultivo por las células de Sertoli (**MCS**). En el caso de la Cer y la SM, se prestó atención a la marcación con [³H]16:0 de las especies con VLCPUFA en condiciones control y bajo la influencia de Tes y MCS. En la última parte del capítulo, nos concentramos en la expresión, a nivel ARNm, de enzimas clave de la vía biosintética, tales como la Cer sintasa, SM sintasas, y GlcCer sintasa, en las mismas condiciones.

1. BIOSÍNTESIS DE SM Y GlcCer EN CÉLULAS GERMINALES AISLADAS A PARTIR DE NBD-C6-Cer

El uso de esta ceramida exógena fluorescente como precursora tiene la ventaja de ser fácilmente metabolizable, esto es, mediante hidrólisis por una ceramidasa da lugar a moléculas de esfingosina no marcadas y de AGL fluorescentes, mientras que al ser utilizada como sustrato por una SM sintasa o una GlcCer sintasa se convierte en moléculas de SM y de GlcCer fluorescentes. Todos estos productos, así como C6-Cer, son fáciles de separar por TLC y de visualizar bajo luz UV, sin que interfiera en ello la presencia en las muestras de otros lípidos, dado que éstos no se marcan.

En nuestros sondeos iniciales agregamos NBD-C6-Cer a poblaciones de células espermatoogénicas en tres estadios de su diferenciación (EP, ER y ET), y las mantuvimos en cultivo durante 5 horas (**Figura 1**). Los resultados mostraron que los EP fueron significativamente ($p < 0.05$) más activos sintetizando SM que las ER y que las ET. Así, la

cantidad de NBD-SM generada en los EP fue 1.4 mayor que en las ER y 2.2 veces mayor que en las ET, lo cual demostró una disminución en la capacidad de *biosíntesis* de SM con el avance de la diferenciación. Un comportamiento similar evidenció la capacidad de las células para formar GlcCer, con una diferencia entre células que fue aún de mayor magnitud que para la SM, ya que al cabo de 5 horas los EP generaron ≈ 3 veces más GlcCer que las ER y que las ET ($p < 0.05$), sin diferencias significativas entre los niveles de lo producido por estas últimas células.

Un hecho llamativo al emplear NBD-C6-Cer como sustrato fue que en los tres estadios de su diferenciación, las células fueron claramente más activas en la biosíntesis de GlcCer que de SM. Dado que en el caso de la NBD-C6-Cer el AG unido por unión amida a la esfingosina es muy distinto desde el punto de vista estructural a los AG que normalmente la Cer contiene en las células espermatozógenas, estos resultados necesitaban ser confrontados con los obtenidos con otros precursores.

2. BIOSÍNTESIS DE Cer, SM Y GlcCer EN CÉLULAS GERMINALES AISLADAS A PARTIR DE [³H]16:0

2.1. Evaluaciones preliminares

Antes de someter a las preparaciones de células germinales (CT, EP, ER) a las largas horas de cultivo en las condiciones experimentales que planeábamos evaluar, procedimos a realizar ensayos preliminares tendientes a evaluar aspectos de la viabilidad y funcionalidad de las células al concluir los experimentos, aplicando los mismos ensayos a utilizar con [³H]16:0, sólo que utilizando 16:0 no marcado (en la misma concentración, 2.5 μ M). En términos generales, los esquemas experimentales consistieron en preincubar a las células durante 5 horas en presencia y en ausencia del factor a evaluar, como inhibidores (CS y FB1), o testosterona (Tes), cumplidas las cuales se les agregó el ácido graso y otros factores, como el medio de cultivo condicionado de células de Sertoli (MCS) y se continuó con el cultivo durante 20 horas, esto es, las células estuvieron en cultivo un total de 25 horas.

Cicloserina y fumonisina. Inicialmente se probaron concentraciones de CS y de FB1 que fueron seleccionadas de la bibliografía, utilizando para los controles los respectivos vehículos (agua y DMSO, respectivamente). En la **Figura 2, A y B** se comparan los efectos de la presencia de CS y FB1 sobre la viabilidad celular y la funcionalidad mitocondrial en preparaciones de CT, respectivamente. La primera, estimada mediante la exclusión del yoduro de propidio, estuvo disminuida sólo entre el -14% y -18% en los controles, permaneciendo por lo tanto viables entre el 82% y el 86% de las células aproximadamente, lo que es considerado muy satisfactorio para cultivos primarios de tanta duración. La

integridad de la membrana celular había sido afectada similarmente tanto en controles como en experimentales luego de transcurridas las 25 horas en cultivo, ya que no hubo diferencias significativas entre ellos. La funcionalidad mitocondrial como parámetro del estado metabólico de las células se evaluó mediante el ensayo de reducción del MTT. Esta capacidad disminuyó menos ($\approx -20\%$) en presencia de CS 1 mM que en presencia de FB1 100 μM (-44%) en relación a su correspondiente control. Estos resultados indicaron que si bien las condiciones ensayadas alteraron en parte la actividad metabólica mitocondrial de las células espermatozógenas, los inhibidores a las concentraciones empleadas no afectaron la viabilidad durante el periodo de incubación.

Testosterona. Mediciones similares (**Figura 3, A y B**) se realizaron en preparaciones de CT cultivadas con Tes 0.1 μM o su vehículo (etanol) durante 5 horas, seguido esto del agregado del 16:0 2.5 μM y continuando el cultivo en presencia de la Tes o del etanol durante 20 horas más. Los resultados no mostraron cambios notorios en la viabilidad celular al cabo de las 25 horas, ya que \approx el 86% de las células permanecieron viables, tanto las controles como las tratadas con Tes. En cambio, pudo apreciarse que la capacidad de reducción del MTT disminuyó significativamente en presencia de Tes (-27.5%), quedando el número de células no afectadas en $\approx 72.5\%$ en relación al control.

Medio MCS en ausencia y en presencia de Tes. La **Figura 4, A y B**, muestra que tampoco se afectó la viabilidad de las células incubadas por 5 horas tanto en ausencia como en presencia de Tes, a las cuales, se les agregó el medio MCS y se continuó el cultivo por 20 horas, ya que el porcentaje de células viables luego de 25 horas fue de un 86% en todas las condiciones. Por su parte, la capacidad reductora mitocondrial sufrió una significativa, aunque pequeña disminución con respecto a la condición control en las células suplementadas con el MCS ($\approx -13.7\%$), y algo más en las células tratadas con MCS en presencia de Tes ($\approx -25\%$), quedando el número de células no afectadas en $\approx 75\%$.

En relación a los correspondientes controles, no se observaron cambios aparentes en la morfología de las células luego de haberlas mantenido en cultivo durante un total de 25 horas en cada una de las condiciones recién mencionadas (**Figuras 5, 6, y 7**).

2.2. Incorporación de [^3H]16:0 en lípidos neutros y polares

Para poner de manifiesto la capacidad de las células espermatozógenas totales (CT) aisladas y en cultivo primario, para biosintetizar *de novo* sus propios esfingolípidos, antes de utilizar [^3H]16:0 en los experimentos, se había intentado hacer que las células incorporaran [^3H]serina en ellos. Luego de 24 y aún 48 horas de incubación con 1 y 2 μCi de [^3H]serina, ésta se había incorporado activamente en glicerofosfolípidos como la PS, seguida de la PE, pero la cantidad de marca proveniente de este aminoácido en los esfingolípidos era tan

pequeña que fue insuficiente para continuar los estudios. Es por ello que los resultados presentados de aquí en adelante en este Capítulo corresponden a ensayos realizados con el [^3H]16:0 como precursor.

Como se muestra en la **Tabla 1**, luego de 20 horas en su presencia, las CT en cultivo incorporaron tan sólo el 6.5% del [^3H]16:0 disponible en el medio. Al someter los EP y las ER a cultivos en condiciones similares, los EP incorporaron una proporción mayor (18.2%) del [^3H]16:0 disponible que las CT, y también unas 3 veces más que lo que incorporaron las ER (5.9%). Si comparamos el 6.5% de las CT con el 5.9% de las ER, los resultados guardan relación con el hecho de que las espermátidas son las células mayoritarias en una preparación de CT. Al realizar las particiones durante la preparación de los extractos lipídicos a partir de las CT, la mayor parte de la radioactividad fue detectada en la fase orgánica (91.9%), esto es, en componentes liposolubles, quedando tan sólo el 8.1% en la fase acuosa como productos hidrosolubles. Algo similar ocurrió para los EP y las ER, encontrando un 98% de la radioactividad en los extractos de EP y un 88.5% en los de ER en la fase orgánica, y solo el 2% y el 11.5%, respectivamente, en la fase acuosa. Esto coincidió, como veremos, con una incorporación en lípidos totales más eficiente por parte de los EP que de las ER.

La distribución de la marca proveniente del [^3H]16:0 entre fracciones lipídicas (**Figura 8**) mostró que en los tres casos apareció principalmente en la fracción lípidos polares (64% del total incorporado en las CT, y \approx 71% del total en los EP y las ER), y en menor medida en la fracción lípidos neutros (28%, 22% y 16%, respectivamente), permaneciendo una cantidad relativamente baja, aunque algo más alta para las ET (8%, 7%, y 13.6%, respectivamente), como ácido graso libre (AGL) (**Figura 8 A**).

En la fracción lípidos polares (**Figura 8 B**), la distribución de la marca del [^3H]16:0 entre fosfolípidos mostró que los glicerofosfolípidos de colina (CGP) concentraron la mayor parte de la radioactividad (66.8% en las CT, 76% en los EP, y 71% en las ER), seguidos muy por debajo por los glicerofosfolípidos de etanolamina (EGP) (17%, 10.5% y 11.9%, respectivamente), y, siguiendo en el mismo orden, por el fosfatidilinositol (PI) (9%, 9.2% y 12.3%), y la fosfatidilserina (PS) (3.7%, 2.3% y 2.6%). En las tres poblaciones celulares, la marca de [^3H]16:0 incorporada en la SM, uno de nuestros lípidos de interés, representó un muy pequeño porcentaje (1.1% en las CT, 1.1% en los EP, y apenas un 0.7% en las ER) de la presente en los fosfolípidos. La GlcCer (no mostrada) alcanzó un porcentaje similar al de la SM.

En la fracción lípidos neutros (**Figura 8 C**), también en los tres casos, la mayor parte del [^3H]16:0 apareció esterificado en los triacilgliceroles (TAG) (63.3% en las CT, 48% en los

EP, y 49.6% en las ER), y en menor medida en los diacilgliceroles (DAG) (21.1%, 26.9% y 32.3%, en el mismo orden), seguidos de los alquil-diacilglicéridos (ADG) (10.8%, 13.3% y 13.1%). Por su parte, del total de la marca en lípidos neutros, las Cer, lípidos neutros de nuestro especial interés, incorporaron un 3.2% en el caso de las CT, un 10.7% en el de los EP, y un 3% en el de las ER. Tomados en conjunto, estos números indican que la actividad de biosíntesis de Cer es mucho más activa en los EP que en las ER.

2.3. Biosíntesis de Cer, SM y GlcCer

En la **Figura 9** se muestra un ejemplo de la separación de la Cer y de la SM de las células espermatogénicas en grupos de especies moleculares por TLC monodimensional y bidimensional, respectivamente. Debido a la presencia del grupo hidroxilo, las Cer con h-V son más polares que las Cer con n-V, y al contener ambas AG de longitud e insaturación similar, tienden a separarse ampliamente entre sí. Las especies de Cer con AG más "cortos", saturados (s) y monoenoicos (m) (16:0, 18:0, 18:1) quedan situadas en la zona intermedia entre las dos. Como comentamos en Materiales y Métodos, con las SM la separación por TLC monodimensional en especies tiende a seguir el mismo orden, sólo que, al contener proporciones relativamente mayores de especies (s+m) SM que las Cer (Capítulo I), la separación entre las especies (s+m) SM y h-V SM se dificulta. En el presente capítulo se aplicó la TLC bidimensional, en la cual estas últimas permanecen juntas pero se separan claramente de las n-V SM (Fig. 9).

En el panel superior izquierdo de la **Figura 10** se muestra, expresada en pmoles, la incorporación total de [³H]16:0 en Cer, SM y GlcCer, aisladas mediante TLC, a partir de extractos lipídicos correspondientes a 10⁸ células espermatogénicas totales (CT). Estas células efectivamente fueron más activas (≈ 4 veces) en la síntesis de Cer que en la de SM y GlcCer, las cuales alcanzaron niveles de incorporación similares entre ellas luego de 20 horas en cultivo.

Tanto para la Cer como para la SM, la marca total detectada presentó una distribución diferencial entre las especies moleculares aisladas mediante TLC como se muestra en la Fig. 9. Las Cer conteniendo las especies con AG s y m [(s+m) Cer], incorporaron la mayor parte del [³H]16:0, seguidas por las Cer ricas en n-V (n-V Cer) y en tercer lugar por aquellas que contienen los h-V (h-V Cer) (relación molar entre ellas, 5.0 : 3.3 : 1.0).

En el caso de la SM, la mayor parte de la radioactividad también se detectó en el conjunto de las especies (s+m+h-V) SM. Por su parte, las especies de SM con n-V (n-V SM), representando en gran parte (como vimos en el Capítulo I) a las SM concentradas en las membranas plasmáticas de las células, incorporaron relativamente menos del total del [³H]16:0 incorporado en la SM (relación molar, 1.7 : 1.0). Esto fue consistente con los datos

del Capítulo I, si se tiene en cuenta que las primeras se concentran en las membranas intracelulares, donde se espera ocurra la síntesis *de novo* de esfingolípidos.

En la Fig. 10 puede compararse la capacidad de los EP y de las ER para biosintetizar Cer, SM y GlcCer a partir del [³H]16:0, expresada, como en el caso de las CT, en pmoles incorporados por cada 10⁸ células. Si bien los EP fueron mucho más activos que las ER, ambos tipos celulares exhibieron dicha capacidad. Luego de 20 horas en cultivo en presencia del precursor, los EP incorporaron el triple de radioactividad en su Cer y en su SM que la que incorporaron las ER. La GlcCer fue el esfingolípidos menos activamente sintetizado por ambos tipos celulares, si bien los EP también fueron (≈ 2 veces) más activos que las ER a este respecto.

En ambos tipos celulares, las (s+m) Cer incorporaron la mayor parte del [³H]16:0. En cuanto a especies con VLCPUFA, mientras los EP incorporaron cantidades similares de [³H]16:0 en n-V Cer y h-V Cer, (≈ 10 y 9 pmoles, respectivamente, Fig. 10), las ER lo hicieron más en las h-V Cer que en las n-V Cer (3.5 y 2.0 pmoles, respectivamente). Los EP fueron 3, 5, y 3 veces más activos que las ER en la síntesis de las (s+m) Cer, n-V Cer, y h-V Cer, respectivamente.

En el caso de la SM, no hubo diferencias tan amplias en la incorporación de radioactividad entre los dos grupos de SM aislados para cada tipo celular, si bien tanto en EP como en ER ésta fue algo mayor para las (s+m+h-V) SM que para las n-V SM.

2.4. Inhibición de la biosíntesis de Cer, SM y GlcCer

Con el fin de profundizar en la demostración de su capacidad de biosintetizar SL por la vía *de novo*, las células en cultivo primario fueron pretratadas durante 5 horas con CS y luego cultivadas con [³H]16:0 durante 20 horas adicionales en la continua presencia de CS. Inicialmente, se compararon los efectos de dos concentraciones de CS, 1 mM y 2 mM (**Tabla 2**) sobre la incorporación de [³H]16:0 en CT. Ambas concentraciones, pero como se podía prever, 2 mM más que 1 mM, resultaron en una reducción muy significativa en los niveles de marcación de Cer, SM y GlcCer con [³H]16:0. Así, con 2 mM CS, el nivel de *inhibición* de la marcación de Cer (-65%), el de SM (-80%), y el de GlcCer (-75%), implicó que las células incorporaron tan sólo un 35%, un 20% y un 25% de la marca en cada lípido con respecto a los respectivos controles no tratados. Al considerar los efectos de la concentración 2 mM de CS sobre las especies de Cer (Tabla 2), la caída de la marca en (s+m) Cer, n-V Cer y h-V Cer en células tratadas fue -60%, -80%, y -46% resultando en un 40%, 20% y 54%, respectivamente, al de las correspondientes especies sin tratar. En cuanto a las especies de SM, la marca en (s+m+h-V) SM, resultó reducida más veces (-89%) que la de n-V SM (-66%) por la CS.

La FB1 resultó también fuertemente inhibitoria de la marcación de los tres lípidos. En la **Figura 11** y en la **Figura 12** se comparan los efectos inhibitorios de 1 mM CS con los de 100 μ M FB1, en CT, EP y ER, sobre la incorporación de [3 H]16:0 en Cer (y sus especies), y en SM (y sus especies), respectivamente, y en la **Figura 13** se muestran los efectos de ambos inhibidores sobre la marcación de GlcCer. Si bien se observaron diferentes *grados* de inhibición con CS y FB1 para cada lípido, una observación general que tendió a cumplirse para los tres lípidos en los tres tipos celulares (CT, EP, ER), fue que los dos inhibidores resultaron en significativas caídas de la incorporación de [3 H]16:0 en ellos. Ello permite concluir que la vía *de novo* de biosíntesis de estos SL está activa en las células espermatogénicas.

Cer, SM y GlcCer totales. En las CT, 1mM CS inhibió significativamente la síntesis de la Cer total (-33%), mientras que 100 μ M FB1 fue un inhibidor aún más potente (-79%) con respecto a sus correspondientes controles (Fig. 11). Por su parte, la síntesis de SM total (Fig. 12) también fue inhibida en menor medida (-39%) por 1 mM CS que por 100 μ M FB1 (-58%). En el caso de la GlcCer total, los dos inhibidores redujeron significativamente su marcación, aunque que a un nivel similar (ambos, \approx -40%) (Fig. 13).

En los EP y en las ER, al contrario de las CT, la marcación de la Cer total fue inhibida más activamente por la CS que por la FB1 (Fig. 11). Por su parte, la inhibición de la síntesis de la SM total por CS y FB1 difirió entre los EP y las ER (Fig. 12). Así, en los EP, CS fue un inhibidor menos potente que FB1, mientras que en las ER CS resultó ser más potente que FB1. En cuanto a la GlcCer total (Fig. 13), en los EP, CS fue un inhibidor menos potente que FB1, mientras en las ER CS y FB1 fueron igualmente potentes.

Especies de Cer. Si bien en las tres poblaciones celulares ambos inhibidores redujeron con respecto al control la incorporación de [3 H]16:0 en los tres grupos de especies de Cer separados por TLC, la magnitud del efecto inhibitorio de CS y FB1 fue distinta entre CT, EP y ER (Fig. 11). Llamativamente, en la Cer de las CT, la CS fue menos potente que la FB1 en la inhibición de la síntesis de los tres grupos de especies de Cer, mientras lo contrario tendió a ocurrir en los EP y en las ER, donde CS tendió a inhibir más intensamente que FB1 la formación de los tres grupos de especies de Cer. Comparando ahora los grupos de especies de Cer entre sí, en las CT el orden de inhibición por CS fue mayor para (s+m) Cer que para n-V Cer y h-V Cer (similar en estas), mientras que en el caso de FB1 el orden de inhibición fue mucho mayor para (s+m) Cer >> que para h-V Cer y para éste > que para n-V Cer (Fig. 11). Por su parte, en los EP y en las ER el orden de potencia inhibitoria fue opuesto al observado en las CT (Fig. 11), ya que la marcación de las h-V fue más inhibida por la CS que por la FB1.

Especies de SM. La efectividad de los dos inhibidores se manifestó también diferencialmente entre los dos grupos de especies de SM (Fig. 12). En las CT, y también en los EP, los porcentajes de inhibición, tanto por la CS como por la FB1 fueron mayores para el grupo conteniendo (s+m+h-V) SM que para el que contenía las n-V SM, siendo la FB1 el inhibidor más potente en ambos casos. Por el contrario, en las ER, la CS resultó mucho más efectiva que la FB1 en inhibir la síntesis de los dos grupos de especies de SM, y en mayor medida de las n-V SM.

2.5. Influencia de la testosterona sobre la biosíntesis de Cer, SM y GlcCer

La testosterona (Tes) posee un papel clave como hormona reguladora de la espermatogénesis al estimular la meiosis en los espermatoцитos y regular la expresión de genes específicos en ellos y en las espermátidas (Vigier *et al.*, 2004; Hasegawa *et al.*, 2010). Por otra parte se ha relacionado a la Tes con el metabolismo de los PUFA y los lípidos que los contienen en varios tejidos (Hurtado de Catalfo y de Gómez Dumm, 2005). Al comprobar que las células espermatogénicas aisladas eran capaces de biosintetizar *de novo* sus propios SL, nos propusimos evaluar los posibles efectos de la Tes sobre la formación de Cer, SM y GlcCer.

Mientras la suplementación con Tes no ejerció en las células en estudio ningún efecto aparente sobre la síntesis de Cer a partir del [³H]16:0, ni en el total ni en ninguna de sus especies (**Figura 14**), estimuló significativamente la de SM en todas sus especies (**Figura 15**). Así, en las CT, la marca en la SM total aumentó ≈ un 75%, mientras la de las (s+m+h-V) SM lo hizo en ≈ un 50%, y la de las n-V SM en un 110%. La comparación entre la SM de CT con la SM de EP y ER mostró que el efecto de la Tes se ejerció principalmente sobre la SM de estas últimas (Fig. 15). Así, mientras la marca de SM no cambió en los EP, en la SM total de las ER aumentó ≈ un 30%, la de las (s+m+h-V) SM lo hizo en ≈ 28% y la de las n-V SM en ≈ 53%.

Al mismo tiempo que estimuló la biosíntesis de SM, la Tes resultó en una disminución significativa de la de GlcCer (≈ -40%) en las CT (**Figura 16**). La comparación entre la GlcCer de EP y ER mostró que mientras la Tes no cambió la marca de GlcCer en los EP, la marca de GlcCer en las ER disminuyó significativamente (≈ - 45%) (Fig. 16).

2.6. Influencia del medio de cultivo condicionado de células de Sertoli (MCS) en ausencia y en presencia de testosterona sobre la biosíntesis de Cer, SM y GlcCer

Las células de Sertoli (SC) cumplen un rol fundamental en el mantenimiento y la diferenciación de las células espermatogénicas en el epitelio seminífero. Otro de los objetivos de esta tesis doctoral era averiguar si las SC juegan algún rol en la regulación de la biosíntesis *de novo* de SL en las células espermatogénicas, a través de la acción de

factores solubles (por ej., estimulación o inhibición paracrina). Para ello, cultivos de CT, EP y ER, preincubados durante 5 horas en presencia y en ausencia de Tes, fueron suplementados con el medio que denominamos MCS conteniendo el precursor [^3H]16:0, continuando los cultivos durante 20 horas en presencia o en ausencia de Tes. Los medios controles en ausencia de Tes contenían el vehículo de ésta (etanol) y el medio control en ausencia del MCS era el medio DMEM/F-12 (el que se había preparado como medio de cultivo de las SC para obtener los MCS).

Cer, SM y GlcCer totales. El MCS por sí sólo tuvo un importante efecto, al estimular la biosíntesis de Cer total, tanto en CT como en EP y en ER (**Figura 17**). Por su parte, no produjo efecto significativo sobre la biosíntesis de SM total ni en las CT ni en los EP: la estimuló mucho sólo en las ER (**Figura 18**). El MCS inhibió la biosíntesis de GlcCer en las CT, no la modificó en las ER, y la estimuló sólo en los EP (**Figura 19**). Este resultado es muy interesante, porque sugiere la posibilidad de que las SC podrían producir y liberar al MCS diferentes factores solubles para estimular la biosíntesis de SL en EP y en ER, o, alternativamente podrían producir un factor soluble para el cual los EP y las ER expresan distintos niveles de un mismo putativo receptor, cuyo estímulo resulta en aumentada biosíntesis de SL.

En presencia de Tes, la suplementación con el MCS no ejerció ningún efecto adicional aparente sobre la marcación con [^3H] de la Cer total de CT, EP o ER (Fig. 17) pero estimuló específicamente la biosíntesis de SM total en los EP (sin cambios significativos en la SM de las CT y las ER, Fig. 18) y la biosíntesis de GlcCer total en las ER (con una mínima disminución en la GlcCer de los EP, Fig. 19).

Grupos de especies de Cer y de SM. En concordancia con el estímulo que ejerció sobre la marcación de la Cer total, el MCS incrementó significativamente la incorporación de [^3H]16:0 a los tres grupos de especies de Cer, esto es, (s+m) Cer, n-V Cer y h-V Cer, de CT, EP y ER (Fig. 17). Por su parte, los dos grupos de especies de SM, esto es, (s+m+h-V) SM y n-V SM, también fueron estimulados por el MSC en coincidencia con el patrón que mostró la SM total, ya que ambos grupos de especies se estimularon significativamente por el MCS sólo en las ER (sin cambio en los EP, Fig. 18).

La suplementación con el MCS *en presencia* de Tes no modificó la marcación de (s+m) Cer con respecto al MSC sólo, ni en las CT, ni en los EP, ni en las ER. Por el contrario, el MSC en presencia de Tes estimuló mucho más que el MSC sólo la marcación de las especies n-V y h-V de Cer en CT y de n-V Cer en ER (Fig. 17). En el caso de los dos grupos de especies de SM, el MCS en presencia de Tes estimuló específicamente la

biosíntesis de las n-V SM en los EP, mientras no sólo no lo hizo, sino que más bien tendió a inhibirla en las ER, en comparación con el efecto del MSC en *ausencia* de Tes (Fig. 18).

3. EXPRESIÓN DE LOS GENES *CerS3*, *SMS1*, *SMS2* Y *GlcCerS* EN CÉLULAS ESPERMATOGÉNICAS

La ceramida sintasa 3 (*CerS3*) es la isoforma de *CerS* localizada en el retículo endoplásmico que es responsable de la biosíntesis de especies moleculares de Cer con VLCPUFA (Rabionet *et al.*, 2008). Las dos isoformas de la esfingomielina sintasa (*SMS*) difieren en su localización subcelular, esto es, la *SMS1*, se ubica en el lumen del aparato de Golgi mientras la *SMS2* lo hace en la membrana plasmática (Futerman y Riezman, 2005), y la *GlcCer* sintasa (*GlcCerS*), que sintetiza la *GlcCer* a partir de la Cer, también se ubica en el Golgi (Jeckel *et al.*, 1992). En esta sección del capítulo nos propusimos determinar la expresión de estos cuatro genes en las células germinales, para tratar de establecer correlaciones entre la expresión génica y la biosíntesis de Cer, SM, y *GlcCer* en ellas, tanto sin tratamientos como en las distintas condiciones experimentales en estudio.

Utilizando los pares de *primers* diseñados (especificados en la Tabla 4 de la sección Materiales y Métodos), las eficiencias de amplificación de los genes de interés fueron de valores similares y cercanos al valor máximo 1 ó 100% (104% ,105%, 93% y 95% de eficiencia para *CerS3*, *SMS1*, *SMS2* y *GlcCerS*, respectivamente), validando las cantidades reportadas para cada gen. El análisis en el *software* qBasePLUS indicó que la combinación de los genes de referencia utilizados, *Agps*, *Hprt* y *Pgk1* mostró un valor aceptable del factor de estabilidad M (< 0.5) y del factor de variabilidad V (<0.15) de geNorm al comparar los niveles de expresión entre las diferentes condiciones ensayadas para las células espermatoogénicas.

3.1. Influencia de la diferenciación celular

En la **Figura 20** se comparan los niveles de transcritos de *CerS3*, *SMS1*, *SMS2* y *GlcCerS* medidos en los EP y las ER. Con fines comparativos se incluyeron las espermátidas tardías (ET) y los cuerpos residuales (CR), además de las células de Sertoli (SC).

Entre las células del epitelio seminífero, los EP fueron los que mostraron los niveles más elevados del ARNm de *CerS3* (Fig. 20). Éstos niveles fueron significativamente menores y más similares entre sí, en las ER y en las ET, tendiendo a disminuir en el orden (EP>>ER≥ET). Dicho ARNm también apareció, concentrado con respecto a estas dos últimas células, en los CR. Estos resultados son consistentes con la superior capacidad que mostraron los EP sobre las ER para sintetizar especies moleculares de Cer con VLCPUFA,

demostrada en la Fig. 10. Por el contrario, no se detectó el ARNm de *CerS3* en las SC, resultado esperado considerando la forma en que se obtuvieron estas células.

Los niveles del transcripto de *SMS1* no mostraron diferencias significativas entre células en distintos estadios de diferenciación, aunque hubo una leve tendencia al aumento de la expresión de este gen con el avance de la diferenciación en el orden EP>ER>ET>CR. En las SC se hallaron niveles del ARNm de *SMS1* marcadamente inferiores a los de las células espermatogénicas.

Los niveles del transcripto de *SMS2* por su parte, mostraron sus niveles más elevados en las ER en comparación con las otras células espermatogénicas y con los CR (que no presentaron diferencias significativas entre sí), mientras fueron muy bajos en las SC.

Por su parte, los niveles del ARNm de *GlcCerS* presentaron valores *promedios* mayores en los EP que en las ER y en estos mayores que en las ET, con concentración en los CR, aunque las diferencias no resultaron estadísticamente significativas (EP≥ER≥ET≤CR). Las ET presentaron los niveles más bajos de este ARNm, comparables con los pequeños valores del mismo detectados en las SC. De los cuatro ARNm analizados, si bien minoritario, el del gen *GlcCerS* fue el que se halló más concentrado en estas últimas.

Comparando ahora los niveles de los transcriptos entre sí en cada tipo celular, observamos que en los EP, los niveles del ARNm de *CerS3* fueron muy superiores a los de los otros genes, encontrándose 19 veces más concentrado que los de *SMS1*, *SMS2* y *GlcCerS*, estos últimos tres con niveles similares entre sí. En las ER, los transcriptos de *CerS3* y *SMS2* fueron los que se hallaron más concentrados, seguidos por el de *SMS1*, y en menor medida por el de *GlcCerS*. En cambio, en las ET se hallaron niveles del ARNm de *SMS1* mayores que los de *CerS3* y *SMS2*, y pequeñas cantidades del transcripto de *GlcCerS*. Por su parte, los transcriptos de los cuatro genes se encontraron en los CR, siendo el más abundante el de *CerS3*, seguido por el de *SMS1*, y los más bajos (y similares entre sí) los de *SMS2* y *GlcCerS*. Finalmente, una observación común a los cuatro genes fue que los niveles de sus ARNm fueron notablemente menores en las SC que en las células de la línea germinal.

3.2. Influencia de hormonas esteroidales

Para determinar la posible correlación entre los efectos de la Tes sobre la biosíntesis *de novo* de Cer, SM y GlcCer en células espermatogénicas y la expresión en genes de enzimas implicadas en esta vía, se midieron los niveles de ARNm de las mismas mediante RT-qPCR en células espermatogénicas totales (CT). Los posibles efectos del 17-β-estradiol (E2) se determinaron en paralelo con los de la Tes teniendo en cuenta que estas células poseen una aromatasa (CYP19) funcional capaz de sintetizar E2 a partir de Tes, con el fin

de evaluar si los efectos de la Tes eran directos, o indirectos a través de su conversión a E2. Los correspondientes controles contenían el vehículo (etanol) en el cual habían sido disueltas las dos hormonas.

En las células suplementadas con Tes durante 5 horas, los niveles del ARNm de *CerS3*, *SMS1* y *GlcCerS* no se modificaron, mientras los de *SMS2* disminuyeron significativamente ($p < 0.001$), también en presencia de E2. En las células suplementadas con E2, las cantidades de los ARNm de *SMS1* y *GlcCerS* tampoco cambiaron significativamente, mientras los de *CerS3* disminuyeron a la mitad (**Figura 21**).

Por su parte, los ARNm de las elongasas *Elovl5*, *Elovl2* y *Elovl4* mostraron una tendencia al incremento en su expresión con Tes, si bien éste solo fue significativo para *Elovl5*, y no cambiaron su expresión con E2 (**Figura 22**). En la misma figura, notoriamente, se observa que la presencia de Tes incrementó en gran medida (al doble) los niveles del ARNm de *Fa2h*. En el caso del E2, se detectó un moderado aunque no significativo aumento para *Fa2h*. Estos resultados indican que la regulación a la alta de la expresión de *Elovl5* y *Fa2h* por parte de la Tes es un efecto directo, y no indirecto a través de su conversión a E2.

3.3. Influencia del medio MCS en ausencia y en presencia de hormonas esteroidales

En las **Figuras 23** y **24** se muestran los niveles de transcritos de los mismos genes del apartado anterior medidos mediante RT-qPCR para evaluar los efectos sobre su expresión de la suplementación con el MCS, sólo o en presencia de Tes o de E2. En este caso, los controles del MCS contenían DMEM/F-12 (que es el medio base del MCS) y todos los controles contenían etanol (el vehículo en el que se suplementaron la Tes y el E2).

Un resultado interesante fue que las células suplementadas con MCS produjeron cantidades de ARNm de *CerS3*, *SMS1* y *SMS2* menores con respecto al control, sin cambios en el ARNm de *GlcCerS* (**Figura 23**). Ni la disminución de la expresión de *SMS2*, ni los demás niveles de ARNm observados al tratar las células con MCS se modificaron en la presencia de cualquiera de las dos hormonas. En cambio, los niveles del ARNm de *CerS3*, que habían sido reducidos por el E2 (Fig. 22), aumentaron con el MCS en presencia de E2 (Fig. 23).

Llamativamente, los niveles del ARNm de las 3 elongasas evaluadas (*Elovl5*, *Elovl2* y *Elovl4*) también disminuyeron significativamente en las células suplementadas con el MCS (**Figura 24**). Por su parte, la expresión del transcrito de *Fa2h* no se vio afectada por la presencia del MCS sólo.

Al suplementar las células con MCS en presencia de Tes o de E2, *Elovl2* y *Elovl4* mostraron niveles de expresión similares a los del control. Por su parte, los niveles del ARNm de *Elovl5* y *Fa2h*, no cambiaron en las células tratadas con MCS en presencia de E2,

mientras aumentaron significativamente en las que fueron tratadas con MCS en presencia de Tes. Esto pone en evidencia que el aumento en la expresión de *Elovl5* y *Fa2h* es el resultado de la acción directa de la Tes sobre las células y no de la conversión de Tes en E2.

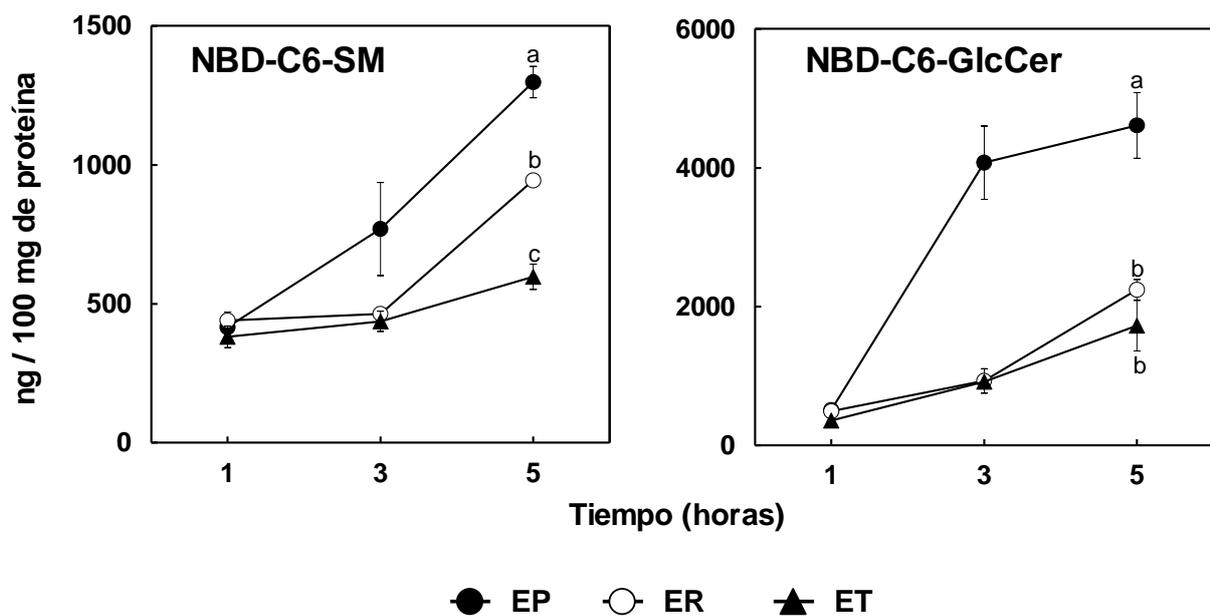


Figura 1. Biosíntesis de SM y GlcCer a partir de NBD-C6-Cer en células espermatoogénicas en tres estadios de su diferenciación. Se comparan los dos esfingolípidos marcados con NBD obtenidos a partir de extractos lipídicos de 5×10^6 espermatoocitos en paquitenio (EP), espermátidas redondas (ER) y espermátidas tardías (ET) que habían sido incubados con NBD-C6-Cer por 1, 3 y 5 horas. Los resultados se expresan sobre la base de una cantidad de proteína comparable. Con este precursor, los EP fueron significativamente más activos que las ER y las ET sintetizando ambos lípidos. Por otra parte, la biosíntesis de GlcCer fue aparentemente más activa que la de SM en los tres estadios celulares. Letras diferentes (a-c) indican diferencias significativas ($p < 0.05$, ANOVA).

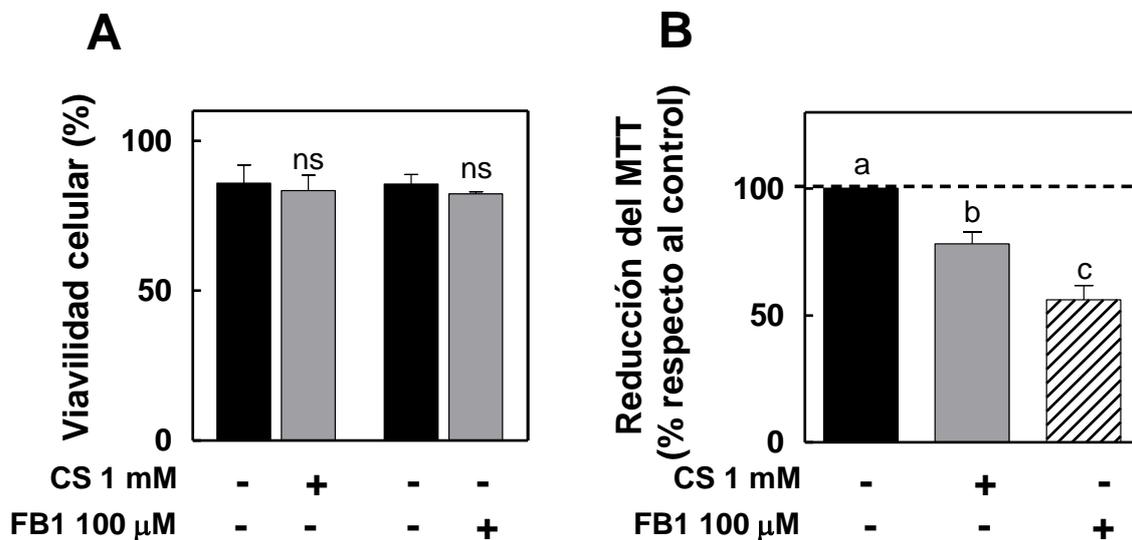


Figura 2. Ensayos de viabilidad y funcionalidad celular en las condiciones de cultivo a utilizar para evaluar la biosíntesis de esfingolípidos a partir de ácido palmítico (16:0): efectos de dos inhibidores. Emulando las condiciones en las que se encontrarán durante los ensayos de biosíntesis, las células espermatoogénicas totales (CT) fueron cultivadas en presencia de las concentraciones de L-cicloserina (CS) o de fumonisina B1 (FB1) que se indican, o con sus respectivos vehículos (H_2O o DMSO, barras negras) en presencia de 16:0 2.5 μ M. **A:** Mediante epifluorescencia se evaluó la integridad de la membrana celular por exclusión del yoduro de propidio. El gráfico muestra la media \pm SD del porcentaje de células viables por campo. No se hallaron diferencias significativas entre las condiciones ensayadas (ns, ANOVA). **B:** Mediante el ensayo del MTT, se evaluó la capacidad de las mitocondrias celulares para reducir al reactivo MTT, convirtiéndolo en sales de formazán. Los resultados representan valores medios \pm SD de 5 determinaciones independientes. Letras distintas (a-c) indican diferencias significativas entre las condiciones analizadas ($p < 0.01$, ANOVA). En ambos casos, los resultados se expresan como porcentajes con respecto a los respectivos controles, tomados como 100%.

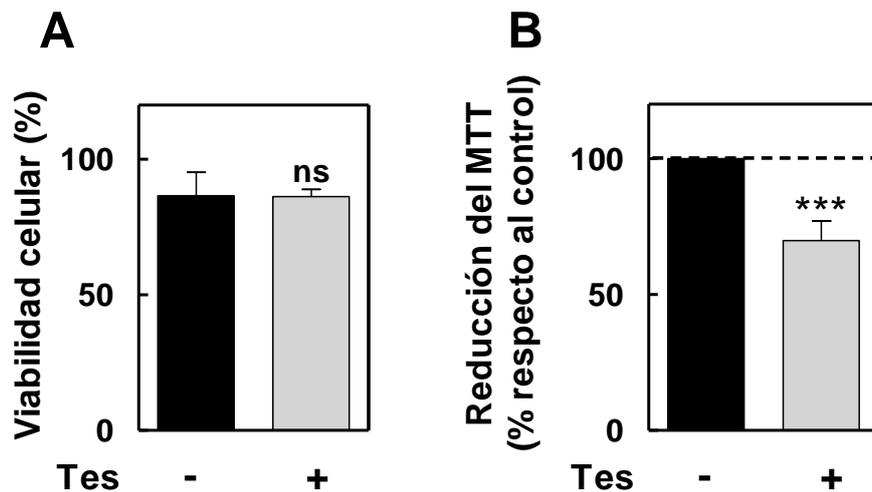


Figura 3. Efectos de la testosterona (Tes) sobre la viabilidad y la funcionalidad celular. Emulando las condiciones en las que se encontrarán durante los ensayos de biosíntesis de esfingolípidos, las células espermatoogénicas totales (CT) fueron incubadas con Tes 0.1 μ M o su vehículo etanol (control, barras negras) por 5 horas, agregándose el 16:0 no marcado, 2.5 μ M, y continuando el cultivo durante 20 horas en la presencia o ausencia de Tes. **A:** Mediante epifluorescencia se evaluó la integridad de la membrana celular por exclusión del yoduro de propidio. No se hallaron diferencias significativas entre las condiciones ensayadas (ns). **B:** Se evaluó la capacidad de las mitocondrias celulares para reducir al reactivo MTT. Los resultados representan valores medios \pm SD de 5 determinaciones independientes. Se halló un efecto significativo de la Tes con respecto al control (***) $p < 0.001$, *t* de student). En ambos casos, los resultados se expresan como porcentajes con respecto a los respectivos controles, tomados como 100%.

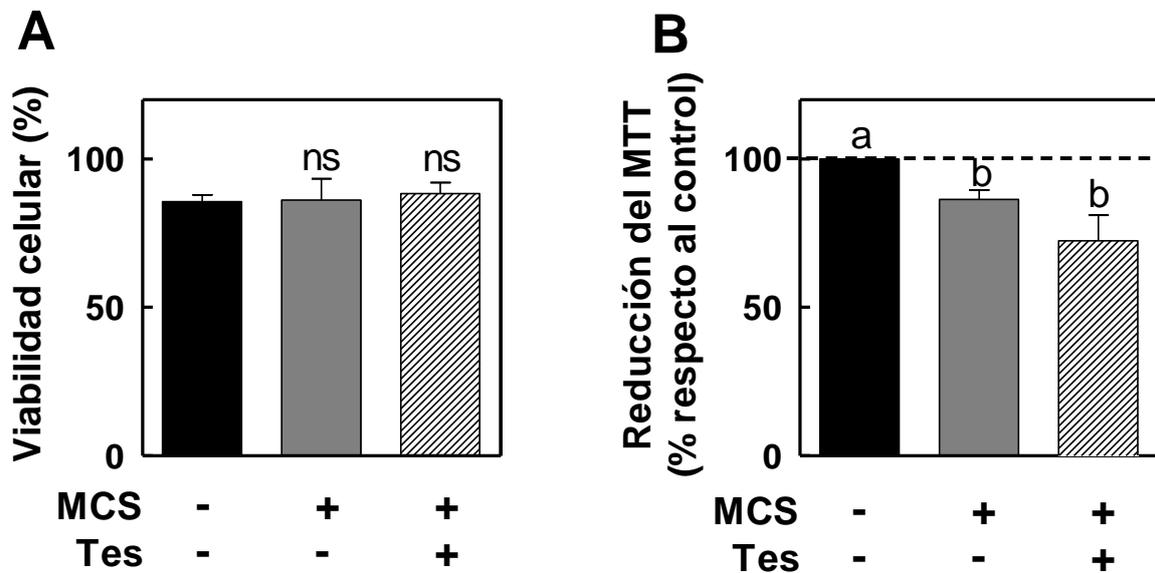


Figura 4. Efecto del medio condicionado de cultivos primarios de células de Sertoli (MCS) en presencia y en ausencia de Tes sobre la viabilidad y funcionalidad celular. Tanto las células controles como las suplementadas con Tes, fueron incubadas durante 5 horas, cumplidas las cuales se agregó el MCS (o el medio control de éste, el DMEM/F-12) en ambos casos conteniendo 16:0 no marcado 2.5 μ M, y la incubación continuó durante 20 horas en la continua presencia de la hormona (o de su vehículo, etanol, como control sin hormona). **A:** Mediante epifluorescencia se evaluó la integridad de la membrana celular por exclusión del yoduro de propidio. No se hallaron diferencias significativas entre las condiciones ensayadas (ns). **B:** Se evaluó la capacidad de las mitocondrias celulares para reducir al reactivo MTT. Los resultados representan valores medios \pm SD de 5 determinaciones independientes. Se halló un efecto significativo de Tes con respecto al control. Letras diferentes (a-b) indican diferencias significativas con respecto al control ($p < 0.01$, ANOVA). En ambos ensayos, los resultados se expresan como porcentajes con respecto a los respectivos controles, tomados como 100%.

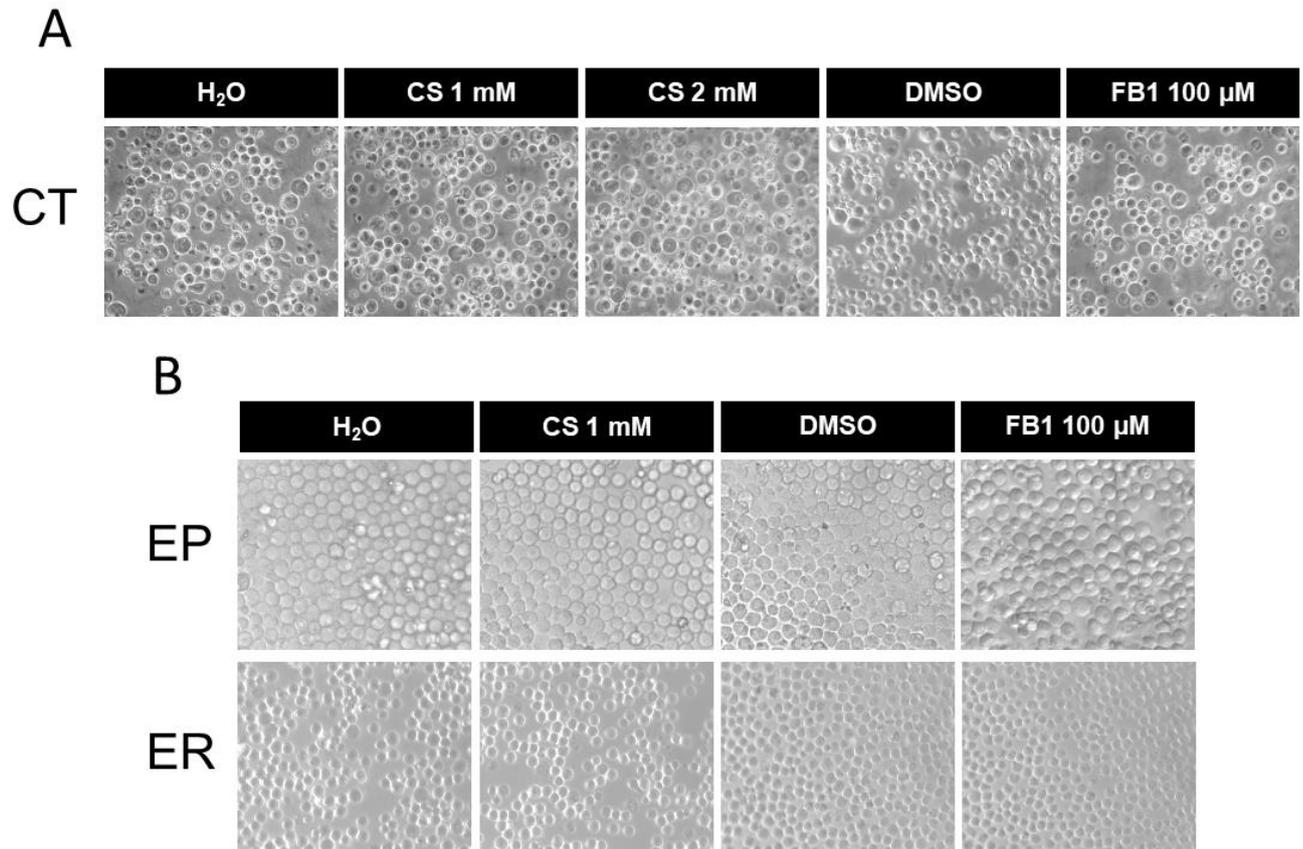


Figura 5. Morfología de células espermatogénicas en cultivo luego del tratamiento con inhibidores de la biosíntesis de esfingolípidos. Las células, tratadas con las concentraciones de L-cicloserina (CS) y de fumonisina B1 (FB1) que se indican, o con sus respectivos vehículos como controles (H₂O y DMSO), fueron incubadas en presencia de ³[H]16:0 durante 20 horas, al cabo de las cuales fueron observadas bajo el microscopio óptico. Aumento 400X. **A: CT.** Resultados similares (no mostrados) se observaron con 50 µM de FB1. **B:** Se muestran cultivos de **EP** y **ER**, luego de 20 horas de tratamientos similares a los que se expusieron las CT. No se observaron diferencias notorias en la morfología entre las células control y las expuestas a los inhibidores.

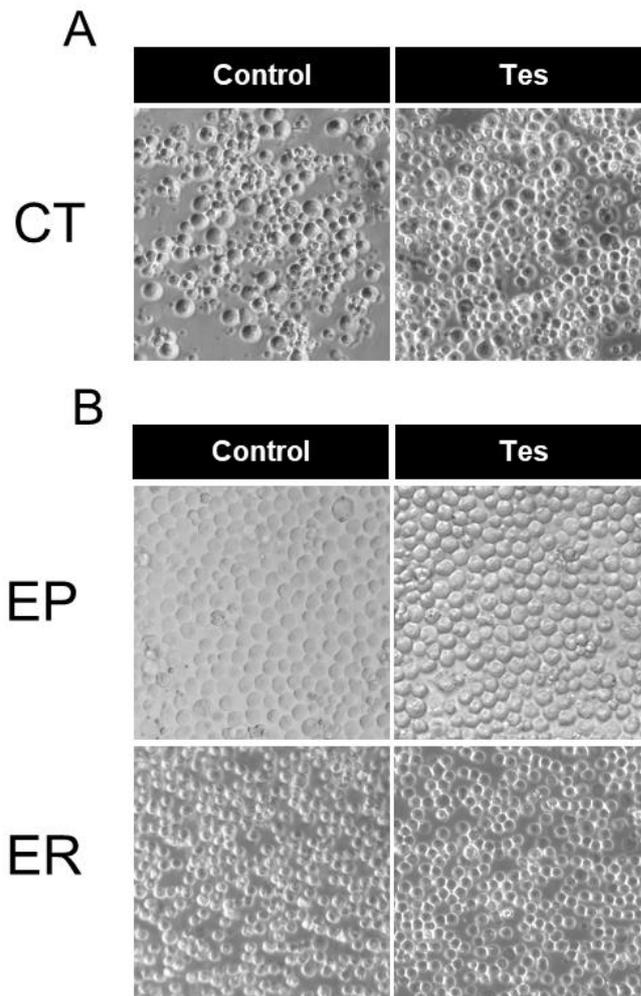


Figura 6. Morfología de células espermatogénicas en cultivo luego del tratamiento con testosterona (Tes). Emulando las condiciones en que se encontrarían durante los ensayos de biosíntesis de esfingolípidos, las células fueron tratadas con Tes 0.1 μM o su vehículo (etanol) como controles, en presencia de 16:0 no marcado, 2.5 μM . **A:** CT, incubadas durante 20 horas. **B:** EP y ER incubados durante 20 horas. No se observaron diferencias notorias en la morfología de las células controles y las expuestas a Tes. Aumento 400X.

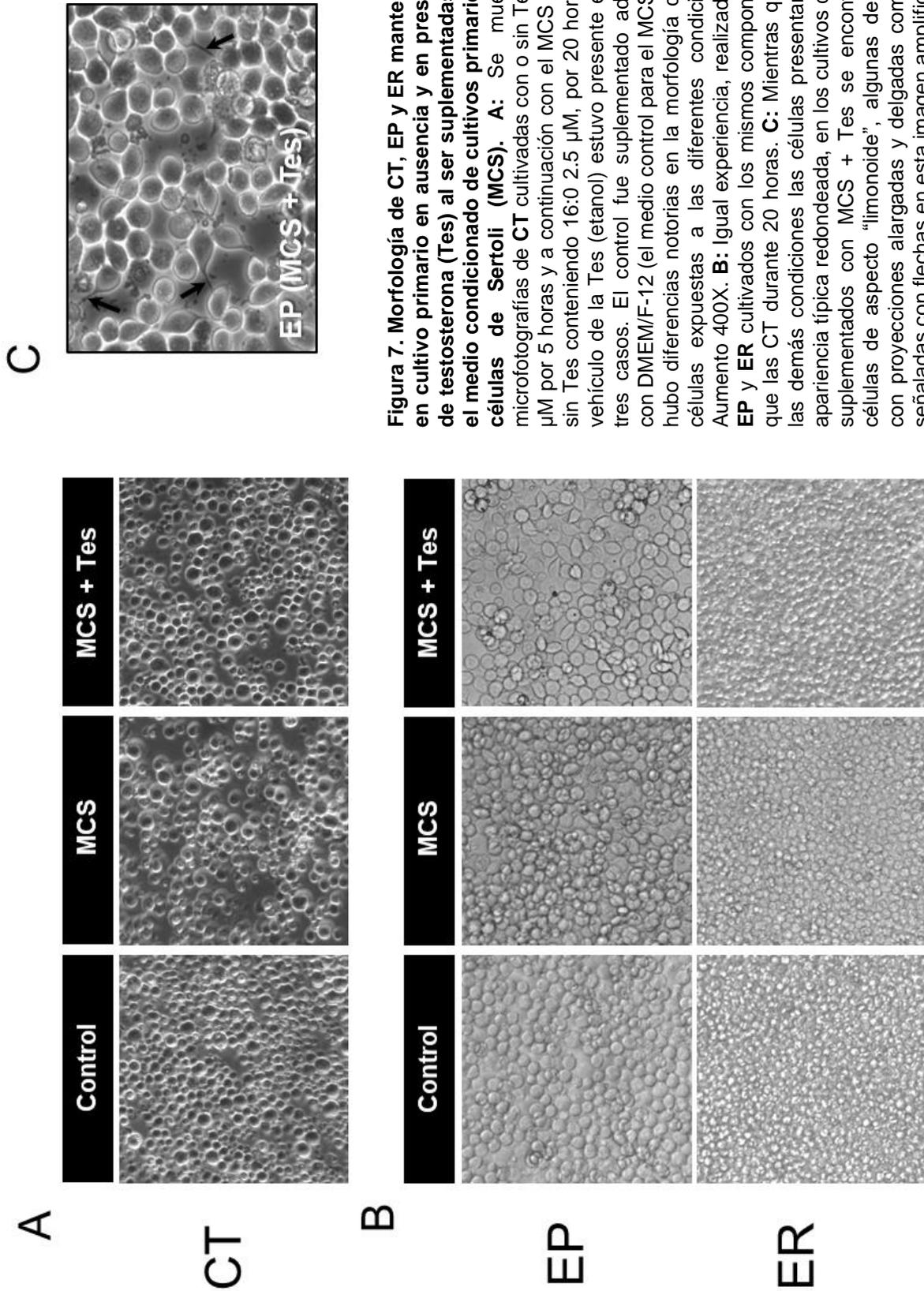


Figura 7. Morfología de CT, EP y ER mantenidas en cultivo primario en ausencia y en presencia de testosterona (Tes) al ser suplementadas con el medio condicionado de cultivos primarios de células de Sertoli (MCS). **A:** Se muestran microfotografías de CT cultivadas con o sin Tes 0.1 μ M por 5 horas y a continuación con el MCS con o sin Tes conteniendo 16:0 2.5 μ M, por 20 horas. El vehículo de la Tes (etanol) estuvo presente en los tres casos. El control fue suplementado además con DMEM/F-12 (el medio control para el MCS). No hubo diferencias notorias en la morfología de las células expuestas a las diferentes condiciones. Aumento 400X. **B:** Igual experiencia, realizada con EP y ER cultivados con los mismos componentes que las CT durante 20 horas. **C:** Mientras que en las demás condiciones las células presentaron la apariencia típica redondeada, en los cultivos de EP suplementados con MCS + Tes se encontraron células de aspecto "limonoide", algunas de ellas con proyecciones alargadas y delgadas como las señaladas con flechas en esta imagen ampliada.

Tabla 1. Comparación de la distribución de radioactividad proveniente del [³H]16:0 entre las células en estudio y los correspondientes medios, al culminar los cultivos en presencia de [³H]16:0.

Células	Medio	Células	
		Fase orgánica	Fase acuosa
CT (6.5%)	2056 ± 4.5 (93.5%)	132.3 ± 4.1 (91.9%)	11.7 ± 0.44 (8.1%)
EP (18.2%)	1799 ± 63 (81.8%)	392.5 ± 61.7 (98.0%)	8.2 ± 1.3 (2.0%)
ER (5.9%)	2070 ± 63 (94.1%)	114.7 ± 7.9 (88.5%)	15.1 ± 5.7 (11.5%)

Los cultivos conteniendo células espermatoogénicas totales (CT) por una parte, y poblaciones de espermatoocitos en paquiteno (EP) y espermátidas redondas (ER) por otra, se hicieron por separado. Cápsulas conteniendo 5×10^6 células en suspensión fueron incubadas durante 20 horas en presencia de $1 \mu\text{Ci}$ de [³H]16:0. Luego de centrifugar para recuperar el medio y sedimentar las células, se prepararon extractos lipídicos a partir de éstas. Al realizar la partición, se recuperaron por separado las fases orgánica y acuosa. Los datos (en dpm por cápsula $\times 10^{-3}$) representan valores medios \pm SD (n = 3).

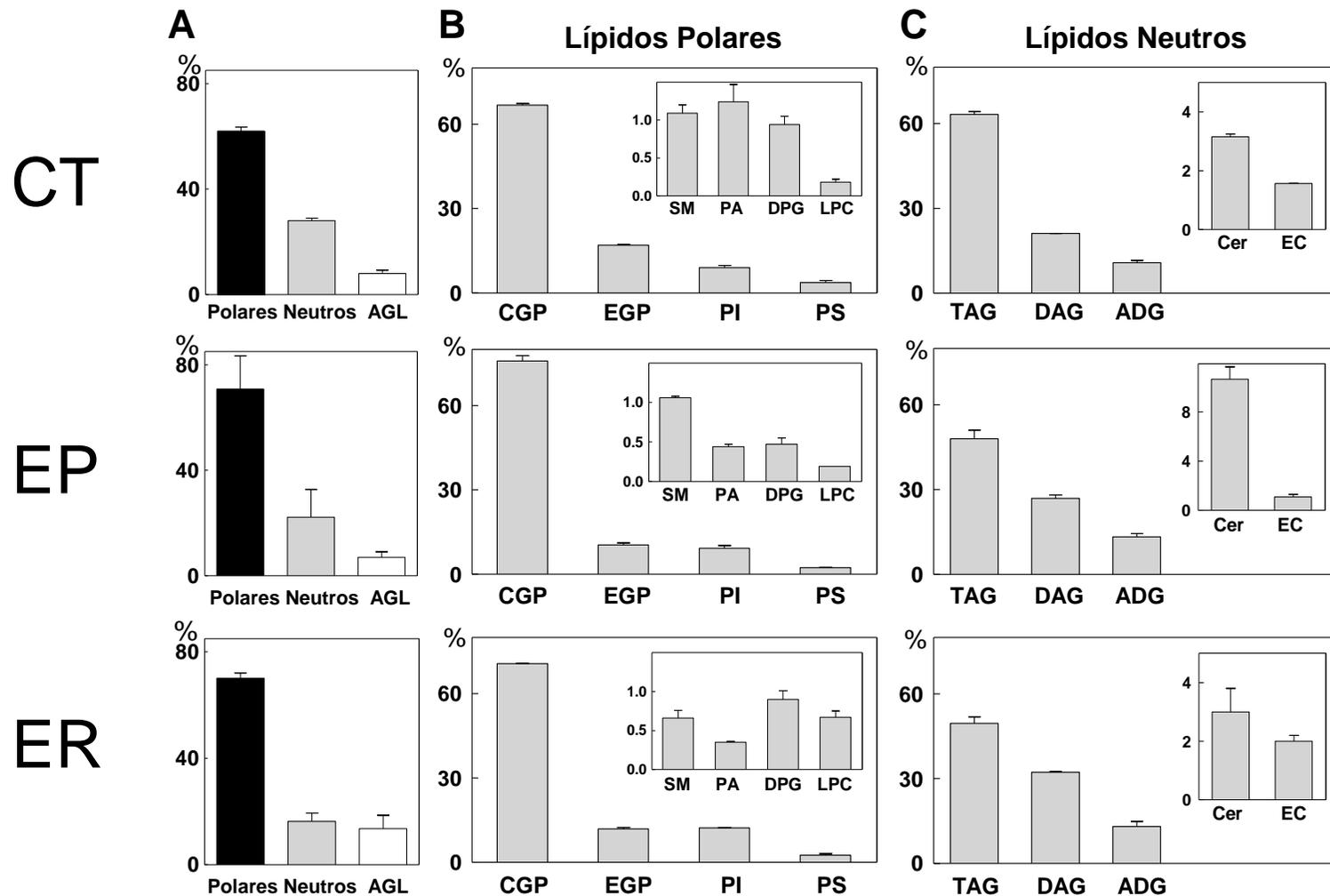


Figura 8. Distribución (%) de la marca de $[^3\text{H}]16:0$ incorporada en clases lipídicas de células espermatogénicas. Los datos se obtuvieron de los extractos lipídicos preparados a partir de cultivos realizados por separado, primero con las CT y luego con los EP y las ER. Luego de separar los lípidos por TLC, la radioactividad se determinó por LSC. **A:** Distribución entre lípidos polares y neutros, en comparación con el $[^3\text{H}]16:0$ que permaneció como ácido graso libre (AGL). **B:** Distribución porcentual de la marca incorporada en los fosfolípidos, CGP y EGP, glicerofosfolípidos de colina y de etanolamina, respectivamente; PI, fosfatidilinositol; PS, fosfatidilserina; SM, esfingomielina; PA, ácido fosfatídico; DPG, difosfatidilglicerol; LPC, lisofosfatidilcolina. **C:** Distribución porcentual de la marca incorporada en los lípidos neutros, TAG y DAG, triacil- y diacil-glicéridos, respectivamente; ADG, alquil-DAG; Cer, ceramidas; EC, ésteres de colesterol.

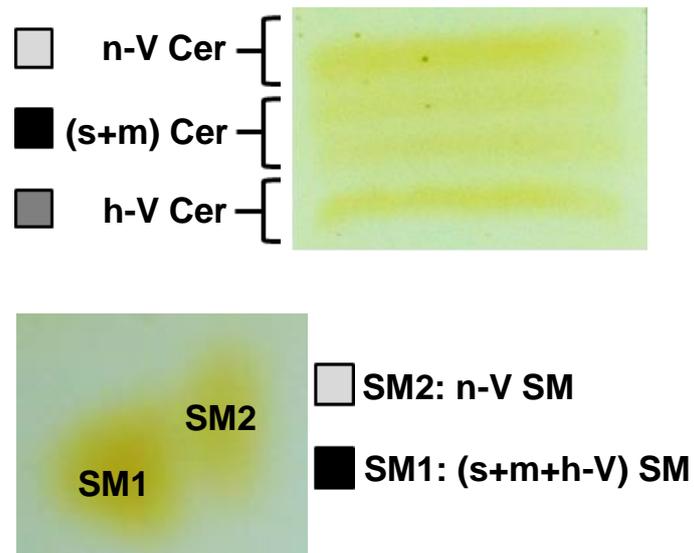


Figura 9. Separación de grupos de especies moleculares de Cer y de SM de células espermatogénicas por TLC. Se muestran ejemplos de la separación de las especies de Cer en estudio por TLC monodimensional y de las de SM por TLC bidimensional. Las letras indican especies moleculares que contienen ácidos grasos saturados (s), monoenoicos (m) y VLCPUFA no hidroxilados (n-V) y 2-hidroxilados (h-V), respectivamente.

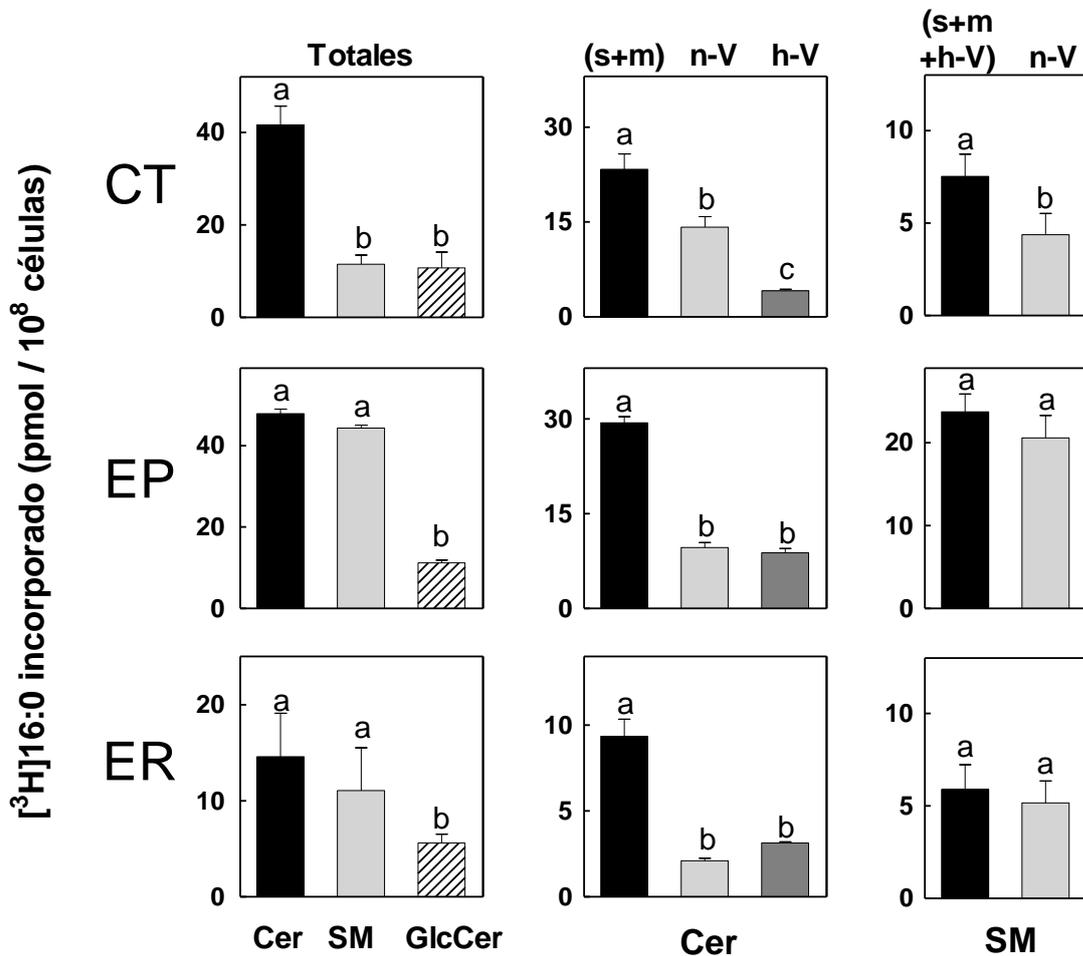


Figura 10. Incorporación de $[^3\text{H}]16:0$ en Cer, SM y GlcCer y distribución de lo incorporado entre especies de Cer y de SM de células espermatozógenas. Se prepararon extractos lipídicos a partir de CT, EP y ER cultivadas por separado durante 20 horas en presencia del $[^3\text{H}]16:0$. Luego de separar los esfingolípidos por TLC como se ilustra en la Fig.9, la radioactividad fue medida por LSC. Los resultados representan el contenido de $[^3\text{H}]16:0$ incorporado por 10^8 células (media \pm SD, n = 3). Letras diferentes (a-c) indican diferencias significativas ($p < 0.001$, ANOVA; para los subgrupos de SM $p < 0.01$, *t* de student). En ninguno de los tres lípidos se ha diferenciado lo incorporado en la esfingosina y en el correspondiente ácido graso.

Tabla 2. Efectos de dos concentraciones de L-cicloserina (CS) sobre la incorporación de [³H]16:0 en los esfingolípidos en estudio.

Concentración CS	Lípido total			Especies de Cer			Especies de SM	
	Cer	SM	GlcCer	(s+m) Cer	n-V Cer	h-V Cer	(s+m+h-V) SM	n-V SM
1 mM	62.6 ± 1.5	61.4 ± 5.4	64.1 ± 13.8	66.1 ± 10.6	62.2 ± 6.3	72.1 ± 4.8	50.1 ± 5.4	79.3 ± 5.3
2 mM	35.4 ± 0.3	20.0 ± 0.3	24.7 ± 0.9	41.4 ± 1.2	20.0 ± 1.1	54.3 ± 5.6	11.1 ± 2.1	34.0 ± 4.1

Las preparaciones de CT fueron preincubadas durante 5 horas en presencia de cada una de las dos concentraciones de L-cicloserina indicadas, y a partir de allí, incubadas con [³H]16:0 durante 20 horas en la continua presencia de CS. Se prepararon extractos lipídicos a partir de las células, los lípidos y los grupos de especies moleculares se separaron mediante TLC, y la marca en [³H] incorporada se contó mediante LSC. (s+m) Cer, especies de Cer con AG saturados y monoenoicos; (s+m+h-V) SM, especies de SM con AG saturados, monoenoicos y VLCPUFA 2-hidroxilados. Los resultados se expresan como porcentajes con respecto al control sin CS, al cual se le asignó el valor de 100%, del [³H]16:0 incorporado en cada caso. Todas las diferencias con respecto al control fueron significativas (**p<0.01).

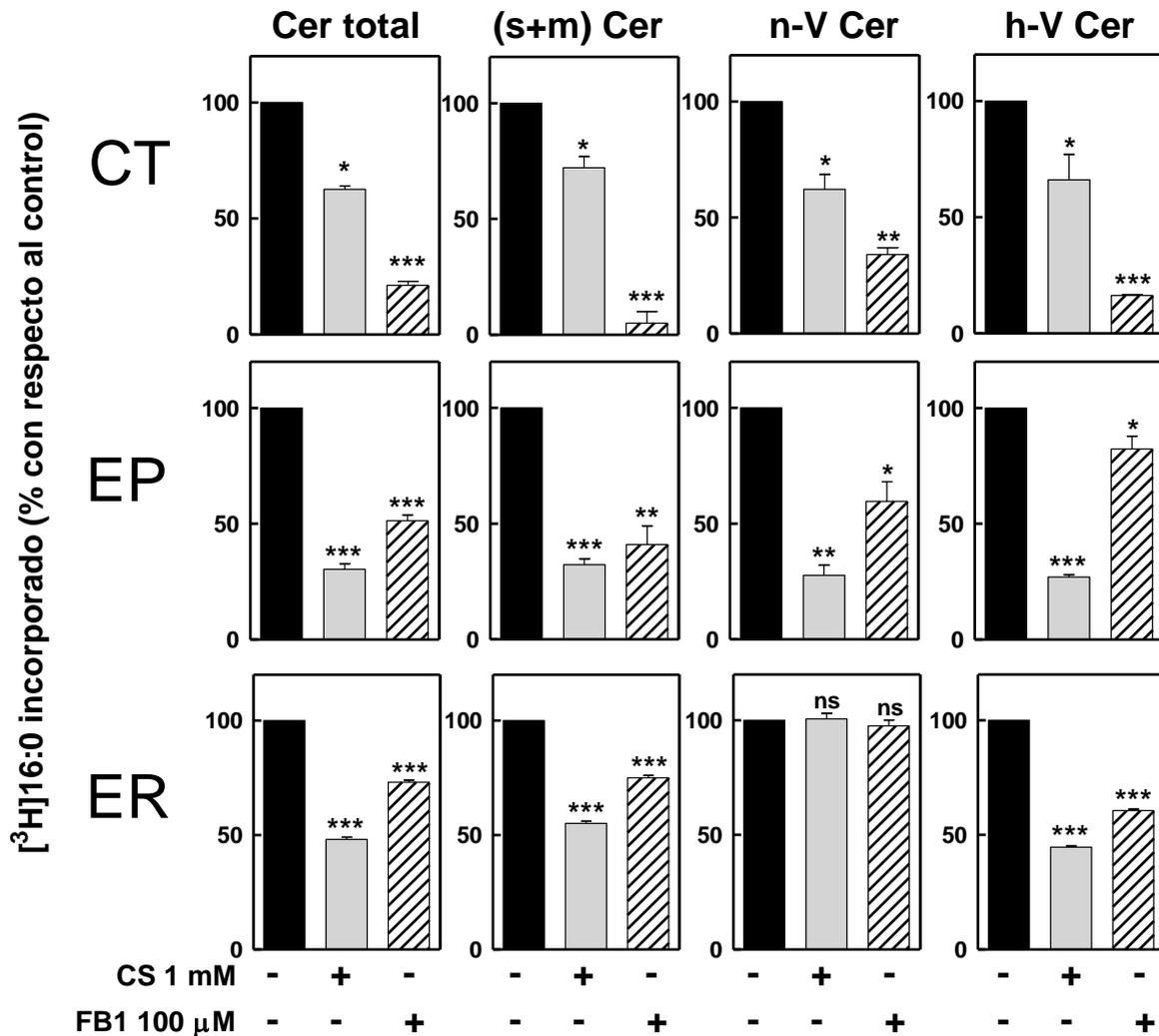


Figura 11. Efectos inhibitorios de la L-cicloserina (CS) y de la fumonisina B1 (FB1) sobre la incorporación de $[^3\text{H}]16:0$ en especies de $[^3\text{H}]$ Cer de células espermatogénicas. Las preparaciones de CT, EP y ER fueron preincubadas durante 5 horas en presencia de CS (barras grises) o FB1 (barras rayadas) a las concentraciones indicadas, y a partir de allí incubadas con $[^3\text{H}]16:0$ durante 20 horas en la continua presencia de CS o FB1. Los controles (barras negras) contuvieron los respectivos vehículos (H_2O o DMSO). Las especies de Cer se separaron por TLC y su marca en $[^3\text{H}]$ se contó mediante LSC. Cer total, ceramida total; (s+m) Cer, Cer con AG saturados y monoenoicos; n-V Cer, y h-V Cer, Cer con VLCPUFA no hidroxilados y 2-hidroxilados, respectivamente. Los resultados se expresan como porcentajes con respecto al control sin inhibidor, al cual se le asignó el valor de 100% (media \pm SD, $n = 3$). Los asteriscos indican diferencias significativas con relación a los respectivos controles (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$); ns, diferencias no significativas.

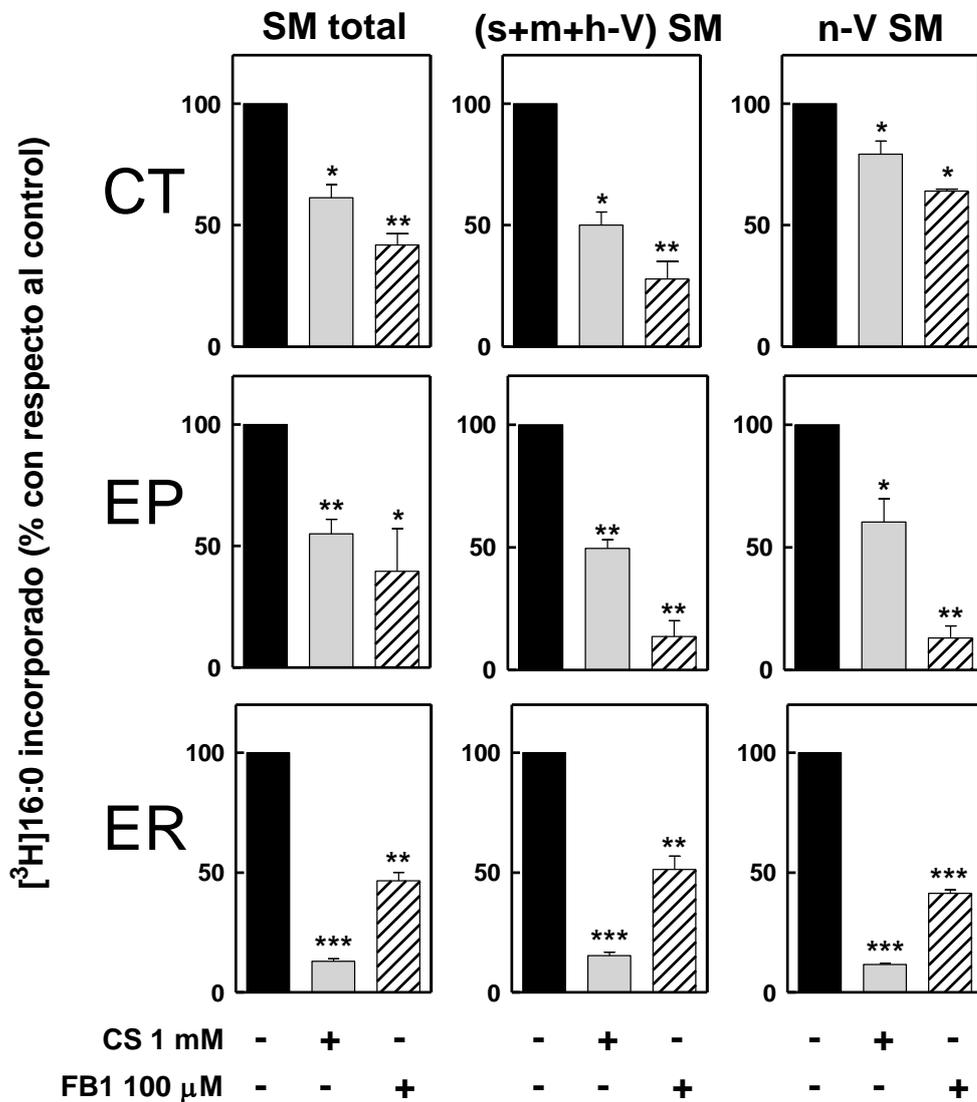


Figura 12. Efectos inhibitorios de la L-cicloserina (CS) y de la fumonisina B1 (FB1) sobre la incorporación de $[^3\text{H}]16:0$ en especies de $[^3\text{H}]$ SM de células espermatogénicas. Las preparaciones de CT, EP y ER fueron preincubadas durante 5 horas en presencia de los inhibidores o de sus respectivos vehículos (controles, barras negras; CS barras grises; FB1, barras rayadas) y a partir de allí incubadas con $[^3\text{H}]16:0$ durante 20 horas en la continua presencia del vehículo, CS o FB1. Las especies de SM se separaron mediante TLC y su marca en $[^3\text{H}]$ se contó mediante LSC. SM total, esfingomielina total; (s+m+h-V) SM, SM con AG saturados, monoenoicos y VLCPUFA 2-hidroxilados; n-V SM, SM con VLCPUFA no hidroxilados. Los resultados se expresan como porcentajes con respecto al control sin inhibidor, al cual se le asignó el valor de 100% (media \pm SD, n = 3). Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al control (* p < 0.05; ** p < 0.01, *** p < 0.001).

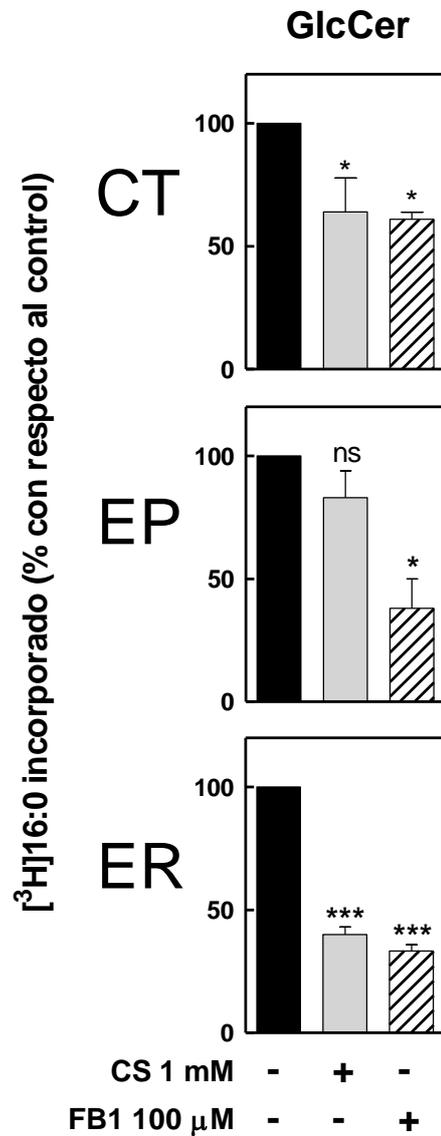


Figura 13. Efectos inhibitorios de la L-cicloserina (CS) y la fumonisina B1 (FB1) sobre la biosíntesis *de novo* de $[^3\text{H}]\text{GlcCer}$ a partir de $[^3\text{H}]\text{16:0}$ en CT, EP y ER en cultivo. Los resultados se expresan como la media \pm SD del porcentaje de $[^3\text{H}]\text{16:0}$ incorporado en la GlcCer respecto al correspondiente control (vehículo) sin inhibidor, al cual se le asignó el valor 100%. Los asteriscos indican diferencias significativas (* $p < 0.05$, * $p < 0.001$) y ns, no significativas, con respecto al control.**

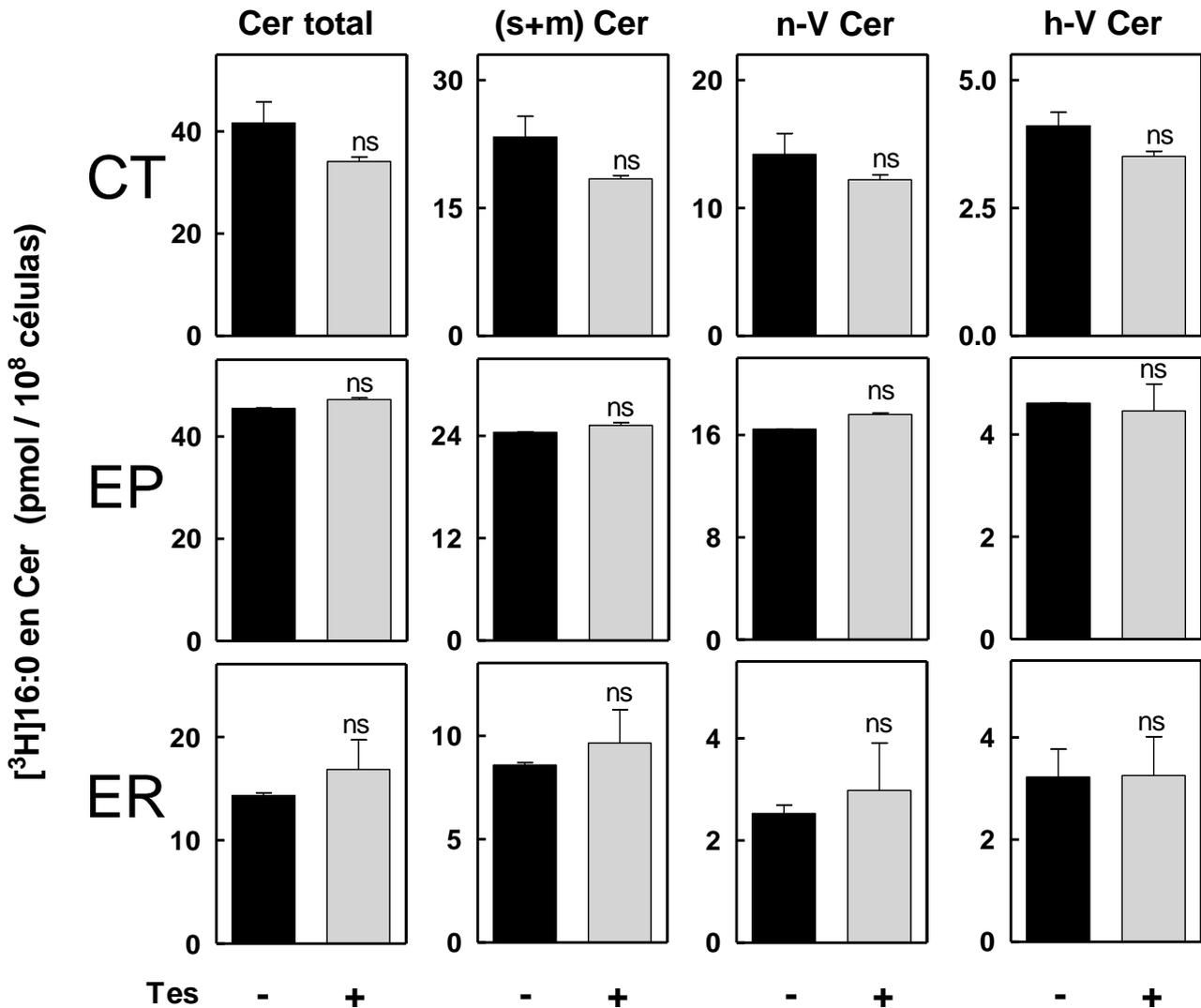


Figura 14. Efectos de la testosterona (Tes) sobre la incorporación de $[^3\text{H}]16:0$ en la Cer de células espermatogénicas. Las células (CT, EP, ER) experimentales y controles fueron pre-incubadas con Tes $0.1 \mu\text{M}$ o su vehículo (etanol), respectivamente, por 5 horas y luego cultivadas con $[^3\text{H}]16:0$ durante 20 horas en la continua presencia de la hormona o el vehículo. La Cer y sus especies se separaron como se indica en la Fig. 9 y el $[^3\text{H}]$ incorporado en ellas se cuantificó por LSC. Los resultados se expresan en pmoles de $[^3\text{H}]16:0$ incorporados en Cer de 10^8 células germinales, como valores medios \pm SD ($n = 3$). La Tes no ejerció ningún efecto sobre la síntesis de Cer en las células, ya que no se hallaron diferencias significativas con respecto al control (ns).

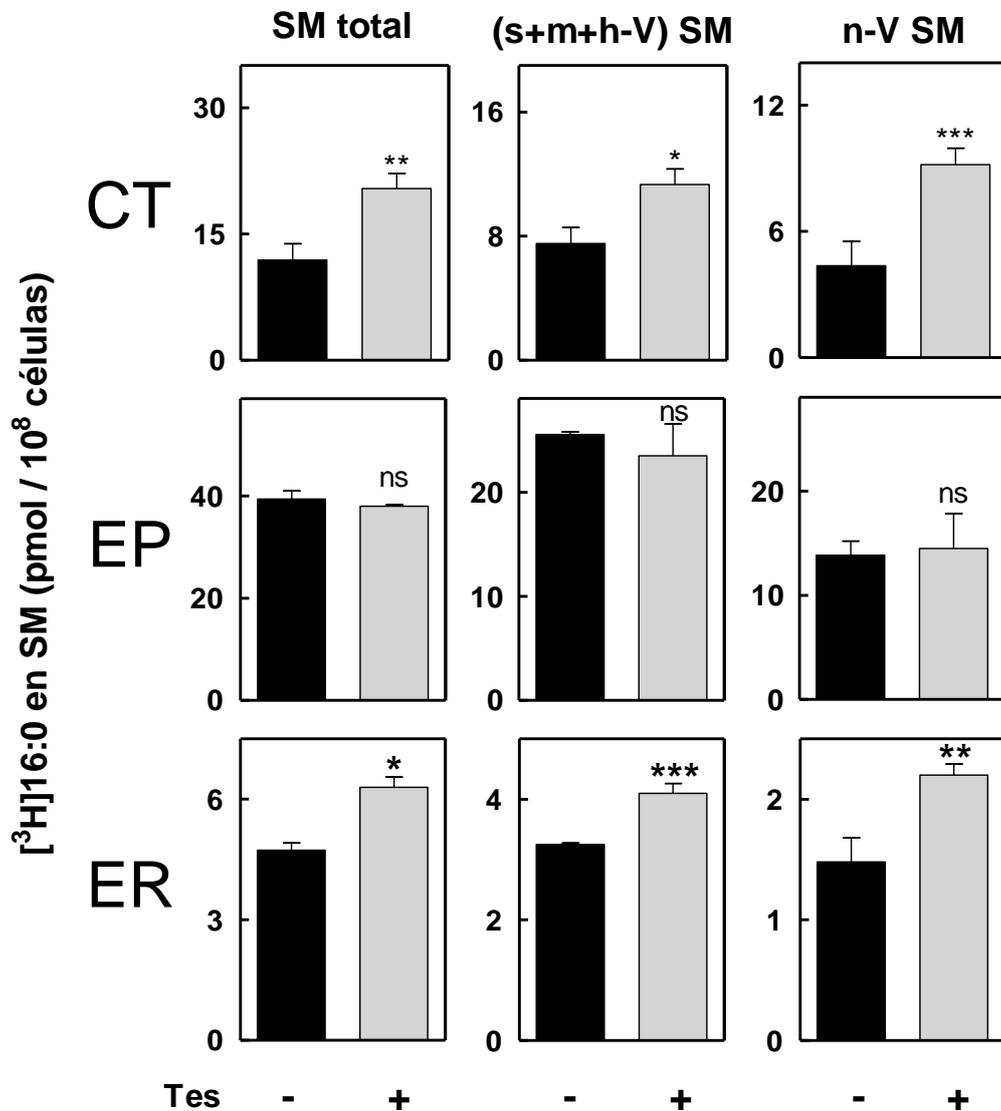


Figura 15. Efecto de la suplementación con testosterona (Tes) sobre la incorporación de $[^3\text{H}]16:0$ en la SM de células espermatozógenas. Las células (CT, EP, ER) experimentales y controles fueron pre-incubadas con Tes $0.1 \mu\text{M}$ o su vehículo (etanol), respectivamente, por 5 horas y luego cultivadas con $[^3\text{H}]16:0$ durante 20 horas en la continua presencia de la hormona o el vehículo. La SM y sus especies se separaron como se muestra en la Fig. 9 y el $[^3\text{H}]$ incorporado en ellas se cuantificó por LSC. Los resultados se expresan en pmoles de $[^3\text{H}]16:0$ incorporados en SM de 10^8 células germinales, como valores medios \pm SD ($n = 3$). Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al control (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$); ns, diferencias no significativas. La Tes estimuló significativamente la biosíntesis de SM en las ER (no así en los EP), con importante contribución de las especies n-V SM.

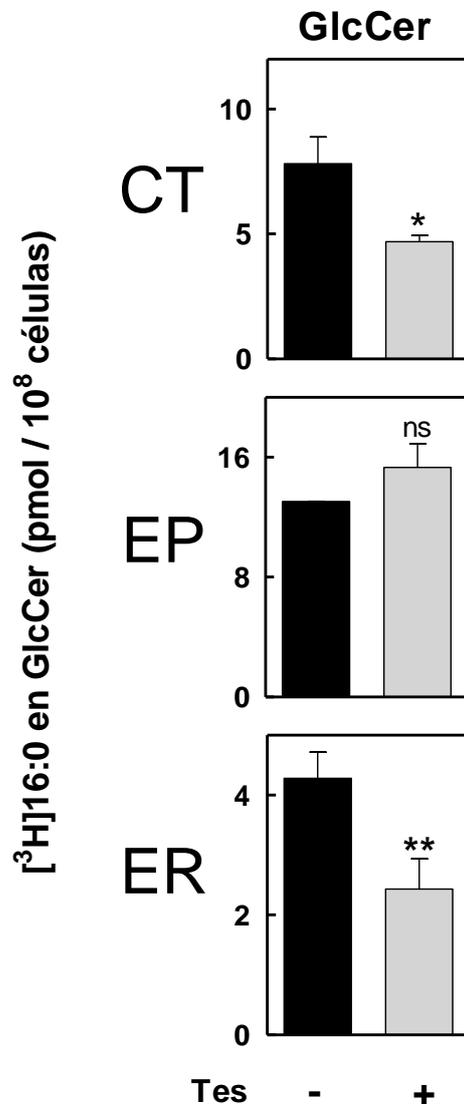


Figura 16. Efecto de la suplementación con testosterona (Tes) sobre la incorporación de [³H]16:0 en la glucosilceramida (GlcCer) de células espermatogénicas. Las células (CT, EP, ER) experimentales y controles fueron pre-incubadas con Tes 0.1 μ M o su vehículo (etanol), respectivamente, por 5 horas y luego cultivadas con [³H]16:0 durante 20 horas en la continua presencia de la hormona o el vehículo. La GlcCer se separó por TLC y la marca en ella se contó por LSC. Los resultados se expresan como la media \pm SD de los pmoles de [³H]GlcCer recuperados de 10⁸ células germinales. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al control (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$); ns, diferencias no significativas. En contraste con la biosíntesis de SM, la de GlcCer fue inhibida por la Tes en las ER.

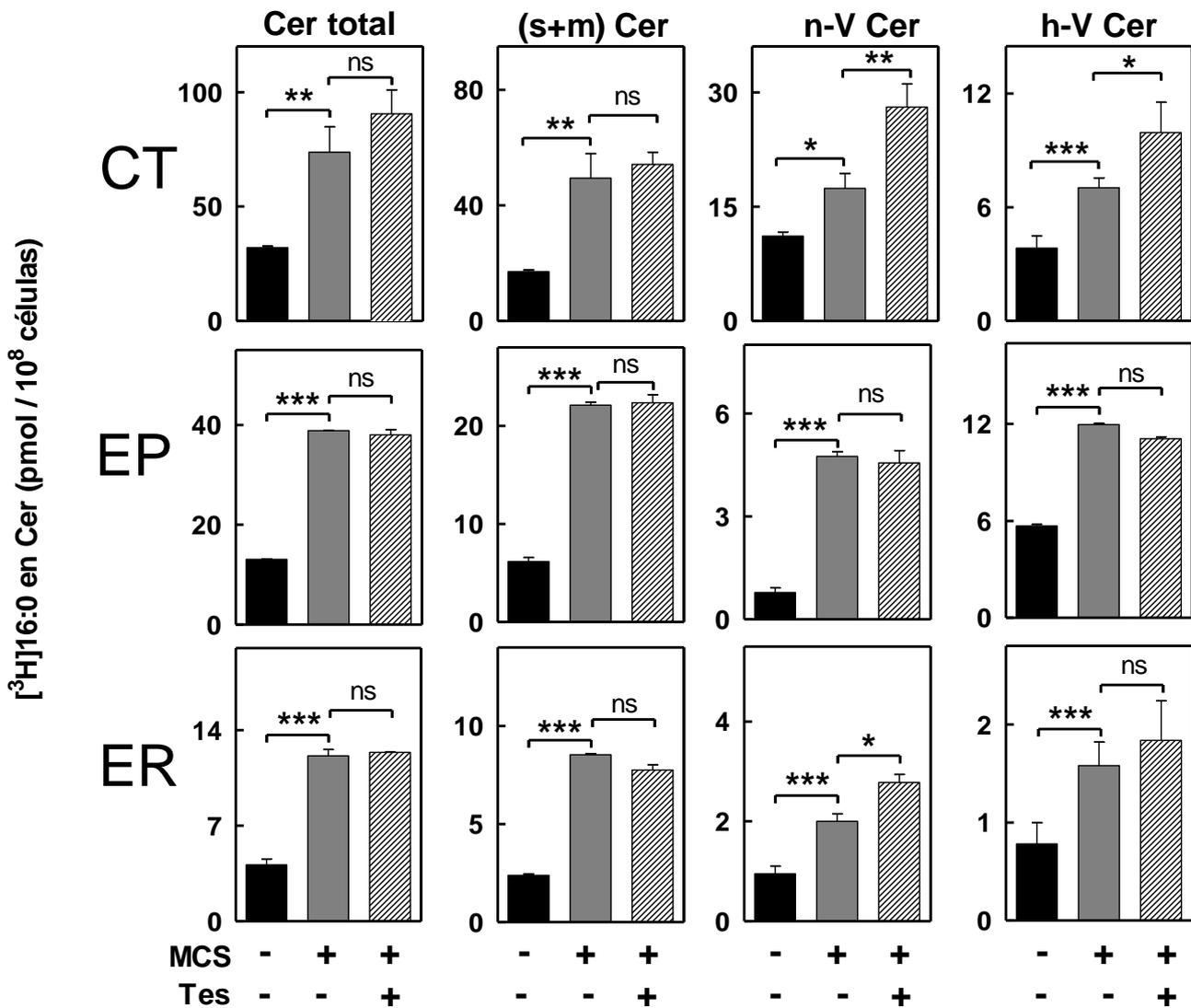


Figura 17. Estímulo de la biosíntesis de Cer en cultivos de CT, EP y ER al suplementarlos con medio condicionado de células de Sertoli (MCS) en ausencia y en presencia de Tes. Las células experimentales y controles fueron pre-incubadas con Tes 0.1 μ M o su vehículo (etanol) por 5 horas. En ese momento se suplementaron con el medio MCS o su control (medio DMEM/F-12) junto con el $[^3\text{H}]16:0$, y se cultivaron durante 20 horas en la continua presencia de la Tes o de su vehículo etanol. La Cer y sus especies se separaron por TLC como en la Fig. 9, y lo incorporado en ellas se cuantificó por LSC. Los resultados se expresan en pmoles de $[^3\text{H}]$ Cer biosintetizados por 10^8 células germinales (valores medios \pm SD, $n = 3$). Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al correspondiente control (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$); ns, diferencias no significativas, test t de student.

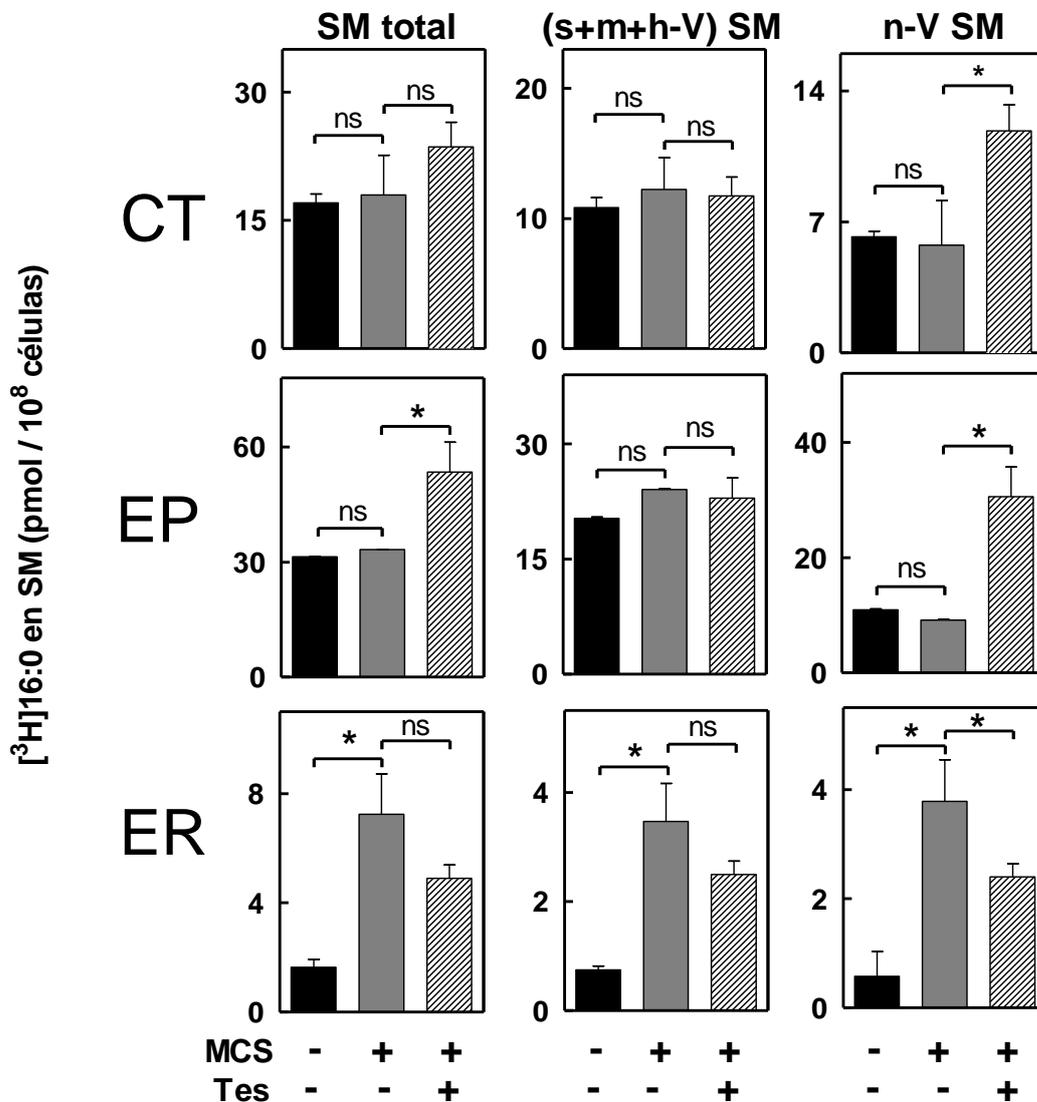


Figura 18. Efectos de la suplementación con medio condicionado de cultivos de células de Sertoli (MCS) y testosterona (Tes) sobre la biosíntesis de SM a partir de $[^3\text{H}]16:0$ en células espermatogénicas. Las células experimentales y controles fueron preincubadas con Tes $0.1 \mu\text{M}$ o su vehículo (etanol) por 5 horas. En ese momento se suplementaron con el medio MCS o su control (medio DMEM/F-12) junto con el $[^3\text{H}]16:0$, y ambos grupos se cultivaron durante 20 horas en la continua presencia de la Tes o de su vehículo etanol. Se extrajeron los lípidos, se aisló la SM y los dos grupos de especies de SM por TLC, y se midió la radioactividad por LSC. Los resultados se expresan en pmoles de $[^3\text{H}]\text{SM}$ incorporados en cada caso por 10^8 células germinales (valores medios \pm SD, $n = 3$). Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al correspondiente control (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$); ns, diferencias no significativas, test t de student.

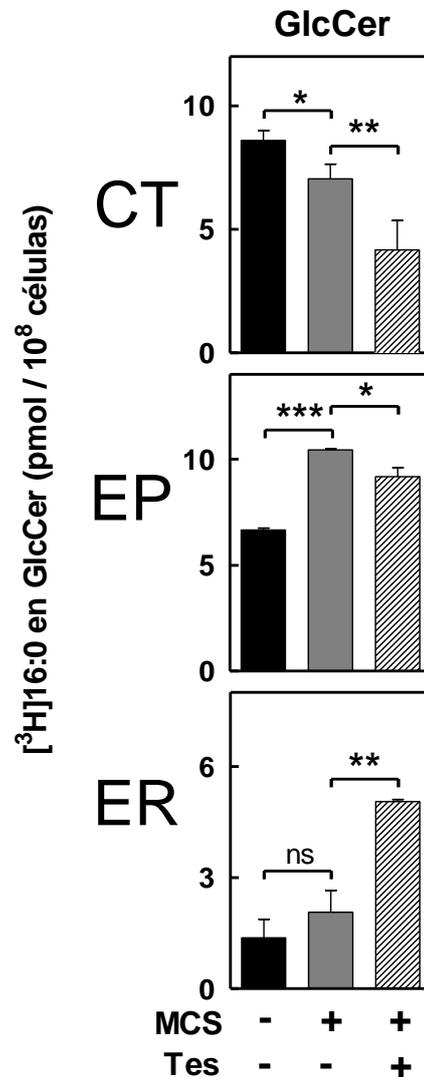


Figura 19. Efectos de la suplementación con medio condicionado de cultivos de células de Sertoli (MCS) y testosterona (Tes) sobre la biosíntesis de GlcCer a partir de [³H]16:0 en células espermatogénicas. Las células experimentales y controles fueron preincubadas con Tes 0.1 μ M o su vehículo (etanol) por 5 horas. En ese momento se suplementaron con el medio MCS o su control (medio DMEM/F-12) junto con el [³H]16:0, y ambos grupos se cultivaron durante 20 horas en la continua presencia de la Tes o de su vehículo etanol. Se extrajeron los lípidos, se aisló la GlcCer y se midió la radioactividad incorporada por LSC. Los resultados se expresan en pmoles de [³H]GlcCer incorporados en cada caso por 10⁸ células germinales (valores medios \pm SD, n = 3). Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al correspondiente control (* p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001); ns, diferencias no significativas, test *t* de student.

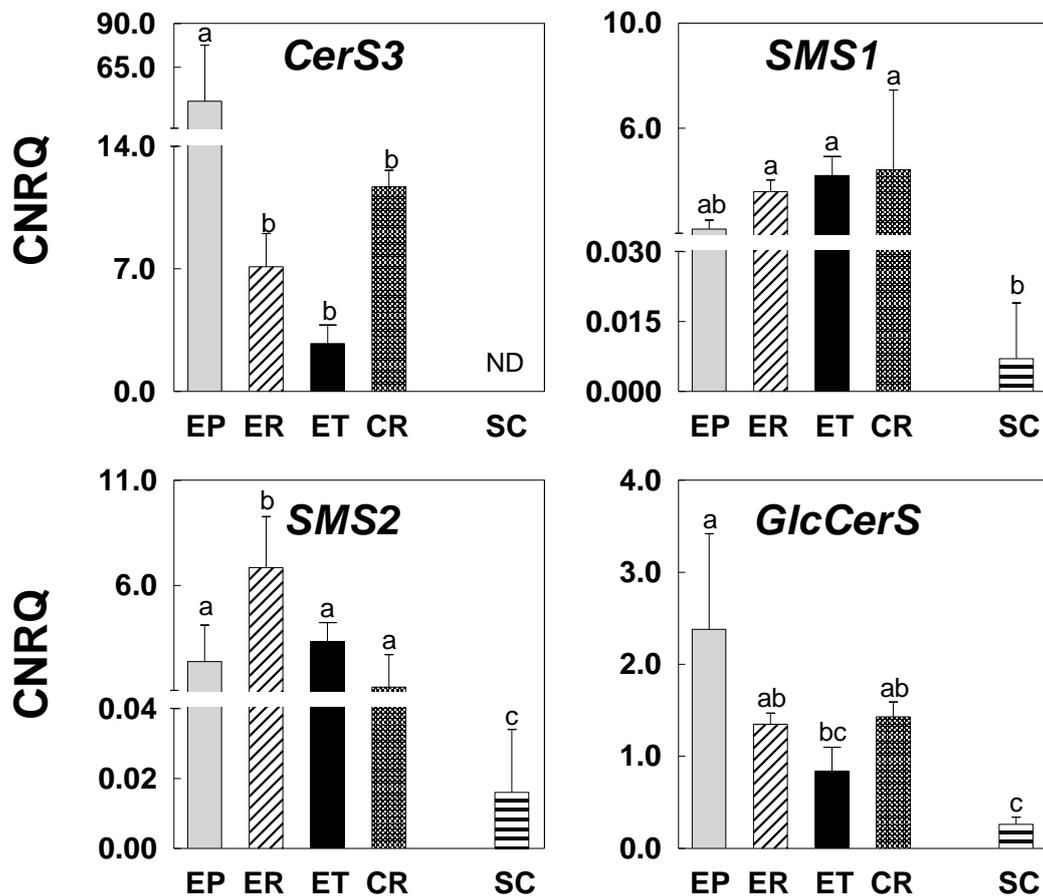


Figura 20. Niveles de expresión del ARNm de *CerS3*, *SMS1*, *SMS2* y *GlcCerS* en células aisladas de túbulos seminíferos de rata. Se analizaron EP y ER en comparación con espermátidas tardías (ET) y cuerpos residuales (CR) y se incluyeron las células somáticas de Sertoli (SC). Los datos se muestran como cantidades relativas normalizadas del transcrito en unidades arbitrarias (CNRQ \pm SEM), determinadas mediante RT-qPCR como se explica en la sección Materiales y Métodos. Es de destacar la elevada expresión de *CerS3* en los EP y de *SMS2* en las ER. Las SC contuvieron los niveles de ARNm más bajos para los cuatro genes. Letras diferentes (a-c) indican diferencias significativas entre los distintos tipos celulares ($p < 0.05$, ANOVA). ND, no detectable.

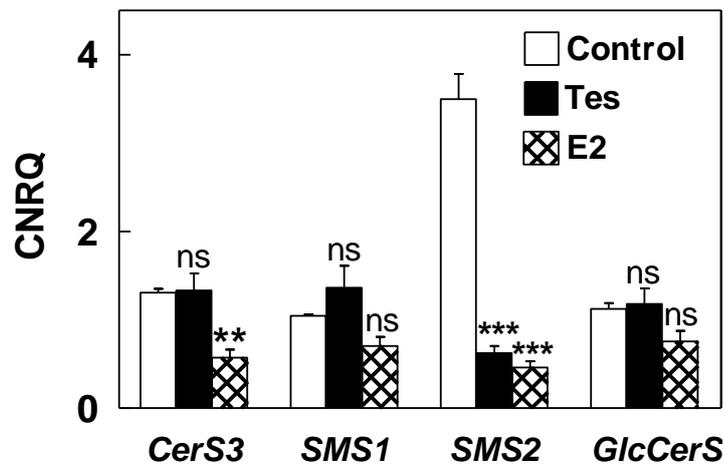


Figura 21. Efecto de hormonas esteroidales sobre los niveles de expresión de *CerS3*, *SMS1*, *SMS2* y *GlcCerS* en células espermatogénicas. Las células (CT) fueron incubadas durante 5 horas con 0.1 μM de testosterona (Tes), o 0.1 μM estradiol (E2), o su vehículo (etanol) como control en presencia de 16:0 2.5 μM . Los niveles de ARNm se cuantificaron por RT-qPCR, y los datos se muestran como cantidades relativas normalizadas del transcrito en unidades arbitrarias (CNRQ \pm SEM). Se aplicó el *test* ANOVA de dos vías, con posterior *test* de Bonferroni. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al control para cada gen (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$); ns, diferencias no significativas.

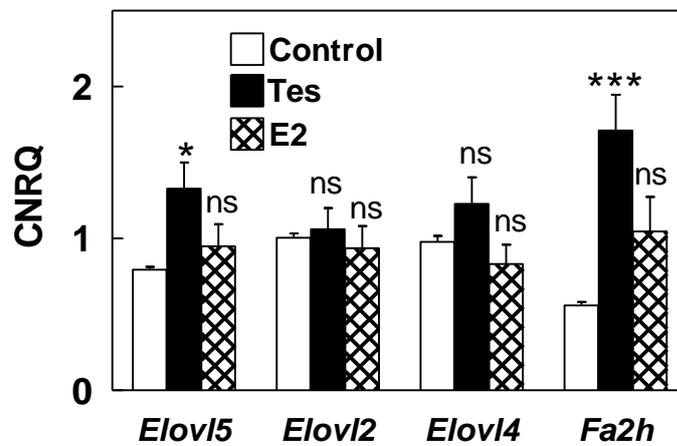


Figura 22. Efecto de hormonas esteroidales sobre los niveles de expresión de *Elov15*, *Elov12*, *Elov14* y *Fa2h* en células espermatogénicas. Las células fueron tratadas y los ARNm fueron cuantificados como se indica en la Fig. 21. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al control (conteniendo el vehículo etanol) para cada gen (*, $p < 0.05$; *** $p < 0.001$); ns, diferencias no significativas.

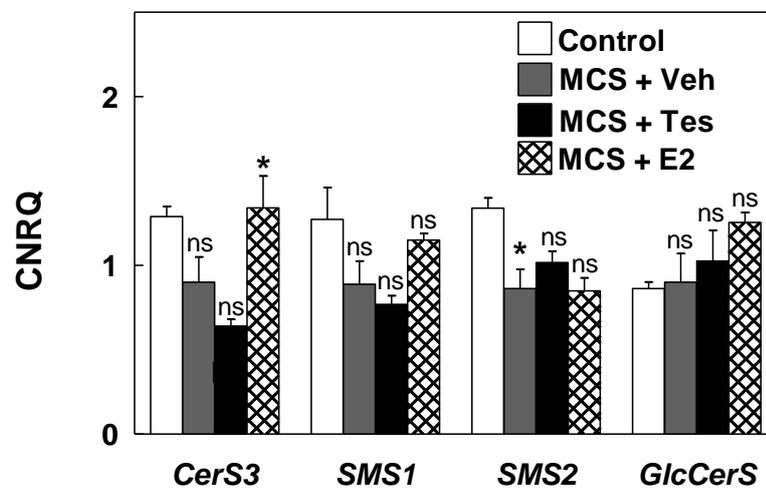


Figura 23. Efecto de la suplementación con medio condicionado de cultivos de células de Sertoli (MCS) más hormonas esteroidales sobre los niveles de expresión de *CerS3*, *SMS1*, *SMS2* y *GlcCerS* en células espermatozógenas. Las células fueron incubadas durante 5 horas luego de ser suplementadas con medio DMEM/F-12 (medio control del MCS) o MCS, éste sin agregados o conteniendo 0.1 μM de testosterona (Tes) o 0.1 μM de 17- β -estradiol (E2). En los cuatro casos estaban presentes el vehículo de éstas (etanol) y 2.5 μM de 16:0. Los niveles de ARNm se cuantificaron por RT-qPCR, y los resultados se muestran como cantidades relativas normalizadas de cada transcrito en unidades arbitrarias (CNRQ \pm SEM). Se aplicó el *test* ANOVA de dos vías, con posterior *test* de Bonferroni (* $p < 0.05$); ns, diferencias no significativas.

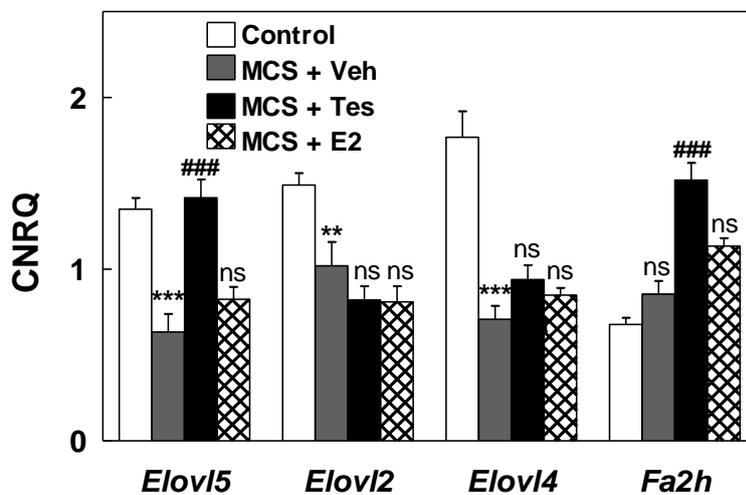


Figura 24. Efecto de la suplementación con medio condicionado de cultivos de células de Sertoli (MCS) y hormonas esteroidales sobre los niveles de expresión de *Elov15*, *Elov12*, *Elov14* y *Fa2h* en células espermatogénicas. Las células fueron tratadas y los ARNm fueron cuantificados como se indica en la Fig. 23. ** $p < 0.01$; *** y ###, $p < 0.001$, indican diferencias significativas con respecto al correspondiente control; ns, diferencias no significativas.

DISCUSIÓN

I. ESFINGOMIELINAS Y CERAMIDAS CON n-V Y h-V: DISTRIBUCIÓN EN LAS MEMBRANAS DE CÉLULAS ESPERMATOGÉNICAS EN DIFERENCIACIÓN

En este capítulo de la tesis el objetivo fue caracterizar la distribución de especies moleculares de SM y Cer entre fracciones de membrana obtenidas a partir de células espermatoogénicas en tres estadios de su diferenciación: EP, ER y ET, eligiendo para ello un método de fraccionamiento libre de detergente. El análisis integrado de diferentes proteínas marcadoras y de componentes lipídicos permitió determinar que dicho método, basado en diferencias de densidad en gradientes de sacarosa, fue el adecuado para obtener, a partir de cada tipo celular, dos fracciones principalmente representativas de la membrana plasmática (ML y MP) y una fracción que abarcaba membranas de origen intracelular (MEP).

La diminuta fracción de más baja densidad, ML, contuvo la mayor concentración de proteínas características de *rafts*, como lo son la flotilina-1 y la caveolina-1, y presentó la mayor actividad de la enzima 5' nucleotidasa, indicando que estaba enriquecida en dominios tipo *raft/caveolas* derivados principalmente de la membrana plasmática. La varias veces mayor fracción MP, por su parte, fue la única en contener al receptor de la transferrina (TfR), una proteína marcadora de dominios *no-raft* de la membrana plasmática. Esta proteína receptora es funcionalmente importante en todas las células, ya que sirve para incorporar el hierro unido a la transferrina, y es particularmente importante en las células germinales en el espacio adluminal (EP, ER, ET), a las que la transferrina les es proporcionada por las células de Sertoli (Janecki *et al.*, 1988; Le Magueresse *et al.*, 1988; Gelly *et al.*, 1994). Por otra parte, proteínas que se sabe están localizadas en el retículo endoplásmico (como la calnexina y el GPR30), cuyas membranas (junto con las de otras membranas y organelas intracelulares incluyendo el Golgi) fueron constituyentes importantes de la fracción MEP, estuvieron ausentes de las fracciones ML y MP, por lo que estas dos últimas cumplieron varios requisitos para que pudieran considerarse principalmente derivadas de las membranas plasmáticas de las células.

Un hallazgo que fue común a todas las células espermatoogénicas, independientemente de su estadio de maduración, fue que la mayor parte de las especies de SM y de Cer que contienen VLCPUFA (n-V y h-V) en la membrana plasmática estuvieron concentradas en la fracción MP, esto es, fueron casi totalmente *excluidas* de las fracciones de membrana ML conteniendo los microdominios tipo *raft*. Tanto la SM como las cantidades prácticamente indetectables de Cer que estaban presentes en esta pequeña fracción contenían, en contraste, especies moleculares con 16:0 como su ácido graso principal.

Cuando se aplicó el procedimiento clásico de separar las fracciones de membrana "resistentes a la solubilización en detergente" (DRM) y "solubles en detergente" (DSM) a

células espermatogénicas totales utilizando Tritón X-100 a 4°C, los resultados mostraron una tendencia similar, en el sentido de que la fracción DRM resultó comparativamente más rica en especies moleculares de SM con AG saturados que la fracción DSM. Nuestros datos, por ambos métodos, por lo tanto confirman que las especies de SM con 16:0 “prefieren” estar localizadas en la fracción de membranas conteniendo los dominios tipo *raft*, mientras las SM con n-V y h-V tienden a ser minoritarias en ellos. Desde el grupo de trabajo de Sandhoff, se reportó un hallazgo similar para los glucoesfingolípidos fucosilados (FGSL) de CG de ratón (Sandhoff *et al.*, 2005). Así, empleando solubilización con Tritón X-100 seguida de ultracentrifugación, y marcación de la caveolina, estos autores concluyeron que los FGSL que contienen AG saturados están incluidos, mientras los FGSL que contienen VLCPUFA están excluidos, de los *rafts*.

En células en cada uno de los tres estadios examinados en el presente estudio, la distribución lateral de las especies de GPL entre ML y MP siguió una tendencia similar a la de la SM, ya que los GPL de las ML fueron ricos en especies con AG saturados, mientras los de las MP lo fueron en los principales PUFA (20:4n-6, 22:5n-6). Por lo tanto, las presentes fracciones de membrana tipo *raft*, independientemente del estado de diferenciación, fueron “típicas” en el sentido de que en su composición contenían colesterol y especies de SM y GPL con AG saturados.

Al comparar las fracciones de membrana ML y MP en el sentido EP → ER → ET, se hizo evidente que los cambios que *caracterizan* a la diferenciación celular en las células espermatogénicas de rata, esto es, el incremento de las relaciones 22:5n-6 / 20:4n-6 en GPL y h-V / n-V en SM y en Cer (Beckman *et al.*, 1978; Oresti *et al.*, 2010b), tienen lugar principalmente en la porción *no-raft* de la membrana plasmática. Las estructuras tipo *raft* permanecieron bastante constantes en la composición de AG de sus lípidos durante la maduración celular. Esta estabilidad es funcionalmente razonable, si se tiene en cuenta que los *rafts* son asociaciones de lípidos que forman plataformas que funcionan en procesos celulares tan comunes y esenciales para todas las células como lo es por ejemplo, la transducción de señales, la cual se espera que en general sea conservada independientemente de la edad o del estado de diferenciación. Nuestros resultados sugieren que en la región *no-raft* de la membrana plasmática es donde tiene lugar el mayor dinamismo en cuanto a la remodelación de lípidos que ocurre en las células espermatogénicas durante su desarrollo y maduración.

Altos niveles de colesterol y de SM son características esperables de los microdominios de membrana llamados "*rafts*" (Brown y Rose, 1992). De acuerdo con lo esperado, la concentración por microgramo de proteína de SM fue mayor en las ML que en las MP de las tres células. Un hallazgo inicialmente intrigante al comparar las fracciones ML

y MP en cada estadio celular fue que la *concentración* de colesterol por microgramo de proteína fue mayor en las ML que en las MP solamente en los espermatoцитos, mientras lo contrario ocurrió en las dos espermátidas, donde dicha concentración fue *mayor* en las MP que en las ML (Fig. 12). Otro hecho contrario a nuestras expectativas iniciales fue que, en la fracción MP, la proporción de colesterol se incrementó *más* que la de los GPL y *más* que la de SM con la diferenciación. Así, en el sentido EP→ER→ET, la relación colesterol/GPL fue 0.35, 0.34, y 0.39 en la fracción ML, y 0.45, 0.51 y 0.54 en la fracción MP. En la misma secuencia de células, la relación colesterol/SM fue 1.91, 2.18 y 2.53 en las ML y 2.85, 4.23 y 4.92 en las MP, respectivamente. Dado que después del estadio de EP la cantidad *por célula* de colesterol, GPL y SM disminuyen con la diferenciación debido a la reducción de tamaño y volumen que las células experimentan (Oresti *et al.*, 2010b), estas relaciones muestran que el colesterol disminuye proporcionalmente menos que los GPL y que las SM durante este proceso en la fracción MP. Es probable que el efecto “ordenador” del Col sea necesario para compensar, en parte, el gran incremento que experimenta la membrana celular en cuanto a la insaturación de las cadenas hidrofóbicas de sus lípidos.

Con el presente enfoque libre de detergente para el aislamiento de fracciones de membrana, además de las fracciones ML y MP, como decimos en gran parte representativas de las membranas plasmáticas, pudo obtenerse una fracción conteniendo membranas de estructuras intracelulares que aquí denominamos “membranas extra-pesadas” (MEP). Esta fracción fue útil, por una parte, porque sirvió como control para comparar la pureza de las otras fracciones de membrana y determinar la recuperación de los lípidos, y por otra, porque sirvió para establecer que la fracción MP acumuló más Col, GPL y SM, pero mucha menos Cer, que la fracción MEP, en los tres estadios de la diferenciación estudiados. Las Cer con VLCPUFA de la fracción MEP son probablemente las especies de Cer que son sintetizadas, principalmente en el retículo endoplásmico, como *precursoras* de las SM y de los GSL complejos con VLCPUFA, los cuales encontrarán su localización final en las membranas plasmáticas de las espermátidas y de los espermatozoides nacientes.

Las presentes observaciones de que la fracción MEP tanto de espermatoцитos como de espermátidas contiene una importante proporción de las n-V Cer y las h-V Cer de la célula entera, implica que estas Cer, en esta localización, son los principales productos de una Cer sintasa (CerS), la CerS3, uno de las seis isoformas conocidos de la CerS cuya expresión se reportó que es específica de las células espermatoгénicas en el testículo de ratón y rata (Rabionet *et al.*, 2008). Tales especies de Cer deben ser precursoras directas de las n-V SM y las h-V SM que componen la parte principal de la membrana plasmática (la fracción MP) de espermatoцитos y espermátidas, respectivamente. La esencialidad de la

CerS3 del retículo endoplásmico y sus productos lipídicos en la espermatogénesis fue demostrada mediante la delección del gen en dichas células (Rabionet *et al.*, 2015). Estos animales no produjeron Cer, SM o FGSL con VLCPUFA en sus testículos, y su consecuencia fue la pérdida de la fertilidad.

Usando técnicas de espectrometría de masas con imágenes de alta resolución, por primera vez en el grupo de trabajo de Sandhoff pudieron visualizarse directamente *in situ* especies moleculares de GPL de colina y de SM en secciones de testículo de ratón adulto (Rabionet *et al.*, 2015). Así, una n-V SM importante, la 30:5 SM, fue detectada en la región de los espermátocitos, mientras la mayoritaria h-V SM, h30:5 SM, se evidenció en el área en la que se localizan las espermátidas, ubicación que concordó con resultados previos de nuestro grupo (Oresti *et al.*, 2010b). Luego de la sustracción de los pesos de los iones acompañantes, como K^+ , los valores de m/z de estas dos moléculas de SM fueron 889.7 y 905.7, respectivamente, en total coincidencia con los presentes resultados (Figs. 24 a 26).

Los datos del Capítulo I, mostrando en detalle los cambios cualitativos en composición de AG y de especies moleculares que contienen n-V y h-V, que tanto la SM como la Cer experimentan en distintas fracciones de membrana -sobre todo la MP y la MEP- de EP, ER y ET, resultaron consistentes y perfectamente complementarios con los hallazgos del Capítulo II. Allí se determina que los genes, tanto de la enzima involucrada en la biosíntesis de los n-V como de la responsable de la biosíntesis de los h-V, se expresan en estas células, y que al avanzar la diferenciación en el sentido EP→ER→ET sus niveles como proteínas cambian en sentidos opuestos. Los datos aquí mostrados también concordaron con los resultados del Capítulo III, donde más adelante describiremos que la capacidad biosintética de Cer y de SM disminuye con la diferenciación.

• Algunas especulaciones sobre posibles funciones de los SL con VLCPUFA

Aparte de la importancia de estos esfingolípidos para una espermatogénesis exitosa, demostrada por delección de genes involucrados en su biosíntesis, la necesidad de su presencia tan específica en las membranas de las células espermatogénicas no se ha establecido. Una de las funciones que les ha sido atribuida es un rol en la estabilización de los puentes intercelulares que se establecen entre las CG de una misma generación una vez que se encuentran en el compartimiento adluminal (Rabionet *et al.*, 2015). Estas son estructuras especializadas de membrana que normalmente mantienen clones de estas células conectados entre sí. Mediante la inhibición de la expresión del gen *CerS3* estos autores demostraron que, asociado a la falta de síntesis de SM y FGSL con VLCPUFA, estas estructuras desaparecen. Por esta razón propusieron que estos últimos podrían estabilizar las áreas de la membrana con un alto grado de curvatura que se forman durante

la meiosis y la espermiogénesis. Esta atractiva propuesta, a nuestro entender podría extenderse a la cabeza espermática de roedores, considerando que ésta tiene una forma extremadamente curva (incluso más en la rata que en el ratón), con una superficie altamente convexa y otra cóncava, que coexisten en una cabeza delgada con forma de gancho.

El fraccionamiento en cabezas y colas de espermatozoides de rata obtenidos del epidídimo, con el objetivo de localizar las especies de SM, Cer y GPL, mostraron que la larga y voluminosa cola contiene las h-V Cer, mientras que esta porción espermática carece de especies de SM con n-V o h-V, las cuales se localizan en la cabeza (Oresti *et al.*, 2011). Las especies de h-V Cer que en esta tesis fueron localizadas en la fracción MP de la membrana plasmática de las espermátidas de rata podrían ser las que encuentran su destino final como abundantes componentes de la membrana plasmática que cubre la cola de los espermatozoides. Las propiedades biofísicas tan particulares de estas h-V Cer (Peñalva *et al.*, 2014) posiblemente proporcionen al flagelo de estas gametas propiedades fisicoquímicas requeridas para el intenso batido flagelar que se produce durante la hiperactivación, un paso esencial para la fertilización. Esto implica, a nivel molecular, rápidos cambios en la curvatura de la membrana, a los cuales los lípidos que la conforman deben adaptarse en tiempos inferiores al segundo.

II. EXPRESIÓN DE ELONGASAS DE ACIDOS GRASOS Y DE Fa2h DURANTE LA ESPERMATOGÉNESIS Y SU ASOCIACIÓN CON LOS PUFA Y VLCPUFA TÍPICOS DE LAS CÉLULAS ESPERMATOGÉNICAS

En este capítulo de la tesis, seis de los siete miembros de la familia de genes *Elovl*, mostraron estar expresados en el testículo de ratas adultas, siendo la excepción *Elovl3*. Todos sus ARNm se detectaron en células localizadas en los túbulos seminíferos, con intensidades de expresión que variaron tanto entre las células espermatogénicas como entre ellas y las células somáticas de Sertoli. Nuestro análisis mostró que *Elovl5*, *Elovl2* y *Elovl4* se expresan diferencialmente durante el desarrollo postnatal, hasta que alcanzan niveles relativamente estables de expresión en el testículo adulto, donde los tres transcritos son principalmente producidos por estas células.

• *Elovl5* y *Elovl2*

La elongación de 18:2n-6 derivado de la dieta en PUFA de 20 y de 22 carbonos (C20, C22) es principalmente una función de la *Elovl5*, mientras que la elongación de los últimos en PUFA de 24 carbonos (C24) está mayormente asociada con la actividad de *Elovl2*. Estas dos elongasas, pero especialmente *Elovl2*, son consideradas como limitantes en la producción de acil-CoAs PUFA de C24 (Zadravec *et al.*, 2011). Las comparaciones cuantitativas aquí presentadas mostraron que el ARNm de *Elovl5* ya se encuentra

expresado en el testículo de rata en edades tempranas del desarrollo, en las cuales los niveles de *Elovl2* (y de los PUFA de C20-C22) son aún muy bajos. Por su parte, la expresión de *Elovl2* se encuentra fuertemente *upregulada* concomitantemente con la aparición de espermatoцитos y espermátidas, que por estudios previos sabemos que los primeros son ricos en lípidos con PUFA de C20 (20:4n-6) y las segundas con PUFA de C22 (22:5n-6) (Beckman y Coniglio, 1979; Oresti *et al.*, 2010b).

Llamativamente, en el hígado de ratones *Elovl5^{-/-}*, el gen *Elovl2* está *upregulado*, y la síntesis de PUFA de C20 y C22 no es interrumpida (Moon *et al.*, 2009). Esto refleja la superposición parcial entre las actividades de estas dos enzimas. En cambio, en testículos de ratones *Elovl2^{-/-}*, la deficiencia de PUFA de C22, y especialmente de PUFA de C24 (24:4n-6, 24:5n-6) y de polienos más largos, como 30:5n-6, no está compensada (Zadravec *et al.*, 2011), lo que demuestra la importancia de *Elovl2* como proveedora de los PUFA de C24 que sirven de sustrato a la *Elovl4*.

En las CG del epitelio seminífero de ratas adultas, nuestros resultados mostraron que *Elovl2* fue el gen que se transcribió más activamente, en concordancia con la extrema abundancia de PUFA de 20 y 22 carbonos en sus membranas (Capítulo I). Su expresión fue ≈ 1000 veces mayor en los tres estadios de CG estudiados que en SC (Fig. 6). En cambio, la relación de niveles de ARNm entre CG y SC (razón CG/SC) para *Elovl5* fue de ≈ 0.8 en los EP y ≈ 4.0 en promedio en las ER y ET. Comparando ahora las expresiones de ambos genes entre sí en el mismo tipo celular, la relación de expresión *Elovl2/Elovl5* alcanzó ≈ 17 en los EP, ≈ 3 en promedio en las dos espermátidas, y ≈ 0.01 en las SC. Este último dato es llamativo, pues indica que las SC expresan 100 veces más *Elovl5* que *Elovl2*.

La alta expresión de *Elovl2* en las células espermátogénicas normales del testículo de ratas adultas, y el hecho de que los EP y las espermátidas tempranas son las células más susceptibles a la temperatura (Hikim *et al.*, 2003), explican nuestro hallazgo de que los niveles del ARNm de *Elovl2* fueron los más disminuidos en los testículos (unas 3 veces) dos semanas después de la depleción masiva de CG inducida por exposiciones a hipertermia. En cambio, los niveles de ARNm de *Elovl5* se habían incrementado (unas 2 veces) en el mismo periodo de 2 semanas, indicando la *upregulación* de este gen. Si bien ignoramos en qué células se produjo dicho estímulo, podría haber tenido lugar en los espermatoцитos emergentes que aún no han completado su meiosis, ya que próximamente van a requerir incrementar la síntesis de PUFA de C20, en especial el 20:4n-6 que normalmente abunda en los GPL de las membranas de los EP. Una tendencia similar de aumento a la semana 2 pareció afectar la expresión, a nivel ARNm, de *Elovl4*. Por la misma razón, éste podría asociarse a que los espermatoцитos en paquiteno van a necesitar incrementar la síntesis de los n-V que normalmente abundan en sus SM y Cer (Oresti *et al.*, 2010b). No puede sin

embargo descartase que los ARNm de *Elov15* y de *Elov14* se hubieran incrementado en este período en las SC, en las cuales demostramos que normalmente *ambos* abundan. Dichos ARNm podrían ser transportados desde las SC a los EP en formación, como especulamos más adelante para el caso de *Elov14*.

El hallazgo de que, luego de su significativa caída a la semana 2, los niveles del ARNm de *Elov12* tendieron a aumentar a la semana 6 post-hipertermia (esto es, más tarde en el tiempo que el aumento del de *Elov15*), coincidió con el tiempo de reaparición de las espermátidas en el testículo, así como con el notable incremento de GPL ricos en 22:5n-6 demostrado en un trabajo previo en el que se describieron los cambios que experimentan los lípidos y sus AG luego de la hipertermia (Furland *et al.*, 2011).

• *Elov14*

De acuerdo con lo reportado previamente en el ratón adulto (Mandal *et al.*, 2003), el presente trabajo muestra que el ARNm de *Elov14* es producido activamente en el testículo de rata adulta. Además, extendemos dicha característica al describir por primera vez que dicho ARNm se expresa en forma diferencial entre las células espermátogénicas, creciendo en la dirección EP→ER→ET, y, para nuestro asombro, en las células de Sertoli. De las tres elongasas aquí comparadas, *Elov14* fue la única cuyos niveles de ARNm fueron mayores en estas células somáticas que en EP y ER, un intrigante descubrimiento considerando que las SC no expresaron la proteína *Elov14* ni produjeron C26-C32 PUFA como se espera de la proteína enzimática (Figs. 16 y 22). A la inversa, en los EP ricos en n-V (Oresti *et al.*, 2010b), en los cuales la proteína *Elov14* estuvo altamente concentrada y demostrando actividad como elongasa, los niveles del ARNm fueron los más bajos. Si bien las razones de estas características permanecen elusivas en la actualidad, los elevados niveles de ARNm en las SC aportaron una explicación razonable para nuestras observaciones *in vivo* presentadas aquí en dos situaciones en las cuales las SC superan en número a las CG: las gónadas infantiles (que aún no producen estas últimas) y los testículos adultos que habían sido expuestos a hipertermia (que las habían perdido en su mayor parte). En cada uno de estos casos, los transcritos de *Elov14* estuvieron presentes debido a que fueron principalmente contribuidos por las células de Sertoli.

Otro hallazgo interesante fue que los niveles del transcrito de *Elov14* fueron mayores en los cuerpos residuales (CR) que en las células del epitelio seminífero, tanto germinales como de Sertoli. Esto muestra que una gran parte del ARNm de *Elov14* producido en las CG termina por ser descartado (junto con muchos otros ARNm) en el interior de los CR en las últimas fases de la espermiogénesis, e implica que, *in vivo*, en el testículo adulto, su destino final son las células de Sertoli. Se sabe que estas células fagocitan rápidamente los CR a

medida que se producen y se liberan desde las espermatidas más avanzadas. Ello incita la pregunta de si este ARNm se “recicla” como tal entre las CG y las SC o si en éstas se degrada y luego el gen se transcribe *de novo*. El hallazgo del ARNm de *Elovl4* altamente concentrado tanto en testículos infantiles como en las SC aisladas a partir de los mismos, o en testículos adultos carentes de espermatidas avanzadas, esto es, en la total *ausencia* de CR, permite asegurar que *Elovl4* se transcribe activamente en las SC.

El hecho de que el ARNm de *Elovl4* esté transcripcionalmente expresado pero traduccionalmente inactivo en las SC sugiere que podría estar sujeto a regulación negativa o silenciamiento en ellas. Si este fuera el caso, la siguiente pregunta sería por qué, o para qué, las SC necesitan producir dicho ARNm. Una hipótesis atractiva a demostrar sería que lo hacen para transferírsele a las CG, como lo hacen con muchas otras moléculas. Las microvesículas extracelulares son parte del secretoma celular, y transportan proteínas y otros elementos, entre ellos moléculas funcionales de ARN (incluyendo ARNm, ARN no codificantes y microARN) de una a otra célula, donde los ARNm incorporados pueden ser traducidos en las proteínas apropiadas (Ratajczak y Ratajczak, 2016). Esta transferencia horizontal de ARN podría potencialmente ocurrir desde las SC hacia las células espermatogénicas, especialmente hacia los EP. Vesículas pequeñas rodeadas de membrana de origen endosomal, conocidas como exosomas, son liberadas por muchas células, mediando el transporte intercelular de proteínas, lípidos y ARNs (Valadi *et al.*, 2007; Colombo *et al.*, 2014). Aunque aún no han sido caracterizados en las SC de rata, la presencia de exosomas ha sido descrita en el testículo de tortuga (Ahmed *et al.*, 2016).

En estudios preliminares de nuestro grupo en colaboración con el laboratorio del Dr. Jesús Del Mazo en Madrid, España, se encontraron niveles significativos del ARNm de *Elovl4* en testículos de roedores a edades embrionarias, es decir, lejos del momento de la vida en que se espera que surjan las enzimas responsables de biosintetizar los lípidos de membrana que contienen VLCPUFA. Además se indagó *in silico* (fuente: TarBase v7.0 <http://diana.imis.athenainnovation.gr/DianaTools>) acerca de si existen microARNs que tengan como blanco al ARNm de *Elovl4*, encontrando a 4 que lo hacen (mmu-let-7c-5p, mmu-let-7b-5p, mmu-let-7i-5p, y mmu-miR-297a-5p), de los cuales los 3 primeros han sido validados por inmunoprecipitación (Vlachos *et al.*, 2015). Además, en el grupo se detectó que estos microARNs se expresan en estadios infantiles de los testículos de roedores, donde podrían unirse al ARNm de *Elovl4* regulando o directamente inhibiendo su traducción (Oresti y Del Mazo, no publicado).

Pequeñas cantidades de la enzima *Elovl4* traducida deberían ser suficientes para dar lugar a pequeñas cantidades de n-V, en su forma libre, que podrían ser modificados por otras enzimas para sintetizar productos involucrados en funciones regulatorias. Al respecto,

un descubrimiento reciente en la retina de ratón mostró que dos n-V libres de la retina, 32:6n-3 y 34:6n-3, pueden ser convertidos por oxigenasas en una nueva serie de compuestos que los autores denominaron *elovanoïdes* (Jun *et al.*, 2017). Estas moléculas, formadas en células del epitelio pigmentario retiniano y liberadas al medio en concentraciones nanomolares, resultaron intensificar la expresión de genes pro-supervivencia en las células fotorreceptoras (Jun *et al.*, 2017). Estos descubrimientos generan expectativa, ya que si a partir de VLCPUFA libres se generasen elovanoïdes similares en el testículo, éstos podrían ejercer funciones como moléculas de señalización en procesos del desarrollo testicular temprano.

• Elov14

A diferencia del ARNm, la proteína Elov14 se expresó de acuerdo a como se esperaba. No se la detectó en aquellos estadios tempranos del desarrollo testicular en los cuales ni los EP ni sus lípidos con n-V aún existen en los túbulos seminíferos, mientras que su máxima expresión coincidió con la edad en que los EP son los componentes celulares mayoritarios de los mismos. La proteína Elov14 no estuvo presente en localizaciones extratubulares y mostró un patrón de expresión espacio-temporal diferencial entre las células espermatogénicas. Así, los espermátocitos meióticos expresaron intensamente Elov14 en estadios específicos del ciclo espermatogénico y en una localización celular compatible con su concentración en estructuras del retículo endoplásmico y del aparato de Golgi. La marcación de la proteína disminuyó con la diferenciación entre EP y ER, como lo hizo también la capacidad para producir C26-C32 PUFA en el sentido EP→ER (Fig. 22), sugiriendo que Elov14 fue gradualmente menos necesaria a medida que la diferenciación avanzó. Esto es razonable, ya que una importante parte de los materiales lipídicos sintetizados en los EP, incluyendo los lípidos polares de la membrana plasmática y de organelas intracelulares, son “heredados” por sus hijas postmeióticas de menor tamaño, las ER.

En espermátidas en estadios más avanzados de su diferenciación, esto es, aquellas que se encuentran en elongación, la inmunofluorescencia mostró que la proteína Elov14 apareció concentrada en una pequeña estructura redondeada dentro del lóbulo citoplasmático (Fig. 17). En las espermátidas elongadas de rata, esta formación podría corresponder al *cuerpo radial* previamente descrito como “un agregado de remanentes de cisternas del retículo endoplásmico, colapsadas y organizadas radialmente” (Clermont y Rambourg, 1978). La alta concentración de la proteína Elov14 detectada por el anticuerpo en esta estructura, en conjunto con la muy baja actividad de elongación observada en las ET (Fig. 22), sugiere que la proteína, muy activa en los EP y aún activa en las ER en estadios

tempranos, tiende a perder una buena parte de su funcionalidad en los últimos estadios de la espermiogénesis. Su alta concentración en las mencionadas estructuras, pequeñas y redondas, probablemente refleje el proceso inminente de “compactación” de las membranas del retículo endoplásmico/ Golgi, junto con otras organelas y componentes extranucleares, previa a su inclusión en los CR. Como ya expusimos, se sabe que éstos concentran, en una forma altamente condensada, organelas y otros materiales intracelulares, incluyendo macromoléculas del citoplasma que ya no serán necesarios en las gametas nacientes. Como se mencionó antes para el caso de los ARNm, podría especularse que éste es también el destino final de la proteína Elov14 (y también de la Fa2h, como discutiremos después) en vista de que ninguna de ellas se detectó en espermatozoides testiculares. Sin embargo, un hecho aparentemente contradictorio fue que, utilizando el mismo anticuerpo, la Elov14 se detectó en los CR pero no en los extractos proteicos obtenidos a partir de los CR, como lo mostró el *Western blot*. Una especulación para explicar esta aparente inconsistencia sería que la enzima, en su forma inactiva, ya estuviera parcialmente degradada en los CR, con los fragmentos peptídicos aun conservando *in situ* una estructura terciaria en la configuración apropiada o necesaria para que sus epitopes antigénicos fueran reconocidos por el anticuerpo específico, mientras que al liberarse los contenidos de los CR a las soluciones acuosas en *buffer* y detergente, preparadas para sembrar en la electroforesis, esa configuración se perdiera.

El hallazgo de que Elov14 estuvo ausente de las SC, tanto como proteína (Fig. 16) como en forma de enzima activa (Fig. 22), prácticamente permite descartar que los VLCPUFA sean sintetizados en las SC para ser transportados a las germinales. La presencia y distribución de la proteína Elov14 entre las CG, en coincidencia con la disminución de su actividad en el sentido EP→ER→ET (Fig. 22) aportaron una fuerte evidencia a favor de nuestra convicción de que Elov14 es la enzima responsable de la síntesis de los VLCPUFA testiculares y que su biosíntesis ocurre específicamente en las células germinales.

En cambio, la presencia del ARNm de *Elov15* y de *Elov12* en las SC aisladas (Fig. 6), al mismo tiempo que éstas sí mostraron una activa capacidad de síntesis de PUFA de 22 y 24 carbonos (Fig. 22), no permite excluir totalmente la posibilidad de que *in vivo* éstas los sinteticen y que los transfieran a las células germinales como precursores de los VLCPUFA. Un antecedente en contra de esta interpretación fue el hecho de que al co-cultivar CG y SC de rata separadas por una membrana semipermeable, los PUFA [¹⁴C]22:6n-3 y [¹⁴C]22:5n-6, elongados y desaturados por las SC a partir de los respectivos precursores de C20, [¹⁴C]20:5n-3 y [¹⁴C]20:4n-6, si bien atravesaron dicha membrana, no fueron incorporados por las CG (Retterstøl *et al.*, 2001). Aun así, las condiciones experimentales de dichos ensayos,

como por ej., la falta de contacto célula-célula, no permiten descartar por completo el transporte de PUFA entre estas células *in vivo*.

Como ya se mencionara, *CerS3* es el miembro de la familia de genes de las *Cer sintetasas* que, además de en la piel, se encuentra expresado con intensidad en el testículo (Mizutani *et al.*, 2006). En éste, se expresa específicamente en las células espermatogénicas (Rabionet *et al.*, 2008), en las cuales es responsable de la síntesis de las especies de Cer con VLCPUFA (Rabionet *et al.*, 2015), que a su vez sirven como precursoras de las SM y de los GSL complejos que contienen dichos ácidos grasos. El patrón de expresión de la proteína Elov14 observado en el presente estudio entre las células de los túbulos seminíferos de rata coincidió con el reportado para la proteína CerS3 en el ratón por Rabionet y colaboradores (Rabionet *et al.*, 2015). Así, por inmunofluorescencia, los niveles de *ambas* proteínas fueron más altos en los EP, declinaron en las ER, y se concentraron nuevamente en pequeñas estructuras redondeadas presentes en las ET. Eso indica que Elov14 y CerS3 se complementan para sintetizar las n-V Cer de las células espermatogénicas.

• *Fa2h*

A diferencia del ARNm de *Elov14*, no se detectó expresión del ARNm de *Fa2h* en las células de Sertoli. Consistentemente con este hecho, dicho ARNm estuvo ausente de testículos de edades infantiles (Fig. 7), y en los de rata adulta desapareció cuando, con permanencia de las SC, la pérdida de células espermatogénicas fue forzada experimentalmente como consecuencia de las exposiciones repetidas a hipertermia (Fig. 11).

Como esperábamos, la expresión de *Fa2h*, tanto a nivel de ARNm como proteína, fue menor en los EP que en las espermátidas, donde sus productos, los h-V, tienden a concentrarse en las especies moleculares de SM y Cer (Oresti *et al.*, 2010b; Capítulo I). Dichas células son por lo tanto responsables de la elevada expresión de este gen en el testículo de roedores en la comparación con otros tejidos (cerebro, piel, estómago), mostrada en el artículo de Eckhardt y colaboradores (Eckhardt *et al.*, 2005). Investigadores de este grupo generaron ratones con ausencia del gen *Fa2h* (-/-), con el objetivo de investigar sus efectos en la formación de la mielina. Inesperadamente, a pesar de la disminución observada en las galactosilceramidas y sulfátidos con AG 2-hidroxilados saturados y monoenoicos, estos ratones desarrollaron mielina estructural y funcionalmente normal hasta la adultez temprana, con la aparición de defectos en la mielina solo en animales de avanzada edad (Zoller *et al.*, 2008). Además, machos y hembras fueron fértiles. Sin embargo, no sería sorprendente que, en roedores, la enzima *Fa2h* expresada por

oligodendrocitos y aquella expresada por las espermatidas fueran isoformas distintas, considerando la diferencia entre los correspondientes productos finales que resultan en cada caso.

El hallazgo más atractivo acerca de la proteína Fa2h fue su localización específica dependiente del estadio espermatogénico. Su expresión fue escasa en los EP pero se detectó una abundante y diseminada marca en el citoplasma de las ER, como era de esperar por la localización de Fa2h como una proteína integral de la membrana del retículo endoplásmico (Alderson *et al.*, 2004; Eckhardt *et al.*, 2005; Zhu *et al.*, 2015) y de la localización de sus productos, los h-V, en estas células (Oresti *et al.*, 2010b). En estadios tardíos de la espermiogénesis, la proteína evidentemente sufrió un cambio en su posición dentro de las células, indicativo de cambios en la organización de membranas intracelulares. En las espermatidas elongadas más tardías, situadas más distalmente de la membrana basal limitante de los túbulos, la fluorescencia asociada a Fa2h se encontró rodeando parcialmente la envoltura nuclear, concentrada intensamente sobre el aspecto posterior de la cabeza de estas células, en coincidencia con la formación temporal de la estructura conocida como *manchete*. Los cambios en la forma que atraviesan las cabezas de las espermatidas de rata durante la espermiogénesis, desde casi esféricas a forma de hoz, dependen críticamente de esta compleja estructura microtubular (Russell *et al.*, 1991). Los filamentos de actina, microtúbulos y microdominios *raft* enriquecidos en GM1 participan en permitir el correcto ensamblaje y anclaje del complejo *manchete* (Simón *et al.*, 2017).

La función de las enzimas Elovl4 y Fa2h evidentemente es trabajar en conjunto para producir los SL con n-V y h-V de las membranas de las células espermatogénicas. Estos SL, a diferencia de aquellos con AG saturados, ocurren en regiones de la membrana plasmática distintas de los dominios tipo *raft* como concluimos en el Capítulo I. Las observaciones aquí presentadas sugieren que la relación entre Fa2h y las funciones del *manchete* podrían ser simplemente coexistencia y cooperación, la primera facilitando, y el segundo operando, los cambios en la forma de la cabeza que ocurren en las espermatidas durante la elongación. Los SL con n-V, y especialmente los SL conteniendo h-V específicos de roedores, podrían proveer la flexibilidad necesaria a la membrana de las espermatidas a medida que sus cabezas incrementan su curvatura, permitiendo la formación de la cabeza en forma de hoz que es típica de los espermatozoides de ratón y rata.

III. BIOSÍNTESIS DE ESFINGOLÍPIDOS EN CÉLULAS ESPERMATOGÉNICAS

En el Capítulo III de la tesis, haciendo uso de herramientas de Bioquímica y Biología Molecular, demostramos que las CG aisladas de rata son capaces de llevar a cabo la biosíntesis *de novo* de SL, en particular Cer, SM y GlcCer. En ausencia de SC, tanto los EP

como las ER fueron capaces de incorporar [³H]16:0 en estos tres SL, marcación que fue bloqueada en presencia de dos clásicos inhibidores de la vía *de novo*, como lo son la L-cicloserina y la fumonisina B1. Consistentemente con ello, tanto los EP como las espermatidas (ER y ET) expresaron activamente a los ARNm de los genes de las sintasas implicadas en dicha vía (*CerS3*, *SMS1* y *GlcCerS*). Además, el hecho de que el transcripto de *CerS3* estuviera ausente de las SC, y que los de *SMS1* y *GlcCerS* se expresaran en ellas en niveles mucho más bajos que los encontrados en las CG, permitió demostrar que éstas últimas, por sí mismas, son el sitio de síntesis de los característicos SL con VLCPUFA que contienen.

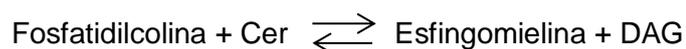
La diferenciación de las células espermátogénicas impactó sobre la capacidad de biosíntesis de Cer, SM y GlcCer ya que los tres SL fueron sintetizados más activamente por los EP que por las ER. Esto tiene sentido considerando que las ER no sólo tienen un menor contenido de Cer y de SM por célula que los EP (Oresti *et al.*, 2010b) debido a su menor superficie de membrana plasmática y menor desarrollo del aparato de Golgi, sino que además *in vivo* “heredan” una parte de sus SL ya preformados desde los EP. Es conocido el hecho de que otras enzimas cruciales en el metabolismo lipídico, como aquellas involucradas en la síntesis *de novo* de AG, muestran una actividad incrementada durante la meiosis, y que ésta luego declina en las células postmeióticas (Bajpai *et al.*, 2009). Nuestros resultados del Capítulo III, evidenciando las actividades de *CerS3*, de las SMSs, y en menor medida también de *GlcCerS*, mostraron una tendencia similar, en el mismo sentido que lo hizo la actividad conjunta de las Elovls mostrada en el Capítulo II.

En aparente contraste con la disminución de los niveles de ARNm entre los EP y las ET, los CR contuvieron cantidades significativas de los transcriptos de todas estas enzimas, principalmente de *CerS3*, lo cual implica que parte del ARNm que no es utilizado por las CG durante su maduración, y que ya no será necesitado por los espermatozoides nacientes, es eliminado en estas partículas. Este no es un hecho aislado para los ARNm de estas sintasas, ya que se sabe desde hace tiempo que los CR contienen ARN (Russell, 1990) entre otros materiales. Entre los ARNm relacionados al metabolismo lipídico, además de los dos estudiados en el Capítulo II, previamente se había demostrado en trabajos de nuestro grupo que los CR contienen importantes cantidades de los ARNm que codifican para enzimas como diacilglicerol acil-transferasas y para proteínas unidoras de AG (Oresti *et al.*, 2013). Es intrigante el hallazgo de que se genere tal dotación de ARNm para luego ser descartado. El hecho de que las SC sean las encargadas de reconvertir los materiales dejados atrás en los CR por las células germinales maduras, incluyendo a los ARNm, muestra que éstas últimas son “relevadas” de tener que ocuparse en actividades catabólicas, otro de los “servicios” metabólicos fundamentales que las SC prestan en la

espermatogénesis. Otra posibilidad digna de investigar sería la de determinar si realmente dichos ARNm son degradados en las SC o si de alguna manera son retornados a nuevas generaciones de CG.

Llamativamente, la mayor diferencia entre EP y ER se vio en la mayor capacidad de biosíntesis de las especies de Cer con n-V (n-V Cer) en los primeros. Ello coincidió con niveles de ARNm de *CerS3* mucho más altos en los EP que en las ER. Teniendo en cuenta que *CerS3* es la isoforma de *CerS* responsable de la biosíntesis de Cer con VLCPUFA (Rabionet *et al.*, 2008), este hallazgo concuerda con lo observado en el Capítulo II de esta tesis para la expresión de la proteína *Elovl4*, y con resultados previos que mostraron que, entre las células del epitelio seminífero, los EP poseen los niveles más altos de n-V Cer y de n-V SM por célula (Oresti *et al.*, 2010b). El hecho de que el transcripto de *CerS3* estuviera ausente de las SC concordó con lo reportado en testículo murino por Rabionet y colaboradores en 2008, quienes describieron la presencia del ARNm de *CerS3* como característica exclusiva de las células espermatogénicas, y además observaron que durante el desarrollo postnatal su expresión aumenta (unas 700 veces) con la aparición de los EP (Rabionet *et al.*, 2008). Más recientemente, los mismos autores determinaron que la proteína codificada por dicho gen tampoco se expresa en las SC (Rabionet *et al.*, 2015).

De las múltiples isoformas de la SMS, la SMS1 y la SMS2 han sido las más estudiadas. Se sabe que se co-expresan en muchos tipos celulares y que la SMS1 reside principalmente en el aparato de Golgi, mientras que la SMS2 lo hace especialmente en la membrana plasmática (Huitema *et al.*, 2004; Tafesse *et al.*, 2006, 2007). Las SMSs catalizan la siguiente reacción:



Mientras a la SMS1 se le ha adjudicado como función generar en el Golgi la mayor parte de la SM presente en las células, la SMS2 tiene la importante capacidad de regular los niveles de Cer y de DAG primariamente en la membrana plasmática, en forma directa y reversible, controlando así potencialmente procesos celulares opuestos tales como proliferación celular, detención del crecimiento, y apoptosis (Hannun y Luberto, 2004; Huitema *et al.*, 2004; Tafesse *et al.*, 2006).

A juzgar por la marcación con [³H]16:0 de la SM aquí observada, la actividad enzimática de la SMS1 fue mayor en EP que en ER, aunque los niveles de ARNm de esta enzima no cambiaron significativamente con el avance de la diferenciación de las células espermatogénicas. Esto sugiere que parte del transcripto de *SMS1* dejaría de ser traducido a proteína en las ER, o bien que la proteína en sí, pese a estar presente, fuera perdiendo actividad como se observó en el Capítulo II para la *Elovl4*. Otra posibilidad sería que la

enzima poseyese una tasa de actividad más lenta en las ER, limitada en este caso por la cantidad del sustrato Cer, que es mucho menor en ellas que en los EP (Oresti *et al.*, 2010b). El seguimiento de los niveles de expresión de SMS1 como proteína en diferentes estadios del desarrollo de las CG permitiría determinar por qué su ARNm no cambia mientras su actividad disminuye con la diferenciación.

Dado el conocido rol pro-apoptótico de la Cer y el rol pro-mitogénico del DAG, la SMS2 podría jugar un papel importante en las señales que regulan la supervivencia, el crecimiento y la diferenciación de las células espermatogénicas. En el presente estudio encontramos que las de rata expresan los genes de ambas isoformas de SMS, con predominio de una u otra según el estadio celular.

Un hallazgo interesante fue que, en contraste con el transcrito del gen *SMS1*, que se produjo a niveles relativamente similares en los dos estadios celulares aquí investigados, los niveles del ARNm de *SMS2* fueron mayores en las ER que en los EP. Esto concordó con lo observado al caracterizar la expresión de la *SMS2* en el epitelio seminífero de ratas adultas por otros autores, quienes empleando RT-PCR e *immunoblotting* localizaron a la proteína en las ER tardías y en las espermátidas en elongación, no siendo detectable en las espermátidas ya elongadas (Lee *et al.*, 2007). Además mostraron que la expresión de *SMS2* está limitada a las CG, no estando presente en las SC, y que su expresión mostró ser específica de estadio, siendo máxima en los estadios VIII-IX y muy baja en los estadios X-V. Dada su ubicación en la membrana plasmática cercana al acrosoma, estos autores vincularon a la *SMS2* con la biogénesis de esta importante estructura de los espermatozoides.

En conjunto, los niveles opuestos de expresión de *SMS1* (EP>ER) y *SMS2* (EP<ER) aquí encontrados sugieren la posibilidad de que una parte de la [³H]SM que detectamos en las ER podría ser sintetizada por la *SMS2* a partir de las moléculas de [³H]Cer sintetizadas en su retículo endoplásmico y transportadas a su membrana plasmática. La expresión activa de los genes *SMS1* y *SMS2*, sumada a las observaciones que permitió hacer la NBD-Cer cuando fue empleada como sustrato, permiten pensar que al menos una parte de la SM obtenida en los presentes estudios fue sintetizada por la *SMS1* localizada en el Golgi. Así, células expuestas a NBD-Cer (molécula clásicamente usada en Biología Celular como marcadora del Golgi) produjeron en 5 horas cantidades significativas de NBD-SM además de GlcNBD-Cer. Cuando se observaron al microscopio de fluorescencia luego de las incubaciones, parte de la marca en las células se localizó en la membrana plasmática, y parte en capas más profundas del interior celular, en consistencia con la bidireccionalidad del transporte vesicular de SL entre membrana plasmática y Golgi. Utilizando como precursor NBD-Cer, la biosíntesis de SM y de GlcCer fue, respectivamente, ≈ 1.4 y 3 veces

más activa en EP que en ER. Con [³H]16:0 en comparación, la biosíntesis de SM y GlcCer fue, respectivamente, ≈ 4 y 2 veces más activa en EP que en ER.

Con respecto a las especies moleculares sintetizadas utilizando [³H]16:0 como precursor, tanto las CT como los EP y las ER sintetizaron más activamente especies moleculares de [³H]Cer conteniendo AG saturados y monoenoicos (s+m) que aquellas conteniendo VLCPUFA (n-V, h-V) (Fig. 10). Esto era esperable, teniendo en cuenta la naturaleza del precursor utilizado, ya que además de incorporarse *de novo* para formar la base esfingoidea de la Cer, el [³H]16:0 puede incorporarse también como *ácido graso* (por unión amida) a la molécula de Cer en formación, ya sea directamente como [³H]16:0 o previa transformación en [³H]18:0 y de éste en [³H]18:1, lo que debería ser una importante contribución a la radioactividad detectada en la fracción correspondiente a [³H](s+m) Cer. En cambio, para formar una n-V Cer radioactiva en las mismas condiciones, se requeriría incorporar, a la base esfingoidea marcada con [³H], 1) un VLCPUFA tetra y/o pentaenoico pre-existente no marcado, o 2) un VLCPUFA biosintetizado *in situ* durante las 20 horas de cultivo a partir de 24:4n-6 o 24:5n-6 endógenos por acción de la Elov14. Estos últimos VLCPUFA podrían estar parcialmente marcados con [³H] al incorporar, *vía* Elov14, radioactividad proveniente de [³H]acetil-CoA, a su vez derivada de la β-oxidación del [³H]16:0 uniformemente marcado utilizado en los presentes experimentos. Esto es posible, teniendo en cuenta que las CG poseen las enzimas necesarias tanto para la síntesis *de novo* como para la oxidación de AG (Bajpai *et al.*, 2009). En trabajos previos en túbulos seminíferos de rata adulta se había observado una rápida y activa incorporación de [¹⁴C]acetato, principalmente en AG saturados, pero también directamente en VLCPUFA tetraenoicos y pentaenoicos endógenos (Aveldaño *et al.*, 1993).

Al comparar la marca de [³H] entre Cer, SM y GlcCer *totales*, los EP sintetizaron niveles bastante similares de [³H]Cer y de [³H]SM, y unas 4 veces menos de [³H]GlcCer (**Figura 1**). Si bien la marca en los 3 lípidos de las ER fue varias veces menor, la marcación de estos tres SL siguió una tendencia similar a la de los EP.

En los EP, esta evidencia de actividad no fue coincidente con la expresión, en forma de ARNm, de *CerS3*, ya que ésta fue varias veces superior a la de *SMS1* ≈ *SMS2* y las expresiones de estos dos genes a su vez fueron similares a la de *GlcCerS*. Esto sugiere que *CerS3* es clave, posiblemente por actuar antes en la vía de biosíntesis y por proporcionar las moléculas de Cer que serán utilizadas como sustratos por las sintasas cuyos ARNm se expresaron a un nivel similar. En las ER, la expresión de los genes sí reflejó mejor la actividad de síntesis. Así, en ellas el contenido de ARNm de *CerS3*, si bien fue menor que en los EP, se mantuvo alto y similar al de *SMS2*, mientras que los de *SMS1* y *GlcCerS* fueron menores. Además, sin cambio significativo en los niveles de ARNm de *SMS1* o de

GlcCerS con la diferenciación, fue llamativo el aumento de la expresión de *SMS2* en las ER con respecto a los EP (Fig. 20).

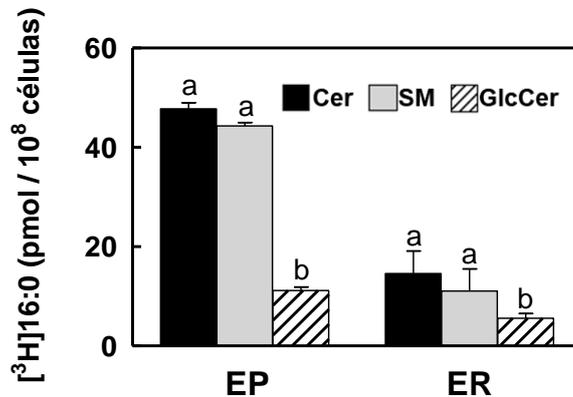


Figura 1. Comparación, utilizando la misma escala, de la incorporación de [³H]16:0 en Cer, SM y GlcCer totales de EP y ER. Letras diferentes (a-b) indican diferencias significativas dentro de cada grupo (p<0.05).

La [³H]Cer de las CG demostró estar contribuida por especies moleculares marcadas con [³H] de (s+m) Cer, n-V Cer, y h-V Cer, de las cuales sólo las n-V Cer (y tal vez también las h-V Cer), serían el producto directo de la CerS3, mientras las primeras serían producidas por una de las otras CerS (CerS5, CerS2 y en menor medida CerS6), que según se reportó previamente (Rabionet *et al.*, 2008), también se expresan en el testículo de ratón adulto. Mientras la relación producto/precursor [³H]SM / [³H]Cer disminuyó desde ≈ 0.9 en los EP hasta ser ≈ 0.75 en las ER, la relación [³H]n-V SM / [³H]n-V Cer en particular aumentó desde ≈ 2.2 en los EP hasta 2.6 en las ER.

De los datos de la Fig. 10, puede calcularse que la distribución *porcentual* de la marca de la Cer total con [³H]16:0 *entre* los tres grupos de especies (s+m) Cer, n-V Cer, y h-V Cer fue ≈ de 61: 20: 19% en los EP y de 65: 14: 21% en las ER, respectivamente, luego de 20 horas en cultivo. En conjunto, estos datos son consistentes con que tanto la actividad (Fig. 10) como la expresión de la CerS3 (Fig. 20) fueron máximas en los EP. Sumando ahora necesariamente la marca en [(s+m) Cer y en h-V Cer] para poder comparar los resultados con los de las especies de SM (Fig. 10), la relación (s+m+h-V) Cer : n-V Cer fue 80:20 en EP y 86:14 en ER, mientras la relación (s+m+h-V) SM : n-V SM fue de 53:47, esto es, cercana a 1.0, tanto en EP como en ER.

En otras palabras, al considerar las especies moleculares con n-V de Cer y de SM en forma aislada, los EP sintetizaron tanto cantidades como proporciones mayores de n-V SM que de n-V Cer (un 20% y un 47% del [³H] incorporado en la Cer y en la SM total, respectivamente) (**Figura 2**). Por su parte, si bien las *cantidades* incorporadas en ambos lípidos fueron mayores en los EP que en las ER, las *proporciones* cambiaron, disminuyendo en [³H] n-V Cer y manteniéndose en [³H] n-V SM (un ≈14% y un ≈43% del [³H] incorporado

en la Cer y en la SM total de las ER, respectivamente). Estos resultados apoyan nuestra idea de que la SM sintasa involucrada en ello favorece la utilización de las especies de Cer que contienen n-V por sobre aquellas que poseen otros tipos de AG para sintetizar SM en ambos tipos celulares.

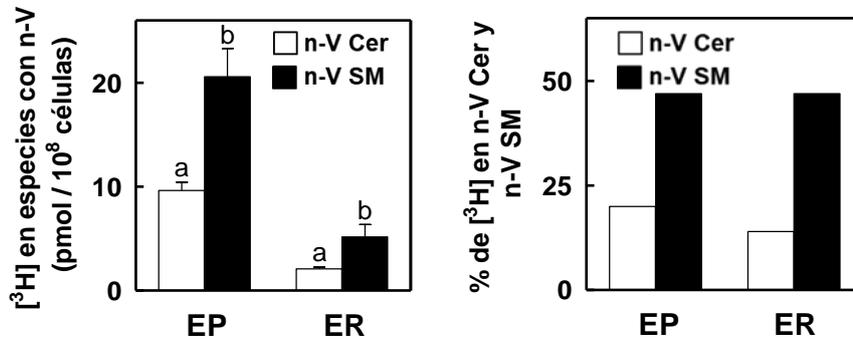


Figura 2. Incorporación y distribución de la marca proveniente de [³H]16:0 en n-V Cer y n-V SM de EP y ER. Letras diferentes (a-b) indican diferencias significativas (p<0.05).

Tomados en conjunto, los datos de marcación con [³H] presentados concuerdan con datos previos que mostraron que tanto EP como ER poseen un mayor *contenido* de especies de n-V SM que de n-V Cer, y que el contenido relativo de n-V Cer con respecto al de n-V SM, disminuye en el sentido EP→ER (Oresti *et al.*, 2010b). También muestran que ambos tipos celulares fueron capaces de sintetizar especies de Cer y de SM con n-V, lo cual requiere 1) el rol activo de la CerS3 en ello y 2) la conversión directa de n-V Cer en n-V SM por parte de SM sintasa(s) más activas en los primeros que en las segundas (EP>ER) en el tiempo ensayado, con la SMS2 posiblemente aventajando a la SMS1 en las ER, según lo sugiere la mayor expresión de su ARNm en ellas.

La mucho mayor expresión del gen *CerS3* que los de las dos *SMSs* y el de *GlcCerS*, sumada a la considerable actividad enzimática de CerS3 sugerida por la alta marcación de [³H]n-V Cer, permiten especular que una parte de la [³H]Cer total sintetizada (incluyendo especies con s+m, n-V y h-V), podría ser canalizada hacia la síntesis de glucoesfingolípidos (GSL) complejos, dado que en ellos coexisten especies con estos mismos AG (Rabionet *et al.*, 2008) y para los cuales la [³H]GlcCer es tan sólo un primer intermediario.

En el compartimento basal del epitelio seminífero, espermatogonias y células espermatogénicas basales de ratón son capaces de la reacción Cer→ GlcCer→ Lactosil-Cer→ un gangliósido (el GM1) fucosilado (FucGM1) conteniendo AG saturados (principalmente 16:0) (Rabionet *et al.*, 2008). Por su parte, ya en el compartimento adluminal, EP, ER y espermátidas en elongación, sintetizan además ocho GSL: cuatro fucosilados no sialilados (neutros) conteniendo VLCPUFA, siendo el primero de ellos similar

al mencionado FucGM1 pero sin sialilar (FucGA1), a partir del cual se sintetizan tres compuestos sialilados más por adición sucesiva de galactosas y N-acetilglucosamina. Además de estos, las espermátidas en elongación agregan ácido siálico a estos cuatro compuestos, para dar lugar a cuatro GSL sialilados (gangliósidos) fucosilados con VLCPUFA (Sandhoff, 2010). En el presente trabajo no determinamos la marcación de estos GSL complejos. La alta polaridad que les confiere su cabeza poli-glicosilada hace que en su mayor parte se particionen en las fases superiores al preparar los extractos lipídicos a partir de las células. Si bien estas fases superiores contienen una variada naturaleza de productos polares, fue interesante observar en el presente estudio un aumento en el *porcentaje* de la radioactividad total en ellas, desde un 2% en los EP a \approx un 12% en las ER (Tabla 1). Una proporción de esta marca podría potencialmente corresponder a estos GSL, parte de los cuales contiene AG saturados (predominantemente 16:0) y parte VLCPUFA (predominantemente h30:5) (Rabionet *et al.*, 2008).

Teniendo en cuenta que la *proporción* h-V/n-V aumenta tanto en la Cer como en la SM con el avance de la diferenciación (Capítulo I), y el hecho de que las espermátidas concentran los mayores niveles de la enzima Fa2h (Capítulo II), esperábamos encontrar una mayor síntesis de especies de Cer y de SM conteniendo h-V que conteniendo n-V en las ER que en los EP. Si bien no se vio incremento absoluto en la síntesis *de novo* de ningún lípido en particular al comparar EP con ER, en el caso de la Cer, se vio claramente una tendencia a favorecer la proporción de especies de h-V Cer por sobre las n-V Cer en las ER con respecto a los EP. Así, la relación $[\text{H}]^3\text{h-V Cer} / [\text{H}]^3\text{n-V Cer}$ pasó de ser ≈ 0.92 en los EP a ≈ 1.5 en las ER. Lamentablemente, debido al exiguo tamaño y baja marca de las muestras de ER, debimos renunciar, con las técnicas empleadas, a separar las especies de SM con AG s+m de aquéllas con h-V, lo que nos impidió determinar si la marcación con $[\text{H}]^3\text{16:0}$ en h-V SM se incrementaba en las espermátidas, como se había anticipado.

El hecho de que, utilizando $[\text{H}]^3\text{16:0}$ como precursor, tanto EP como ER sintetizaron cantidades significativamente menores de GlcCer que de SM contrastó con los ensayos iniciales con NBD-C6-Cer como sustrato, en los que la GlcCer fue sintetizada más activamente que la SM en cualquiera de estos tres estadios de diferenciación. Una posibilidad para explicar esta diferencia es que, además de contener un AG "inusual" para las células (el C6-NBD, **Figura 3**), la concentración de la NBD-C6-Cer utilizada, 1 μM , era bastante alta con respecto a la fisiológica. Eso podría haber resultado en un cierto grado de toxicidad para las células, las cuales podrían favorecer la síntesis de NBD-6-GlcCer como una forma de preservar su supervivencia. Como se demostró en células tumorales, una forma de evadir la toxicidad de la Cer, aún la que contiene AG comunes, es metabolizarla a un compuesto menos dañino, como lo es la GlcCer (Lucci *et al.*, 1999). Sin embargo, el uso

de NBD-Cer como sustrato, además de “saltar” el paso catalizado por la CerS3, *excluye* la posibilidad de *detectar* (aún si estuviera ocurriendo) la biosíntesis de especies de SM o de GlcCer con AG *distintos* del C6-NBD fluorescente que este sustrato tiene unido a la esfingosina.

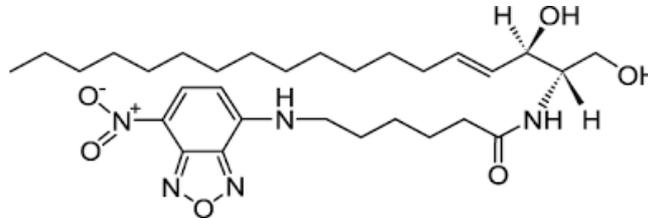
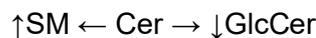


Figura 3. Estructura molecular de la NBD-C6-Cer.

En SC de rata en cultivo, el empleo de [¹⁴C]colina y [³H]16:0, más inhibidores similares a los utilizados en esta tesis para las CG, habían demostrado que dichas células somáticas son capaces de sintetizar Cer y SM con AG saturados (16:0) y monoinsaturados (24:1) por la vía *de novo* (Ziulkoski *et al.*, 2001a). Notablemente, estos dos grupos de especies también se separan entre sí por TLC. La incorporación de [¹⁴C]colina en ellas permitió ver que se sintetizan a distinta velocidad, y que aproximadamente un 15% de la SM total lo hace en la membrana plasmática (Ziulkoski *et al.*, 2001b).

• **Influencia de la testosterona sobre la biosíntesis de Cer, SM y GlcCer**

En el presente estudio se mostró que esta hormona esteroidea (Tes) ejerció un efecto hasta el presente no reportado sobre la biosíntesis *de novo* de SL en las células espermatogénicas aisladas en cultivo. Mientras el nivel de marcación con [³H]16:0 de la Cer no se vio afectado por la presencia de Tes ni en las CT ni en ninguno de los dos estadios celulares aquí analizados, la marca de GlcCer disminuyó, y la de SM se estimuló, en las CT. Notablemente, el efecto de Tes sobre el equilibrio



observado en las CT, se recapituló en las ER, y no tuvo lugar en los EP. Este resultado sugirió que la Tes desvió el equilibrio de esta reacción hacia la izquierda en las ER, favoreciendo en ellas la utilización de las Cer para formar SM. Tal vez estimuló a una isoforma de Cer sintasa que produjo relativamente más (s+m) Cer, las cuales fueron utilizadas por una o ambas SM sintasas en estudio, disminuyendo así la disponibilidad de estas Cer como sustratos para la GlcCer sintasa.

La espermatogénesis y la fertilidad masculina dependen de la presencia de Tes en el testículo, cuya acción es mediada por el receptor de andrógenos (AR), un miembro de la superfamilia de los receptores nucleares. En ausencia de Tes o del AR, la

espermatogénesis no prosigue más allá del estadio meiótico (Yeh *et al.*, 2002; De Gendt *et al.*, 2004), llamativamente algo similar a lo que ocurre en ausencia de síntesis de los SL con VLCPUFA (Rabionet *et al.*, 2008).

En la literatura ha sido ampliamente aceptado el rol crucial de las células de Sertoli como principal blanco celular de la Tes, bajo cuyos efectos ellas producen múltiples señales que pueden inducir, en forma paracrina, o yuxtacrina (por contacto célula-célula) tanto la proliferación y la diferenciación como la muerte de las CG. La delección del AR funcional en las SC de ratones resulta en la deficiencia de procesos de adhesión celular que afectan la fertilidad. Específicamente, se ha demostrado que dicho receptor es requerido: i) para mantener la integridad de las uniones entre SC que forman la barrera hemato-testicular (Meng *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2006; Willems *et al.*, 2010), cuya desestructuración expone a las CG al ataque autoinmune y a factores citotóxicos; ii) para mantener las conexiones entre las SC y las espermátidas haploides, en ausencia de las cuales se bloquea la conversión de las ER en espermátidas elongadas; y iii) para la liberación de las espermátidas maduras de sus uniones con las SC (Holdcraft y Braun, 2004).

Recapitulando someramente el mecanismo de acción canónico o “clásico” de la Tes, se acepta que comienza con la difusión de la hormona a través de la membrana plasmática, y su unión al AR que se encuentra en el citoplasma secuestrado por proteínas entre las cuales hay dos proteínas de *shock* térmico. Al unir su ligando, la Tes, un cambio conformacional en el AR permite su liberación y su translocación al núcleo celular. Allí el AR se une a secuencias específicas de ADN llamadas elementos de respuesta a andrógenos (ARE), donde recluta co-activadores y/o co-represores que regulan la expresión génica y la función celular (Shang y Myers, 2002; Walker, 2009). Estos efectos, antes denominados “genómicos” de la Tes son lentos, ocurriendo luego de varias horas, dado que requieren de la transcripción de genes y de la neosíntesis de proteínas.

Además de la vía clásica, la Tes actúa mediante vías de señalización “no clásicas” en otras células, incluyendo a las ampliamente estudiadas SC. Ambas vías son activas en SC y contribuyen al mantenimiento de la espermatogénesis y la fertilidad masculina (Walker, 2010). En SC son operativos al menos dos mecanismos no clásicos de acción de la Tes. El primero de ellos involucra la unión de la Tes al AR que se encuentra en el interior celular, el cual recluta y activa a la tirosina quinasa Scr, que a su vez fosforila y activa al receptor de membrana EGFR (receptor del factor de crecimiento epidermal). Este receptor estimula la cascada intracelular de las MAP quinasa, que involucra la activación secuencial de Raf, MEK y ERK quinasa. ERK fosforila una quinasa (Xing *et al.*, 1996) que fosforila y activa al factor de transcripción CREB (Fix *et al.*, 2004) lo que resulta en la transcripción de genes

CREB-dependientes (Cheng *et al.*, 2007). Esta vía es mucho más rápida que la anterior, ya que involucra proteínas pre-existentes en las células.

El segundo mecanismo no clásico de acción de la Tes en las SC implica el rápido incremento (segundos a unos pocos minutos) de la concentración intracelular de iones Ca^{2+} . El hecho de que este incremento es abolido en presencia de EGTA y de inhibidores de canales de Ca^{2+} tipo L, indicó que la Tes estimula el influjo de Ca^{2+} extracelular a través de dichos canales (Gorzynska y Handelsman, 1995; Lyng *et al.*, 2000). En el grupo de trabajo de Wasserman se demostró que la Tes, también en forma rápida, induce la depolarización de la membrana de la SC, lo cual es bloqueado en presencia de inhibidores de los canales K^+ATP (Von Ledebur *et al.*, 2002). Estudios ulteriores de este mismo grupo (Loss *et al.*, 2004) mostraron que tanto el cambio del potencial de membrana como el influjo de calcio ($^{45}\text{Ca}^{2+}$) mediados por Tes son bloqueados por un inhibidor de la fosfolipasa C (PLC) y por la toxina *pertussis*, lo que indicó que la Tes causa la activación de un receptor de membrana acoplado a proteína G (GPCR), y que ésta sería una proteína de tipo Gq, esto es, capaz de estimular a una PLC que hidroliza al PIP2 para dar inositol-3-fosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG). La disminución de la cantidad de PIP2 en la membrana inhibe los canales de K^+ATP , causando la depolarización de la membrana y la entrada de Ca^{2+} a través de los canales de Ca^{2+} tipo L (Loss *et al.*, 2004).

Empleando por separado inhibidores y activadores específicos de las vías de señalización tanto clásica como no clásica de la Tes, se concluyó que *ambas* vías llevan a cabo funciones que si bien en parte se superponen son esenciales para el soporte de la espermatogénesis (Toocheck *et al.*, 2016). Por ejemplo, estos estudios revelaron que la espermatogénesis se bloquea *in vivo* durante la meiosis si se inhibe la vía no clásica, aún si la vía clásica está funcionalmente activa.

• Testosterona y esfingolípidos

Los resultados presentados en esta tesis sobre los efectos de la Tes son originales y novedosos ya que implican, por una parte, que las ER haploides poseen una forma del AR que es funcional y por otra, sugieren que la unión de la Tes al mismo, a través de su activación, regularía en forma positiva (*upregulation*), la biosíntesis de SM con VLCPUFA en ellas.

Son muy escasos en la bibliografía los antecedentes que relacionen la biosíntesis de SL con la posible regulación por Tes en células animales, y hasta ahora no los hay en células espermatogénicas. Un estudio *in vivo* en ratas muestra que la administración subcutánea de Tes aumenta el contenido total de Cer y de glicolípidos neutros y ácidos en el riñón, con aumentos importantes de GlcCer y de otros GSL. El porcentaje relativo de AG

no hidroxilados e hidroxilados también se afectó por la Tes (Dahiya *et al.*, 1990). Otro estudio *in vivo* indirectamente relacionado corresponde a ensayos clínicos realizados en hombres con hipogonadismo, en los que se determinaron cambios en la composición lipídica de las membranas de eritrocitos con la terapia de reemplazo con Tes (Angelova *et al.*, 2012). La Tes indujo en los eritrocitos de los pacientes un aumento en el contenido de fosfatidiletanolamina y de SM, mientras que produjo una ligera disminución de AG saturados y un aumento relativo de especies con PUFA en la fosfatidilcolina. Dichos cambios, acompañados por un aumento en la relación Col/FL, indujeron un aumento en la fluidez de la membrana plasmática eritrocitaria. Por último, mencionaremos un estudio más reciente, en el hígado de ratones macho gonadectomizados y tratados con reemplazo hormonal (Norheim *et al.*, 2018). La gonadectomía aumentó los niveles de expresión de CerS6 en el hígado, aumentando los niveles relativos de Cer con 16:0, 18:0, y 20:0. Tras ese efecto, la terapia de reemplazo con Tes indujo la disminución en la síntesis de estas Cer, que estuvo asociada a la reducción de la expresión, tanto del ARNm como de la proteína, de la CerS6.

En nuestro estudio, el aumento de la biosíntesis de SM en presencia de Tes por parte de las células totales aisladas del epitelio seminífero (CT), en su inmensa mayoría espermatogénicas, no se vio acompañado por un aumento en la expresión génica ni de *CerS3*, ni de *SMS1*, ni de *GlcCerS* a nivel ARNm. Inesperadamente, se detectó una *disminución* significativa de los niveles del transcripto de *SMS2* en la presencia de la hormona. En conjunto, los resultados obtenidos hasta el momento sugieren que el efecto estimulador de la Tes sobre la biosíntesis de SM en las ER no se debería a la *upregulación* de la transcripción de genes implicados en su biosíntesis. Sin embargo, es necesario tener en cuenta que el número de horas transcurridas en los ensayos, tanto de actividad como de expresión de genes a nivel ARNm, fueron lo suficientemente largos como para poder sugerir mecanismos de acción de la hormona.

La disminución del ARNm producto del gen *SMS2* por la Tes podría estar asociada a regulación negativa (*downregulation*) de la *expresión* del gen por la hormona por la vía clásica. Sin embargo, también podría especularse que la Tes podría interactuar por la vía no clásica con un GPCR de membrana asociado a una proteína Gq, que ésta estimularía a una PLC de la misma a generar DAG (Loss *et al.*, 2004), lo que a su vez podría llevar la *reducción* de los niveles de SM en la membrana plasmática, al desplazar el siguiente equilibrio hacia la izquierda, mediado por la inhibición de, o interferencia con, la acción de la *SMS2* existente en la misma.



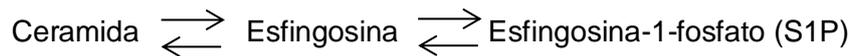
Si bien por el momento esto no es más que una especulación, una consecuencia indirecta de esta *reducción* de SM y Cer localizadas en la membrana plasmática podría potencialmente ser, tiempo después, el *aumento* de la promoción de la formación de SM por biosíntesis *de novo* en sitios intracelulares.

Otro hallazgo novedoso fue que la Tes estimuló la expresión de los genes *Elovl5* y *Fa2h* en las células espermatoogénicas en cultivo. Esto evidencia, por primera vez, que la Tes podría jugar un rol importante en su diferenciación al estimular la síntesis de PUFA de 20 y 22 carbonos y también la 2-hidroxilación de VLCPUFA, en ambos casos regulando positivamente la transcripción génica de estas enzimas clave.

Existen antecedentes en la literatura de que la Tes regula la biosíntesis de PUFA en diferentes células. En cultivos de hepatocitos (Marra *et al.*, 1988) y de SC (Hurtado de Catalfo y de Gómez Dumm, 2005) de rata, la Tes *disminuyó* la actividad de las $\Delta 5$ y $\Delta 6$ desaturasas. En SC, la expresión génica (ARNm) de 4 desaturasas, incluyendo las dos nombradas y dos esteroil-CoA desaturasas, no fue afectada por la Tes (Sæther *et al.*, 2003). En células de neuroblastoma humano en cultivo, la suplementación con Tes *disminuyó* el contenido de PUFA de la serie n-3 y los niveles del ARNm del gen $\Delta 5$ desaturasa (Extier *et al.*, 2009), mientras la suplementación con 17- β -estradiol (E2) generó el efecto contrario.

En nuestros experimentos de biosíntesis llevados a cabo durante 20 horas de incubación, la posibilidad de que los efectos fueran en parte mediados por la acción del E2 debía tenerse en cuenta. Dada la presencia de la enzima aromatasa en las CG, particularmente concentrada en las espermátidas elongadas (Carreau y Hess, 2010), se podría especular que parte de la Tes se pudiera haber aromatizado a E2, el cual podría responder por los efectos observados. La aromatasa parece jugar un rol crucial en la homeostasis de los niveles de Tes y de E2 en el epitelio seminífero. Los estrógenos son considerados biológicamente relevantes en la espermatogénesis y esenciales para una completa maduración y diferenciación de las CG (Carreau *et al.*, 2011). Esto había sido demostrado por el hallazgo de que animales *knockout* para la aromatasa (ArKO) y para el receptor alfa (ER α KO) de estrógenos presentan arresto de la espermatogénesis e incapacidad de las CG para diferenciarse (Robertson *et al.*, 1999, 2002). Los estrógenos, como la Tes, actúan en forma canónica o "clásica" modulando la expresión génica al unirse a receptores de estrógeno alfa y beta (ER α y ER β , hoy denominados ER1 y ER2), de los cuales hay varias isoformas, y en forma "no-clásica" lo hacen por activación del GPER (antes conocido como GPR-30), un GPCR asociado a membranas intracelulares, que ha sido demostrado tanto en células somáticas (Lucas *et al.*, 2010) como espermatoogénicas, especialmente activo en células haploides (Carreau *et al.*, 2011; Chimento *et al.*, 2014).

Sumado a este hecho, los estrógenos modulan vías de señalización intracelulares que involucran a los SL. En la última década, ciertos metabolitos de los SL y sus receptores de membrana han sido añadidos a la lista de mediadores activados por los estrógenos en las redes de señalización que involucran a los receptores de factores de crecimiento, promoviendo la proliferación y la diferenciación celular, por lo que tienen notoria relevancia en células tumorales (Sukocheva *et al.*, 2003, 2009). Los SL pueden controlar la velocidad de proliferación celular a través del equilibrio conocido como el “reóstato” de SL:



En la vía hacia la izquierda, interviene una S1P fosfatasa para formar esfingosina, la cual es utilizada por una Cer sintasa para formar Cer “pro-apoptótica”. En la vía hacia la derecha, Cer puede ser deacilada por la ceramidasa para formar esfingosina, la cual puede ser fosforilada por la esfingosina-quinasa para dar la molécula “pro-supervivencia” S1P, por lo que ésta y sus receptores median acciones de citoquinas, factores de crecimiento y hormonas (Alvarez *et al.*, 2007). Los estrógenos estimulan la supervivencia celular a través de la aumentada formación de S1P. Ésta puede ser liberada y unirse a una serie de receptores ligados a membrana que están acoplados a distintas proteínas G (GPCR₁₋₅) capaces de iniciar una multitud de cascadas de señalización intracelulares, algunas de las cuales llevan a la antiapoptosis y a la proliferación celular (Sukocheva y Wadham, 2014).

Aunque no hemos hallado en la literatura evidencias bioquímicas de los efectos del E2 sobre las vías *biosintéticas* de lípidos en CG, en otros sistemas se ha reportado un efecto de esta hormona sobre la actividad de las desaturasas necesarias para la formación de PUFA. Entre estos, se ha visto en hepatocitos de rata en cultivo que el E2 inhibe (cuando la Tes no afecta) la biosíntesis de 20:4 y la actividad de la Δ5 desaturasa (Marra *et al.*, 1988), mientras ambas hormonas estimulan la biosíntesis de 18:1, lo que implica un estímulo de la actividad Δ9 desaturasa (Marra y de Alaniz, 1995).

Nuestros resultados mostraron que la presencia de E2 disminuyó la expresión de los transcritos de *CerS3* y *SMS2* en las CG. Si bien las diferencias no fueron significativas, también tendieron a disminuir en presencia de E2 los ARNm de *SMS1* y de *GlcCerS*. Aún faltaría determinar si esto se correlaciona con una disminución de la biosíntesis de Cer y de SM con VLCPUFA en CG cultivadas en presencia de E2. De ser así, esto permitiría descartar la posibilidad de que el efecto positivo de Tes sobre la biosíntesis de SM en CG es mediado por su conversión a E2.

En el mismo sentido, nuestros datos también mostraron que los niveles de ARNm de los genes involucrados en la síntesis de PUFA/VLCPUFA aquí estudiados (*Elovl5*, *Elovl2*, *Elovl4* y *Fa2h*) no se vieron afectados por la exposición de CG a E2, lo cual implica que la

upregulación de *Elovl5* y *Fa2h* por Tes fue un resultado de la acción directa de esta hormona. Teniendo en cuenta que los dos genes más afectados por la Tes en su expresión, si bien en sentidos opuestos, fueron *SMS2* y *Fa2h*, que ambos se expresaron más en las espermatidas que en los EP, y que detectamos un pequeño pero significativo aumento en la biosíntesis de especies de SM con VCLPUFA en las ER, nuestros resultados nos permiten concluir que la Tes regula positivamente la biosíntesis de dichas especies específicamente en células postmeióticas, y refuerza la posibilidad de que los receptores de Tes sean mediadores de dicha acción.

● **Influencia de factores solubles liberados por las SC sobre la biosíntesis de Cer, SM y GlcCer, en ausencia y en presencia de Tes**

Es conocido el hecho de que las SC secretan varios factores que son requeridos para el desarrollo exitoso de las espermatogonias en espermatozoides (Dal Secco *et al.*, 2008; Starace *et al.*, 2008; Mital *et al.*, 2010; Campese *et al.*, 2014; Dimitriadis *et al.*, 2015; de França *et al.*, 2016). Entre estos se incluyen: i) glicoproteínas transportadoras de iones, como la transferrina y la ceruloplasmina, o de hormonas, como la proteína unidora de andrógenos (ABP); ii) proteasas e inhibidores de proteasas; iii) factores de crecimiento, como factor de crecimiento transformante α y β (TGF- α y TGF- β), factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF), factor de células madre (SCF), también conocido como “ligando *kit*”, y ácido retinoico; iv) hormonas, como inhibina B y la hormona anti-Mülleriana (AMH); v) nutrientes y metabolitos, como carbohidratos y sus metabolitos (especialmente el lactato), aminoácidos, vitaminas, lípidos e iones; y vi) otros péptidos y proteínas estructurales, como cadherinas, colágeno y laminina.

En un estudio multicéntrico reciente, el análisis proteómico de vesículas extracelulares (VE) liberadas por SC prepúberes porcinas permitió identificar varias proteínas cuya acción es mediada por unión a un receptor (Mancuso *et al.*, 2018). Unas 29 de ellas son secretadas en VE a niveles basales desde las SC, esto es, sin mediar estímulos, pero la abundancia de algunas de estas proteínas es estimulada por la FSH y la de otras por la Tes. Entre estas últimas se incluyen las inhibinas A y B, el activador tisular del plasminógeno, la proteína semejante al factor de crecimiento epidérmico 8, el factor de alargamiento 1-gamma y la D-3-fosfoglicerato deshidrogenasa.

En nuestro caso, cuando agregamos a las células en estudio el MCS, medio condicionado obtenido de cultivos primarios de SC prepúberes de rata en estado basal (esto es, sin ningún estímulo hormonal), pudimos ver que factores solubles contenidos en él fueron capaces de estimular la biosíntesis de Cer en todas sus especies moleculares, tanto en EP como en ER. Dichos factores favorecieron la biosíntesis de GlcCer *sólo en los EP* y

estimularon mucho la biosíntesis de SM *sólo en las ER*. Esta respuesta celular fue muy llamativa, sugiriendo la posible expresión en las CG, dependiente del estadio de maduración celular, de receptores para algunos de los factores proteicos del MCS.

Por su parte, si en el medio de cultivo de las CG se encontraba presente la Tes, la suplementación con el MCS estimuló significativamente, con respecto al efecto del MCS sólo, la síntesis de GlcCer, *ahora sólo en las ER*, y la síntesis de SM, *ahora sólo en los EP* sin modificar el nivel de marca proveniente del [³H]16:0 en la Cer.

Entre los numerosos factores secretados por las SC, la proteína unidora de andrógenos (ABP, por *androgen binding protein*) es una interesante candidata en responder por la promoción de los efectos de la Tes, teniendo en cuenta 1) que ABP es la proteína transportadora de andrógenos desde las SC a las CG, 2) que éstas poseen sitios de unión para ella en sus membranas plasmáticas, 3) que la ABP unida a la Tes es internalizada en las CG a través de un camino endocitótico que involucra estructuras cubiertas con clatrina, y 4) que hay diferencias en la velocidad de internalización de la ABP en las CG dependiendo de su estado de maduración (Gerard, 1995). Llamativamente, la ABP por sí misma, esto es, en ausencia de hormonas esteroidales, tiene efectos yuxtacrinos específicos, como modificar el nivel de ARNm de la proteína de transición 1 (Tnp1, por *transition protein 1*), involucrada en el reemplazo de histona a protamina que tiene lugar durante la transformación nuclear de las espermátidas (Della-Maria *et al.*, 2002).

Contrariamente al aumento de la *actividad* biosintética de SL observado en las células expuestas al MCS (aumento de [³H]Cer en CT, que se recapituló en aumento de [³H]Cer y [³H]GlcCer en EP y de [³H]Cer y [³H]SM en ER), los niveles de ARNm de *CerS3*, *SMS1* y *SMS2* en CT tendieron a disminuir, mientras los de *GlcCerS* no cambiaron. Esta diferencia sugiere que entre los factores liberados por las SC, sea como moléculas solubles o incluidas en vesículas extracelulares, podrían ser transportadas algunas con funciones represoras de la transcripción de genes específicos. Estas podrían ser por ejemplo microARNs, o bien ligandos que desencadenen señales intracelulares inhibitorias de la transcripción. Por lo tanto, la mayor actividad biosintética detectada cuando las células fueron expuestas al MCS no se debería a moléculas estimulantes de la transcripción génica, sino a moléculas entre las cuales podría haber sustratos energéticos, co-activadores de enzimas, factores tróficos, proteínas transportadoras de metabolitos hidrofóbicos, y otras.

Del mismo modo que para los genes de las sintasas de SL, la expresión de los niveles del ARNm de las tres elongasas de ácidos grasos aquí estudiadas disminuyó significativamente en las CT suplementadas con el MCS, mientras que los niveles de *Fa2h* no fueron modificados por este medio. Llamativamente, la presencia de Tes junto al MCS

incrementó el nivel de ARNm de *Elovl5* y *Fa2h*, sin modificar los de *Elovl2* y *Elovl4*, algo similar a lo observado en las CT suplementadas sólo con Tes, reforzando el rol de esta hormona en la regulación positiva de la transcripción de estos dos genes.

Determinar cuáles son los factores liberados por las células de Sertoli (libres o encapsulados en microvesículas) que influyen en forma directa sobre la biosíntesis de los esfingolípidos en células espermatogénicas en distintos estadios de diferenciación requerirá de ulteriores investigaciones en el futuro. En conjunto, los resultados presentados en este capítulo son el paso inicial a un promisorio trayecto que permitirá contribuir al conocimiento de las posibles vías endocrinas, paracrinas, autocrinas, y aún intracrinas, que regulan la biosíntesis y las funciones de los esfingolípidos, en particular aquellos con VLCPUFA, en las células germinales.

CONCLUSIONES

Los resultados presentados en esta tesis permitieron arribar a hallazgos y conclusiones de interés sobre la localización subcelular, la biosíntesis, y la expresión de genes de enzimas involucradas en la biosíntesis de especies moleculares de esfingomielina (SM) y ceramida (Cer) con ácidos grasos (AG) poliinsaturados de muy larga cadena (VLCPUFA), tanto no hidroxilados (n-V) como 2-hidroxilados (h-V), durante el proceso de diferenciación de las células germinales o espermatogénicas (CG) de rata. Se compararon espermatoцитos en paquiteno (EP), espermátidas redondas (ER) y espermátidas ya en proceso de elongación, o tardías (ET). En algunos casos se incluyeron los cuerpos residuales (CR) de la espermiogénesis, y las células de Sertoli (SC).

Capítulo I

- ▶ A partir de poblaciones de CG en cada uno de los tres estadios de diferenciación, se separaron tres fracciones de membrana empleando un método que se basa en diferencias de densidad. Su caracterización a nivel proteico y lipídico permitió concluir que dos de ellas, que denominamos membranas livianas (ML) y membranas pesadas (MP), fueron ricas en dominios tipo *raft* y *no-raft*, respectivamente, proviniendo *principalmente* de las membranas plasmáticas, mientras la tercera, que denominamos por su mayor densidad membranas extra-pesadas (MEP), agrupó un conjunto de membranas intracelulares.
- ▶ Contrario a lo generalmente aceptado, la relación colesterol/SM y colesterol/GPL fue *menor* en las fracciones ML que en las MP. Atribuimos eso al alto grado de insaturación de los lípidos en la fracción MP. Así, la SM de las ML fue rica en 16:0, mientras la SM de las MP lo fue en especies con VLCPUFA (n-V y h-V). Similarmente, los GPL de las ML contuvieron 16:0 y otros AG saturados, mientras en los de las MP predominaron las especies con PUFA (20:4n-6, 22:5n-6).
- ▶ Se obtuvo evidencia directa de que el proceso de diferenciación impacta sobre la distribución *lateral* del colesterol y de la SM entre las pequeñas ML y las abundantes MP.
- ▶ Con el avance de la diferenciación en el sentido EP→ER→ET, los ácidos grasos de la SM y de los GPL de las ML se mantuvieron casi sin cambio. Por el contrario, en las MP, y también en las MEP, la relación h-V/n-V aumentó en la SM, y la relación 22:5n-6/20:4n-6 aumentó en los GPL.
- ▶ De acuerdo con la interpretación de que contienen membranas intracelulares donde se localiza la biosíntesis de esfingolípidos, las MEP contuvieron más cantidad de Cer y menos de SM que las MP. Con el avance de la diferenciación, aumentó la relación h-V/n-V en la Cer de *ambas* membranas. La presencia de Cer en la membrana plasmática de las espermátidas es consistente con resultados previos que la localizan allí.

► En conjunto, los resultados permiten concluir que, tal como lo están los GPL con PUFA, las SM (y también las Cer) con VLCPUFA se encuentran *excluidas* de los microdominios tipo *raft* de las membranas plasmáticas. La región *no-raft* de la membrana plasmática es pues el principal escenario de la remodelación que experimentan los lípidos durante la diferenciación de las células espermatogénicas.

Capítulo II

► En CG, fue evidente la asociación entre los niveles de expresión de Elov14 y Fa2h, como proteínas, con las diferencias en las proporciones relativas de n-V y h-V en SM y Cer de espermatoцитos y espermátidas observadas en el capítulo anterior. Así, entre las poblaciones de CG estudiadas, las mayores concentraciones de Elov14 y de Fa2h se observaron en los EP y en las ET, respectivamente. La ausencia de las dos proteínas en las SC también coincidió con la previamente demostrada carencia en ellas de SL con n-V y h-V. Todo ello permite concluir que en el testículo adulto Elov14 y Fa2h son productos exclusivos de las células germinales, y que están implicadas en la biosíntesis de los VLCPUFA que se concentran en sus esfingolípidos.

► La expresión a nivel ARNm del gen *Elov14* no guardó correlación con la abundancia relativa de la proteína Elov14 (o de sus productos, los n-V). Así, entre las CG, el orden de abundancia del ARNm fue EP<ER<ET y el de la proteína EP>ER>ET. Asimismo, en función del desarrollo postnatal, mientras la proteína Elov14 no se detectó en el testículo hasta la aparición de los EP y las primeras ER, el ARNm de *Elov14* estuvo presente desde mucho antes, en edades infantiles e incluso previas (en la ausencia de CG).

► Un hallazgo sorprendente, que permitió explicar lo anterior, fue que el ARNm de *Elov14* mostró niveles muy altos en las SC. Eso se vio en SC aisladas de animales sexualmente inmaduros, y también en testículos de animales adultos que habían perdido sus CG (con permanencia de las SC) por exposiciones a la hipertermia.

► Al comparar los niveles de ARNm con el avance de la maduración sexual de *Elov15*, *Elov12* y *Elov14* (las tres elongasas que colaboran en la formación de PUFA y VLCPUFA de los lípidos testiculares), el primero se mantuvo relativamente constante, el segundo aumentó masivamente, y el tercero fue el único en disminuir, entre P14 y la adultez. En las CG, el orden de abundancia de estos ARNm fue *Elov12*>>*Elov15*>*Elov14*, mientras en las SC el orden fue virtualmente el opuesto, *Elov14*>>*Elov15*>*Elov12*.

► Utilizando [³H]20:4n-6 como precursor, la capacidad de elongación de PUFA en las CG puso en evidencia la actividad combinada de Elov15, Elov12 y Elov14, las dos primeras elongando el [³H]20:4 a [³H]22:4 y [³H]24:4, y la tercera utilizando a este último como sustrato para producir AG tetraenoicos progresivamente más largos (hasta [³H]28:4n-6).

Paralelamente se manifestaron activas desaturasas, ya que se formaron [^3H]22:5 y [^3H]24:5, que a su vez fueron en parte elongados a n-V pentaenoicos (hasta [^3H]32:5n-6).

► Ambas actividades, elongación y desaturación, fueron máximas en los EP, disminuyendo con la diferenciación en el sentido EP→ER→ET. Consistentemente con la carencia de la proteína *Elovl4*, las SC no produjeron PUFA de más de 24 carbonos.

► A nivel ARNm, *Fa2h* sólo comenzó a expresarse durante el desarrollo postnatal a partir de la aparición de las ER (P26). Entre las células espermatogénicas del adulto, los niveles de su ARNm fueron menores en los EP que en las ER y ET. En contraste con el ARNm de *Elovl4*, en testículos de adultos que habían sido despojados de sus CG con permanencia de SC, el ARNm de *Fa2h* virtualmente desapareció, en consistencia con el hecho de que las SC no expresaron dicho ARNm.

► Como proteína, *Fa2h* se incrementó con el tiempo de desarrollo. En cortes de tejido adulto se la encontró especialmente concentrada en las ET, asociada a una estructura supranuclear que juega un rol importante en dar la forma definitiva a la cabeza de los futuros espermatozoides. Ni *Elovl4* ni *Fa2h* se detectaron las gametas liberadas desde el epitelio seminífero.

Capítulo III

► Las CG aisladas fueron capaces de biosintetizar por sí mismas sus propios SL Cer, SM y GlcCer, incluyendo especies moleculares con VCLPUFA, a partir de [^3H]16:0. Una parte importante de dicha biosíntesis tuvo lugar a través de la vía *de novo*, como lo indicó el hecho de que la incorporación de [^3H]16:0 en ellos fue drásticamente reducida por L-cicloserina y fumonisina B1, inhibidores específicos de dos pasos clave de la misma.

► La capacidad para sintetizar los tres [^3H]SL *de novo* disminuyó varias veces con la diferenciación en el sentido EP→ER.

► La presencia de testosterona (Tes) en los cultivos no afectó la marcación de [^3H]Cer, [^3H]SM o [^3H]GlcCer en los EP. En cambio tendió a estimular la biosíntesis de SM y a inhibir la de GlcCer en las ER.

► La suplementación con medio condicionado obtenido de cultivos de células de Sertoli (MCS) incentivó significativamente la biosíntesis de [^3H]Cer tanto en EP como en ER. Por su parte, estimuló la biosíntesis de [^3H]SM sólo en las ER y la de [^3H]GlcCer sólo en los EP.

► En comparación con el MCS sólo, la combinación MCS+Tes, no afectó la ya elevada formación de [^3H]Cer total en EP y en ER. En cambio, estimuló dramáticamente la biosíntesis de [^3H]SM en los EP mientras la redujo en las ER. Al mismo tiempo, redujo la marcación de [^3H]GlcCer en los EP mientras la aumentó en las ER.

- ▶ Con respecto a las especies moleculares de Cer y de SM, los efectos estimulatorios sobre el valor control que ejercieron la Tes sobre la biosíntesis de [³H]SM y el MCS sobre la biosíntesis de [³H]Cer y de [³H]SM incluyeron tanto a las especies con s+m+h-V como a las especies con n-V, es decir, tendieron a ser globales.
- ▶ El efecto inhibitorio (con respecto al MCS) que ejerció la combinación MCS+Tes, sobre la marcación de [³H]SM en las ER tampoco fue selectivo con respecto a las especies. Llamativamente, el neto efecto estimulatorio de MCS+Tes sobre la biosíntesis de SM en los EP y de Cer en las ER se ejerció específicamente sobre las especies [³H]n-V SM y [³H] n-V Cer.
- ▶ Coincidentemente con su mayor capacidad biosintética de [³H]Cer con n-V y h-V, los EP expresaron los más altos niveles de ARNm de *CerS3*. Dicha expresión disminuyó con la diferenciación en el sentido EP→ER→ET. Las SC no expresaron *CerS3*.
- ▶ Los niveles de ARNm de *SMS1* no cambiaron con la diferenciación (EP≈ER≈ET), mientras la *SMS2* mostró su expresión máxima en las ER (EP<ER>ET). Para la expresión de *GlcCerS*, el orden fue EP≥ER≥ET. Aunque en niveles mucho menores que las CG, las SC también expresaron estas tres sintasas.
- ▶ Los ARNm de las cuatro sintasas estudiadas se encontraron también concentrados en los cuerpos residuales.
- ▶ Los efectos de la Tes, del MCS, y de su combinación sobre los niveles de ARN de las cuatro sintasas de SL mencionadas, así como de las tres elongasas de AG y de *Fa2h*, se estudiaron con respecto a sus correspondientes controles en CT.
- ▶ La Tes estimuló significativamente la expresión de *Elovl5* y *Fa2h* a nivel ARNm. El MCS inhibió significativamente la expresión de las tres elongasas (*Elovl5*, *Elovl2* y *Elovl4*). La Tes y el MCS, por separado, inhibieron significativamente la expresión de *SMS2*. Cuando Tes y MCS se combinaron, se incrementó la expresión de *Elovl5* y *Fa2h*, y continuaron inhibidas las expresiones de *Elovl2* y *Elovl4*, además de la de *SMS2*.
- ▶ En resumen, los niveles del ARNm de *Elovl2* y *Elovl4* son regulados por el MCS, los de *Elovl5* por ambos, MCS y Tes, y los de *Fa2h* sólo por la Tes. Estos resultados muestran que la testosterona y moléculas liberadas desde las células de Sertoli son capaces de estimular la biosíntesis *de novo* de esfingolípidos en las células espermatoogénicas y de regular, en algunos casos a la alta y en otros a la baja, la expresión génica de algunas de las enzimas responsables de dicha biosíntesis.

REFERENCIAS

- Agbaga M-P, Brush RS, Mandal MNA, Henry K, Elliott MH, Anderson RE** (2008) Role of Stargardt-3 macular dystrophy protein (ELOVL4) in the biosynthesis of very long chain fatty acids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105** 12843–12848.
- Ahmed N, Yufei H, Yang P, Muhammad Yasir W, Zhang Q, Liu T, Hong C, Lisi H, Xiaoya C, Chen Q** (2016) Cytological study on Sertoli cells and their interactions with germ cells during annual reproductive cycle in turtle. *Ecology and Evolution* **6** 4050–4064.
- Alderson NL, Maldonado EN, Kern MJ, Bhat NR, Hama H** (2006) FA2H-dependent fatty acid 2-hydroxylation in postnatal mouse brain. *Journal of Lipid Research* **47** 2772–2780.
- Alderson NL, Rembiesa BM, Walla MD, Bielawska A, Bielawski J, Hama H** (2004) The human FA2H gene encodes a fatty acid 2-hydroxylase. *Journal of Biological Chemistry* **279** 48562–48568.
- Alvarez SE, Milstien S, Spiegel S** (2007) Autocrine and paracrine roles of sphingosine-1-phosphate. *Trends in Endocrinology & Metabolism* **18** 300–307.
- Angelova P, Momchilova A, Petkova D, Staneva G, Pankov R, Kamenov Z** (2012) Testosterone replacement therapy improves erythrocyte membrane lipid composition in hypogonadal men. *The Aging Male* **15** 173–179.
- Anić M y Mesarić M** (1998) The influence of sex steroid hormones on ganglioside biosynthesis in rat kidney. *Biological Chemistry* **379** 693–698.
- Aureli M, Grassi S, Sonnino S, Prinetti A** (2016) Isolation and Analysis of Detergent-Resistant Membrane Fractions. En *Lipid Signaling Protocols*, 2^o Edición. *Humana Press*, págs. 107–131.
- Aveldaño MI** (1987) A novel group of very long chain polyenoic fatty acids in dipolyunsaturated phosphatidylcholines from vertebrate retina. *Journal of Biological Chemistry* **262** 1172–1179.
- Aveldaño MI y Sprecher H** (1987) Very long chain (C24 to C36) polyenoic fatty acids of the n-3 and n-6 series in dipolyunsaturated phosphatidylcholines from bovine retina. *Journal of Biological Chemistry* **262** 1180–1186.
- Aveldaño MI, Robinson BS, Johnson DW, Poulos A** (1993) Long and very long chain polyunsaturated fatty acids of the n-6 series in rat seminiferous tubules. *Journal of Biological Chemistry* **268** 11663–11669.
- Bajpai M, Gupta G, Jain SK, Setty BS** (2009) Lipid metabolising enzymes in isolated rat testicular germ cells and changes associated with meiosis. *Andrologia* **30** 311–315.
- Beckman JK y Coniglio JG** (1979) A comparative study of the lipid composition of isolated rat sertoli and germinal cells. *Lipids* **14** 262–267.
- Beckman JK, Gray ME, Coniglio JG** (1978) The lipid composition of isolated rat spermatids and spermatocytes. *Biochimica et Biophysica Acta* **530** 367–374.
- Bieri JG y Prival EL** (1965) Lipid composition of testes from various species. *Comparative Biochemistry and Physiology* **15** 275–282.
- Bligh EG y Dyer WJ** (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemical Physiology* **37** 911–917.
- Brown DA y London E** (2000) Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts. *Journal of Biological Chemistry* **275** 17221–17224.
- Brown DA y Rose JK** (1992) Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell* **68** 533–544.
- Cameron DJ, Tong Z, Yang Z, Kaminoh J, Kamiyah S, Chen H, Zeng J, Chen Y, Luo L, Zhang K** (2007) Essential role of Elovl4 in very long chain fatty acid synthesis, skin permeability barrier function, and neonatal survival. *International Journal of Biological Sciences* **3** 111–119.
- Campese AF, Grazioli P, de Cesaris P, Riccioli A, Bellavia D, Pelullo M, Padula F, Noce C, Verkhovskaia S, Filippini A** (2014) Mouse Sertoli cells sustain de novo generation of regulatory T cells by triggering the Notch pathway through soluble JAGGED11. *Biology of Reproduction* **90** 1–10.

- Carreau S y Hess RA** (2010) Oestrogens and spermatogenesis. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* **365** 1517–1535.
- Carreau S, Bois C, Zanatta L, Silva FRMB, Bouraima-Lelong H, Delalande C** (2011) Estrogen signaling in testicular cells. *Life Sciences* **89** 584–587.
- Chakraborty M y Jiang X-C** (2013) Sphingomyelin and its role in cellular signaling. *Advances in Experimental Medicine and Biology* **991** 1–14.
- Cheng CY y Mruk DD** (2012) The blood-testis barrier and its implications for male contraception. *Pharmacological Reviews* **64** 16–64.
- Cheng J, Watkins SC, Walker WH** (2007) Testosterone activates mitogen-activated protein kinase via Src kinase and the epidermal growth factor receptor in Sertoli cells. *Endocrinology* **148** 2066–2074.
- Chimento A, Sirianni R, Casaburi I, Pezzi V** (2014) GPER signaling in spermatogenesis and testicular tumors. *Frontiers in Endocrinology* **5** 30.
- Christie WW** (2012) Lipid analysis, 4^o Edición. *Pergamon Press*.
- Cinti DL, Cook L, Nagi MN, Suneja SK** (1992) The fatty acid chain elongation system of mammalian endoplasmic reticulum. *Progress in Lipid Research* **31** 1–51.
- Clermont Y y Rambourg A** (1978) Evolution of the endoplasmic reticulum during rat spermiogenesis. *American Journal of Anatomy* **151** 191–211.
- Clifton RJ, O'Donnell L, Robertson DM** (2002) Pachytene spermatocytes in co-culture inhibit rat Sertoli cell synthesis of inhibin beta B-subunit and inhibin B but not the inhibin alpha-subunit. *The Journal of Endocrinology* **172** 565–574.
- Colombo M, Raposo G, Théry C** (2014) Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **30** 255–289.
- Coniglio JG, Grogan WM, Rhamy RK** (1975) Lipid and fatty acid composition of human testes removed at autopsy. *Biology of Reproduction* **12** 255–259.
- Coniglio JG, Whorton AR, Beckman JK** (1977) Essential fatty acids in testes. *Advances in Experimental Medicine and Biology* **83** 575–589.
- Connor WE, Lin DS, Wolf DP, Alexander M** (1998) Uneven distribution of desmosterol and docosahexaenoic acid in the heads and tails of monkey sperm. *Journal of Lipid Research* **39** 1404–1411.
- Dahiya R, Sharma A, Narayan P** (1990) Effect of testosterone on the glycosphingolipid composition of the rat kidney. *Biomedica Biochimica Acta* **49** 1195–1201.
- Dal Secco V, Riccioli A, Padula F, Ziparo E, Filippini A, Secco VD, Riccioli A, Padula F, Ziparo E, Filippini A** (2008) Mouse Sertoli cells display phenotypical and functional traits of antigen-presenting cells in response to interferon gamma. *Biology of Reproduction* **242** 234–242.
- De França LR, Hess RA, Dufour JM, Hofmann MC, Griswold MD** (2016) The Sertoli cell: One hundred fifty years of beauty and plasticity. *Andrology* **4** 189–212.
- De Gendt K, Swinnen J V., Saunders PTK, Schoonjans L, Dewerchin M, Devos A, Tan K, Atanassova N, Claessens F, Lecureuil C** (2004) A Sertoli cell-selective knockout of the androgen receptor causes spermatogenic arrest in meiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **101** 1327–1332.
- Della-Maria J, Gerard A, Franck P, Gerard H** (2002) Effects of androgen-binding protein (ABP) on spermatid Tnp1 gene expression in vitro. *Molecular and Cellular Endocrinology* **198** 131–141.
- Dimitriadis F, Tsiampali C, Chaliasos N, Tsounapi P, Takenaka A, Sofikitis N** (2015) The sertoli cell as the orchestra conductor of spermatogenesis: Spermatogenic cells dance to the tune of testosterone. *Hormones* **14** 479–503.
- Dym M y Fawcett DW** (1970) The blood-testis barrier in the rat and the physiological compartmentation of the seminiferous epithelium. *Biology of Reproduction* **3** 308–326.

- Dym M y Romrell LJ** (1975) Intraepithelial lymphocytes in the male reproductive tract of rats and rhesus monkeys. *Journal of Reproduction and Fertility* **42** 1–7.
- Eckhardt M, Yaghoofam A, Fewou SN, Zöller I, Gieselmann V** (2005) A mammalian fatty acid hydroxylase responsible for the formation of alpha-hydroxylated galactosylceramide in myelin. *The Biochemical Journal* **388** 245–254.
- Evans HM, Lepkovsky S, Murphy EA, Plate B** (1934) Vital need of the body for certain unsaturated fatty acids: VI. Male sterility on fat-free diets. *Journal of Biological Chemistry* **106** 445–450.
- Extier A, Perruchot M-H, Baudry C, Guesnet P, Lavialle M, Alessandri J-M** (2009) Differential effects of steroids on the synthesis of polyunsaturated fatty acids by human neuroblastoma cells. *Neurochemistry International* **55** 295–301.
- Fix C, Jordan C, Cano P, Walker WH** (2004) Testosterone activates mitogen-activated protein kinase and the cAMP response element binding protein transcription factor in Sertoli cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **101** 10919–10924.
- Furland NE, Maldonado EN, Aveldaño MI** (2003) Very long chain PUFA in murine testicular triglycerides and cholesterol esters. *Lipids* **38** 73–80.
- Furland NE, Zanetti SR, Oresti GM, Maldonado EN, Aveldaño MI** (2007a) Ceramides and sphingomyelins with high proportions of very long-chain polyunsaturated fatty acids in mammalian germ cells. *Journal of Biological Chemistry* **282** 18141–18150.
- Furland NE, Maldonado EN, Aresti PA, Aveldaño MI** (2007b) Changes in lipids containing long- and very long-chain polyunsaturated fatty acids in cryptorchid rat testes. *Biology of Reproduction* **77** 181–188.
- Furland NE, Luquez JM, Oresti GM, Aveldaño MI** (2011) Mild testicular hyperthermia transiently increases lipid droplet accumulation and modifies sphingolipid and glycerophospholipid acyl chains in the rat testis. *Lipids* **46** 443–454.
- Futerman AH y Riezman H** (2005) The ins and outs of sphingolipid synthesis. *Trends in Cell Biology* **15** 312–318.
- Gelly J-L, Richoux J-P, Grignon G** (1994) Immunolocalization of albumin and transferrin in germ cells and Sertoli cells during rat gonadal morphogenesis and postnatal development of the testis. *Cell and Tissue Research* **276** 347–351.
- Gerard A** (1995) Endocytosis of androgen-binding protein (ABP) by spermatogenic cells. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **53** 533–542.
- Gorczyńska E y Handelsman DJ** (1995) Androgens rapidly increase the cytosolic calcium concentration in Sertoli cells. *Endocrinology* **136** 2052–2059.
- Grayson C y Molday RS** (2005) Dominant negative mechanism underlies autosomal dominant Stargardt-like macular dystrophy linked to mutations in ELOVL4. *Journal of Biological Chemistry* **280** 32521–32530.
- Gregory MK, Gibson RA, Cook-Johnson RJ, Cleland LG, James MJ** (2011) Elongase reactions as control points in long-chain polyunsaturated fatty acid synthesis. *PLoS ONE* **6** 1–9.
- Griswold MD** (1993) Unique Aspects of the Biochemistry and Metabolism of Sertoli Cells. En *The Sertoli Cell*, 1° Edición. Cache River Press, págs. 485–492.
- Griswold MD** (1998) The central role of Sertoli cells in spermatogenesis. *Seminars in Cell & Developmental Biology* **9** 411–416.
- Grogan WM, Box B, Station MC V** (1984) Metabolism of arachidonate in rat testis: characterization of 26-30 carbon polyenoic acids. *Lipids* **19** 341–346.
- Gunasekar PG, Kumaran B, Govindarajulu P** (1991) Role of prolactin on Leydig, Sertoli and germ cellular neutral lipids in bonnet monkeys, *Macaca radiata*. *Endocrinología Japonica* **38** 1–8.
- Hakomori S e Igarashi Y** (1995) Functional role of glycosphingolipids in cell recognition and signaling. *Journal of Biochemistry* **118** 1091–1103.

- Hamanaka S, Hara M, Nishio H, Otsuka F, Suzuki A, Uchida Y** (2002) Human epidermal glucosylceramides are major precursors of stratum corneum ceramides. *Journal of Investigative Dermatology* **119** 416–423.
- Han IS, Sylvester SR, Kim KH, Schelling ME, Venkateswaran S, Blanckaert VD, McGuinness MP, Griswold MD** (1993) Basic fibroblast growth factor is a testicular germ cell product which may regulate Sertoli cell function. *Molecular Endocrinology* **7** 889–897.
- Hannun YA y Luberto C** (2004) Lipid metabolism: Ceramide transfer protein adds a new dimension. *Current Biology* **14** 163–165.
- Harkewicz R, Du H, Tong Z, Alkuraya H, Bedell M, Sun W, Wang X, Hsu Y-H, Esteve-Rudd J, Hughes G** (2012) Essential role of ELOVL4 protein in very long chain fatty acid synthesis and retinal function. *Journal of Biological Chemistry* **287** 11469–11480.
- Hasegawa H, Terada Y, Ugajin T, Yaegashi N, Sato K** (2010) A novel culture system for mouse spermatid maturation which produces elongating spermatids capable of inducing calcium oscillation during fertilization and embryonic development. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* **27** 565–570.
- Heckert L y Griswold MD** (1993) Expression of the FSH receptor in the testis. *Recent Progress in Hormone Research* **48** 61–77.
- Heerklotz H, Szadkowska H, Anderson T, Seelig J** (2003) The sensitivity of lipid domains to small perturbations demonstrated by the effect of triton. *Journal of Molecular Biology* **329** 793–799.
- Hellemans J, Mortier G, De Paepe A, Speleman F, Vandesompele J** (2007) qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biology* **8** R19.
- Hikim APS, Lue Y, Diaz-Romero M, Yen PH, Wang C, Swerdloff RS** (2003) Deciphering the pathways of germ cell apoptosis in the testis. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **85** 175–182.
- Holdcraft RW y Braun RE** (2004) Androgen receptor function is required in Sertoli cells for the terminal differentiation of haploid spermatids. *Development* **131** 459–467.
- Holstein AF, Schulze W, Davidoff M** (2003) Understanding spermatogenesis is a prerequisite for treatment. *Reproductive Biology and Endocrinology* **1** 1–16.
- Holub BJ y Skeaff CM** (1987) Nutritional regulation of cellular phosphatidylinositol. *Methods in Enzymology* **141** 234–244.
- Huitema K, Van Den Dikkenberg J, Brouwers JFHM, Holthuis JCM** (2004) Identification of a family of animal sphingomyelin synthases. *EMBO Journal* **23** 33–44.
- Hurtado de Catalfo GE y de Gómez Dumm INT** (2005) Influence of testosterone on polyunsaturated fatty acid biosynthesis in Sertoli cells in culture. *Cell Biochemistry and Function* **23** 175–180.
- Jakobsson A, Westerberg R, Jacobsson A** (2006) Fatty acid elongases in mammals: Their regulation and roles in metabolism. *Progress in Lipid Research* **45** 237–249.
- Janecki A, Jakubowiak A, Steinberger A** (1988) Effect of germ cells on vectorial secretion of androgen binding protein and transferrin by immature rat Sertoli cells in vitro. *Journal of Andrology* **9** 126–132.
- Jeckel D, Karrenbauer A, Burger KNJ, van Meer G, Wieland F** (1992) Glucosylceramide is synthesized at the cytosolic surface of various Golgi subfractions. *Journal of Cell Biology* **117** 259–267.
- Jennemann R, Rabionet M, Gorgas K, Epstein S, Dalpke A, Rothermel U, Bayerle A, van der Hoeven F, Imgrund S, Kirsch J** (2012) Loss of ceramide synthase 3 causes lethal skin barrier disruption. *Human Molecular Genetics* **21** 586–608.
- Johnson MH y Setchell BP** (1968) Protein and immunoglobulin content of rete testis fluid of rams. *Journal of Reproduction and Fertility* **17** 403–406.

- Johnston H, Baker PJ, Abel M, Charlton HM, Jackson G, Fleming L, Kumar TR, O'Shaughnessy PJ** (2004) Regulation of Sertoli cell number and activity by follicle-stimulating hormone and androgen during postnatal development in the mouse. *Endocrinology* **145** 318–329.
- Jun B, Mukherjee PK, Asatryan A, Kautzmann MA, Heap J, Gordon WC, Bhattacharjee S, Yang R, Petasis NA, Bazan NG** (2017) Elovans are novel cell-specific lipid mediators necessary for neuroprotective signaling for photoreceptor cell integrity. *Scientific Reports* **7** 1–14.
- Karl AF y Griswold MD** (1990) Sertoli cells of the testis: Preparation of cell cultures and effects of retinoids. *Methods in Enzymology* **190** 71–75.
- Kates M** (1972) Techniques in Lipidology, 1° Edición. Elsevier pág. 570.
- Kim H, Moon C, Shin T** (2008) Immunohistochemical study of flotillin-1 in the rat testis during postnatal development. *Acta Histochemica* **110** 224–231.
- Kittel A y Bácsy E** (1994) Ecto-ATPases and 5'-nucleotidases in the caveolae of smooth muscle. Enzyme-histochemical evidence may indicate a role for caveolae in neurotransmission. *Cell Biology International* **18** 875–880.
- Knobil E y Neill JD** (2006) Knobil and Neill's Physiology of Reproduction, 3° Edición. Elsevier.
- Korenbrodt CC, Huhtaniemi IT, Weiner RI** (1977) Prepubertal separation as an external sign of pubertal development in the male rat. *Biology of Reproduction* **17** 298–303.
- Kwak DH, Seo BB, Chang KT, Choo YK** (2011) Roles of gangliosides in mouse embryogenesis and embryonic stem cell differentiation. *Experimental and Molecular Medicine* **43** 379.
- Laemmli UK** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227** 680–685.
- Lagali PS, Liu J, Ambasudhan R, Kakuk LE, Bernstein SL, Seigel GM, Wong PW, Ayyagari R** (2003) Evolutionarily conserved ELOVL4 gene expression in the vertebrate retina. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* **44** 2841–2850.
- Lanning LL, Creasy DM, Chapin RE, Mann PC, Barlow NJ, Regan KS, Goodman DG** (2002) Recommended approaches for the evaluation of testicular and epididymal toxicity. *Toxicologic Pathology* **30** 507–520.
- Le Magueresse B, Pineau C, Guillou F, Jegou B** (1988) Influence of germ cells upon transferrin secretion by rat Sertoli cells in vitro. *Journal of Endocrinology* **118** 13–16.
- Lee NPY, Mruk DD, Xia W, Cheng CY** (2007) Cellular localization of sphingomyelin synthase 2 in the seminiferous epithelium of adult rat testes. *Journal of Endocrinology* **192** 17–32.
- Leonard AE, Kelder B, Bobik EG, Chuang L-T, Lewis CJ, Kopchick JJ, Mukerji P, Huang Y-S** (2002) Identification and expression of mammalian long-chain PUFA elongation enzymes. *Lipids* **37** 733–740.
- Li W, Sandhoff R, Kono M, Zerfas P, Hoffmann V, Char B, Ding H, Proia RL, Deng C-X** (2007) Depletion of ceramides with very long chain fatty acids causes defective skin permeability barrier function, and neonatal lethality in ELOVL4 deficient mice. *International Journal of Biological Sciences* **3** 120–128.
- Loss ES, Jacobsen M, Costa ZS, Jacobus AP, Borelli F, Wassermann GF** (2004) Testosterone modulates K + ATP channels in Sertoli cell membrane via the PLC-PIP 2 pathway. *Hormone and Metabolic Research* **36** 519–525.
- Lucas TFG, Royer C, Siu ER, Lazari MFM, Porto CS** (2010) Expression and signaling of G protein-coupled estrogen receptor 1 (GPER) in rat Sertoli cells. *Biology of Reproduction* **83** 307–317.
- Lucci A, Giuliano AE, Han TY, Dinur T, Liu YY, Senchenkov A, Cabot MC** (1999) Ceramide toxicity and metabolism differ in wild-type and multidrug-resistant cancer cells. *International Journal of Oncology* **15** 535–575.
- Luria A, Vegelyte-Avery V, Stith B, Tsvetkova NM, Wolkers WF, Crowe JH, Tablin F, Nuccitelli R** (2002) Detergent-free domain isolated from *Xenopus* egg plasma membrane with properties similar to those of detergent-resistant membranes. *Biochemistry* **41** 13189–13197.

- Lyng FM, Jones GR, Rommerts FFG** (2000) Rapid androgen actions on calcium signaling in rat Sertoli cells and two human prostatic cell lines: Similar biphasic responses between 1 picomolar and 100 nanomolar concentrations. *Biology of Reproduction* **63** 736–747.
- Maldonado EN, Alderson NL, Monje P V., Wood PM, Hama H** (2008) FA2H is responsible for the formation of 2-hydroxy galactolipids in peripheral nervous system myelin. *Journal of Lipid Research* **49** 153–161.
- Mancuso F, Calvitti M, Milardi D, Grande G, Falabella G, Arato I, Giovagnoli S, Vincenzoni F, Mancini F, Nastruzzi C** (2018) Testosterone and FSH modulate Sertoli cell extracellular secretion: Proteomic analysis. *Molecular and Cellular Endocrinology* **476** 1–7.
- Mandal M, Ambasudhan R, Wong PW, Gage P, Sieving PA, Ayyagari R** (2003) Mouse ELOVL4 genomic organization, spatial and temporal expression. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* **44** 5095–5095.
- Marra CA, de Alaniz MJT, Brenner RR** (1988) Effect of various steroids on the biosynthesis of arachidonic acid in isolated hepatocytes and HTC cells. *Lipids* **23** 1053–1058.
- Marra CA y de Alaniz MJT** (1995) Regulatory effect of various steroid hormones on the incorporation and metabolism of [¹⁴C]stearate in rat hepatoma cells in culture. *Molecular and Cellular Biochemistry* **145** 1–9.
- Marzouki ZM y Coniglio JG** (1982) Effect of essential fatty acid deficiency on lipids of rat Sertoli and germinal cells. *Biology of Reproduction* **27** 312–315.
- Marzouki ZM y Coniglio JG** (1984) The effects of hypophysectomy and testosterone treatment on the composition and metabolism of testicular lipids. *Lipids* **19** 609–616.
- Meng J, Holdcraft RW, Shima JE, Griswold MD, Braun RE** (2005) Androgens regulate the permeability of the blood-testis barrier. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **102** 16696–16700.
- Merrill AH Jr.** (2002) *De novo* sphingolipid biosynthesis: A necessary, but dangerous, pathway. *Journal of Biological Chemistry* **277** 25843–25846.
- Mital P, Hinton BT, Dufour JM** (2011) The blood-testis and blood-epididymis barriers are more than just their tight junctions. *Biology of Reproduction* **84** 851–858.
- Mital P, Kaur G, Dufour JM** (2010) Immunoprotective Sertoli cells: Making allogeneic and xenogeneic transplantation feasible. *Reproduction* **139** 495–504.
- Mizutani Y, Kihara A, Igarashi Y** (2006) LASS3 (longevity assurance homologue 3) is a mainly testis-specific (dihydro)ceramide synthase with relatively broad substrate specificity. *The Biochemical Journal* **398** 531–538.
- Mizutani Y, Mitsutake S, Tsuji K, Kihara A, Igarashi Y** (2009) Ceramide biosynthesis in keratinocyte and its role in skin function. *Biochimie* **91** 784–790.
- Monneron A y D'Alayer J** (1978a) Isolation of plasma and nuclear membranes of thymocytes. I. Enzymatic composition and ultrastructure. *Journal of Cell Biology* **77** 211–231.
- Monneron A y D'Alayer J** (1978b) Isolation of plasma and nuclear membranes of thymocytes. II. Biochemical composition. *Journal of Cell Biology* **77** 232–245.
- Moon Y-A, Hammer RE, Horton JD** (2009) Deletion of ELOVL5 leads to fatty liver through activation of SREBP-1c in mice. *Journal of Lipid Research* **50** 412–423.
- Mosmann T** (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* **65** 55–63.
- Nitta H, Bunick D, Hess RA, Janulis L, Newton SC, Millette CF, Osawa Y, Shizuta Y, Toda K, Bahr JM** (1993) Germ cells of the mouse testis express P450 aromatase. *Endocrinology* **132** 1396–1401.
- Norheim F, Bjellaas T, Hui ST, Chella Krishnan K, Lee J, Gupta S, Pan C, Hasin-Brumshtein Y, Parks BW, Li DY** (2018) Genetic, dietary, and sex-specific regulation of hepatic ceramides and the relationship between hepatic ceramides and IR. *Journal of Lipid Research* **59** 1164–1174.

- Ojeda S y Skinner M** (2006) Puberty in the Rat. In *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*, pp 2061–2126. Elsevier.
- 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. *Journal of Lipid Research* **51** 2600–2610.
- Oresti GM, Reyes JG, Luquez JM, Osses N, Furland NE, Aveldaño MI** (2010b) Differentiation-related changes in lipid classes with long-chain and very long-chain polyenoic fatty acids in rat spermatogenic cells. *Journal of Lipid Research* **51** 2909–2921.
- Oresti GM, Luquez JM, Furland NE, Aveldaño MI** (2011) Uneven distribution of ceramides, sphingomyelins and glycerophospholipids between heads and tails of rat spermatozoa. *Lipids* **46** 1081–1090.
- Oresti GM, García-López J, Aveldaño MI, del Mazo J** (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.
- Otto C, Rohde-Schulz B, Schwarz G, Fuchs I, Klewer M, Brittain D, Langer G, Bader B, Prella K, Nubbemeyer R** (2008) G protein-coupled receptor 30 localizes to the endoplasmic reticulum and is not activated by estradiol. *Endocrinology* **149** 4846–4856.
- Paulenz H, Taugbøl O, Hofmo PO, Saarem K** (1995) A preliminary study on the effect of dietary supplementation with cod liver oil on the polyunsaturated fatty acid composition of boar semen. *Veterinary Research Communications* **19** 273–284.
- Peñalva DA, Furland NE, López GH, Aveldaño MI, Antollini SS** (2013) Unique thermal behavior of sphingomyelin species with nonhydroxy and 2-hydroxy very-long-chain (C28-C32) PUFAs. *Journal of Lipid Research* **54** 2225–2235.
- Peñalva DA, Wilke N, Maggio B, Aveldaño MI, Fanani ML** (2014) Surface behavior of sphingomyelins with very long chain polyunsaturated fatty acids and effects of their conversion to ceramides. *Langmuir* **30** 4385–4395.
- Picut CA, Remick AK, de Rijk EP, Simons ML, Stump DG, Parker GA** (2015) Postnatal development of the testis in the rat: morphologic study and correlation of morphology to neuroendocrine parameters. *Toxicologic Pathology* **43** 326–342.
- Pike LJ** (2006) Rafts defined: a report on the Keystone symposium on lipid rafts and cell function. *Journal of Lipid Research* **47** 1597–1598.
- Pineau C, Le Magueresse B, Courtens J-L, Jégou B** (1991) Study in vitro of the phagocytic function of Sertoli cells in the rat. *Cell and Tissue Research* **264** 589–598.
- Poulos A, Johnson DW, Beckman K, White IG, Easton C** (1987) Occurrence of unusual molecular species of sphingomyelin containing 28-34-carbon polyenoic fatty acids in ram spermatozoa. *Biochemical Journal* **248** 961–964.
- Poulos A, Sharp P, Johnson D, White I, Fellenberg A** (1986) The occurrence of polyenoic fatty acids with greater than 22 carbon atoms in mammalian spermatozoa. *The Biochemical Journal* **240** 891–895.
- Rabionet M, Bayerle A, Jennemann R, Heid H, Fuchser J, Marsching C, Porubsky S, Bolenz C, Guillou F, Gröne HJ** (2015) Male meiotic cytokinesis requires ceramide synthase 3-dependent sphingolipids with unique membrane anchors. *Human Molecular Genetics* **24** 4792–4808.
- Rabionet M, Van Der Spoel AC, Chuang CC, Von Tümpling-Radosta B, Litjens M, Bouwmeester D, Hellbusch CC, Körner C, Wiegandt H, Gorgas K** (2008) Male germ cells require polyenoic sphingolipids with complex glycosylation for completion of meiosis: A link to ceramide synthase-3. *Journal of Biological Chemistry* **283** 13357–13369.
- Ramstedt B, Leppimäki P, Axberg M, Slotte JP** (1999) Analysis of natural and synthetic sphingomyelins using high-performance thin-layer chromatography. *European Journal of Biochemistry* **266** 997–1002.
- Ratajczak MZ y Ratajczak J** (2016) Horizontal transfer of RNA and proteins between cells by extracellular microvesicles: 14 years later. *Clinical and Translational Medicine* **5** 7.

- Retterstøl K, Hauger TB, Tran TN, Christophersen BO** (2001) Studies on the metabolism of essential fatty acids in isolated human testicular cells. *Reproduction* **121** 881–887.
- Reyes JG, Diaz A, Osses N, Opazo C, Benos DJ** (1997) On stage single cell identification of rat spermatogenic cells. *Biology of the Cell* **89** 53–66.
- Rival C, Theas MS, Guazzone VA, Lustig L** (2006) Interleukin-6 and IL-6 receptor cell expression in testis of rats with autoimmune orchitis. *Journal of Reproductive Immunology* **70** 43–58.
- Robertson KM, O'Donnell L, Jones ME, Meachem SJ, Boon WC, Fisher CR, Graves KH, McLachlan RI, Simpson ER** (1999) Impairment of spermatogenesis in mice lacking a functional aromatase (cyp 19) gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96** 7986–7991.
- Robertson KM, O'Donnell L, Simpson ER, Jones MEE** (2002) The phenotype of the aromatase knockout mouse reveals dietary phytoestrogens impact significantly on testis function. *Endocrinology* **143** 2913–2921.
- Robinson BS, Johnson DW, Poulos A** (1992) Novel molecular species of sphingomyelin containing 2-hydroxylated polyenoic very-long-chain fatty acids in mammalian testes and spermatozoa. *Journal of Biological Chemistry* **267** 1746–1751.
- Romrell LJ, Bellvé AR, Fawcett DW** (1976) Separation of mouse spermatogenic cells by sedimentation velocity. A morphological characterization. *Developmental Biology* **49** 119–131.
- Rotstein NP, Pennacchiotti GL, Sprecher H, Aveldaño MI** (1996) Active synthesis of C 24:5,n-3 fatty acid in retina. *Biochemical Journal* **316** 859–864.
- Rouser G, Fleischer 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** (1977) Movement of spermatocytes from the basal to the adluminal compartment of the rat testis. *The American Journal of Anatomy* **148** 313–328.
- Russell LD** (1978) The blood-testis barrier and its formation relative to spermatocyte maturation in the adult rat: A lanthanum tracer study. *The Anatomical Record* **190** 99–111.
- Russell LD** (1990) Histological and Histopathological Evaluation of the Testis. *Cache River Press*.
- Russell LD y de França LR** (1995) Building a testis. *Tissue and Cell* **27** 129–147.
- Russell LD, Goh JC, Rashed RM, Vogl AW** (1988) The consequences of actin disruption at Sertoli ectoplasmic specialization sites facing spermatids after in vivo exposure of rat testis to cytochalasin D. *Biology of Reproduction* **39** 105–118.
- Russell LD, Russell JA, MacGregor GR, Meistrich ML** (1991) Linkage of manchette microtubules to the nuclear envelope and observations of the role of the manchette in nuclear shaping during spermiogenesis in rodents. *American Journal of Anatomy* **192** 97–120.
- Sæther T, Tran TN, Rootwelt H, Christophersen BO, Haugen TB** (2003) Expression and regulation of $\Delta 5$ -desaturase, $\Delta 6$ -desaturase, stearoyl-Coenzyme A (CoA) desaturase 1, and stearoyl-CoA desaturase 2 in rat testis. *Biology of Reproduction* **69** 117–124.
- Sandhoff R** (2010) Very long chain sphingolipids: Tissue expression, function and synthesis. *FEBS Letters* **584** 1907–1913.
- Sandhoff R, Geyer R, Jennemann R, Paret C, Kiss E, Yamashita T, Gorgas K, Sijmonsma TP, Iwamori M, Finaz C** (2005) Novel class of glycosphingolipids involved in male fertility. *Journal of Biological Chemistry* **280** 27310–27318.
- Shang Y y Myers M** (2002) Formation of the androgen receptor transcription complex. *Molecular Cell* **9** 601–610.
- Shukla A, Shukla GS, Radin NS** (1992) Control of kidney size by sex hormones: possible involvement of glucosylceramide. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* **262** F24–F29.
- Simón L, Funes AK, Yapur MA, Cabrillana ME, Monclus MA, Boarelli PV, Vincenti AE, Saez Lancellotti TE, Fornés MW** (2017) Manchette-acrosome disorders during spermiogenesis and low efficiency of seminiferous tubules in hypercholesterolemic rabbit model. *PLOS ONE* **12** 1–19.

- Simons K e Ikonen E** (1997) Functional rafts in cell membranes. *Nature* **387** 569–572.
- Slotte JP** (2013) Biological functions of sphingomyelins. *Progress in Lipid Research* **52** 424–437.
- Smith BE y Braun RE** (2012) Germ cell migration across Sertoli cell tight junctions. *Science* **338** 798–802.
- Sofikitis N, Giotitsas N, Tsounapi P, Baltogiannis D, Giannakis D, Pardalidis N** (2008) Hormonal regulation of spermatogenesis and spermiogenesis. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **109** 323–330.
- Spiegel S y Milstien S** (2002) Sphingosine 1-Phosphate, a Key Cell Signaling Molecule. *Journal of Biological Chemistry* **277** 25851–25854.
- Sprecher H, Luthria DL, Mohammed BS, Baykousheva SP** (1995) Reevaluation of the pathways for the biosynthesis of polyunsaturated fatty acids. *Journal of Lipid Research* **36** 2471–2477.
- Starace D, Galli R, Paone A, Cesaris P De, Filippini A, Ziparo E, Riccioli A** (2008) Toll-like receptor 3 activation induces antiviral immune responses in mouse Sertoli cells. *Biology of Reproduction* **79** 766–775.
- Stoker TE, Parks LG, Gray LE, Cooper RL** (2000) Endocrine-disrupting chemicals: prepubertal exposures and effects on sexual maturation and thyroid function in the male rat. A focus on the EDSTAC recommendations. *Critical Reviews in Toxicology* **30** 197–252.
- Sukocheva O y Wadham C** (2014) Role of sphingolipids in oestrogen signalling in breast cancer cells: An update. *Journal of Endocrinology* **220** 25–35.
- Sukocheva O, Wadham C, Xia P** (2009) Role of sphingolipids in the cytoplasmic signaling of estrogens. *Steroids* **74** 562–567.
- Sukocheva OA, Wang L, Albanese N, Pitson SM, Vadas MA, Xia P** (2003) Sphingosine kinase transmits estrogen signaling in human breast cancer cells. *Molecular Endocrinology* **17** 2002–2012.
- Tafesse FG, Huitema K, Hermansson M, Van Der Poel S, Van Den Dikkenberg J, Uphoff A, Somerharju P, Holthuis JCM** (2007) Both sphingomyelin synthases SMS1 and SMS2 are required for sphingomyelin homeostasis and growth in human HeLa cells. *Journal of Biological Chemistry* **282** 17537–17547.
- Tafesse FG, Ternes P, Holthuis JCM** (2006) The multigenic sphingomyelin synthase family. *Journal of Biological Chemistry* **281** 29421–29425.
- Tani M, Ito M, Igarashi Y** (2007) Ceramide/sphingosine/sphingosine 1-phosphate metabolism on the cell surface and in the extracellular space. *Cellular Signalling* **19** 229–237.
- Toocheck C, Clister T, Shupe J, Crum C, Ravindranathan P, Lee T-K, Ahn J-M, Raj GV, Sukhwani M, Orwig KE** (2016) Mouse spermatogenesis requires classical and nonclassical testosterone signaling. *Biology of Reproduction* **94** 1–14.
- Uchida Y, Hama H, Alderson NL, Douangpanya S, Wang Y, Crumrine DA, Elias PM, Holleran WM** (2007) Fatty acid 2-hydroxylase, encoded by FA2H, accounts for differentiation-associated increase in 2-OH ceramides during keratinocyte differentiation. *Journal of Biological Chemistry* **282** 13211–13219.
- Umeda S, Ayyagari R, Suzuki MT, Ono F, Iwata F, Fujiki K, Kanai A, Takada Y, Yoshikawa Y, Tanaka Y** (2003) Molecular cloning of ELOVL4 gene from cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*). *Experimental Animals* **52** 129–135.
- Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M** (2007) Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nature Cell Biology* **9** 654–659.
- Vallés AS, Aveldaño MI, Furland NE** (2014) Altered lipid homeostasis in Sertoli cells stressed by mild hyperthermia. *PLoS ONE* **9** 91127.
- Van Meer G, Voelker DR, Feigenson GW** (2008) Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **9** 112–124.

- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn I, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman R** (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology* **3** 1–12.
- Vasireddy V, Uchida Y, Salem N, Kim SY, Mandal MNA, Reddy GB, Bodepudi R, Alderson NL, Brown JC, Hama H** (2007) Loss of functional ELOVL4 depletes very long-chain fatty acids ($\geq C28$) and the unique ω -O-acylceramides in skin leading to neonatal death. *Human Molecular Genetics* **16** 471–482.
- Vasireddy V, Wong P, Ayyagari R** (2010) Genetics and molecular pathology of Stargardt-like macular degeneration. *Progress in Retinal and Eye Research* **29** 191–207.
- Vigier M, Weiss M, Perrard MH, Godet M, Durand P** (2004) The effects of FSH and of testosterone on the completion of meiosis and the very early steps of spermiogenesis of the rat: an in vitro study. *Journal of Molecular Endocrinology* **33** 729–742.
- Vlachos IS, Paraskevopoulou MD, Karagkouni D, Georgakilas G, Vergoulis T, Kanellos I, Anastasopoulos IL, Maniou S, Karathanou K, Kalfakakou D** (2015) DIANA-TarBase v7.0: Indexing more than half a million experimentally supported miRNA:mRNA interactions. *Nucleic Acids Research* **43** D153–D159.
- Von Ledebur EICF, Almeida JP, Loss ES, Wassermann GF** (2002) Rapid effect of testosterone on rat Sertoli cell membrane potential. Relationship with K⁺ ATP channels. *Hormone and Metabolic Research* **34** 550–555.
- Voss A, Reinhart M, Sankarappa S, Sprechers H** (1991) Docosahexaenoic acid in rat liver is independent of a 4-desaturase. *Journal of Biological Chemistry* **266** 19.
- Walker WH** (2009) Molecular mechanisms of testosterone action in spermatogenesis. *Steroids* **74** 602–607.
- Walker WH** (2010) Non-classical actions of testosterone and spermatogenesis. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **365** 1557–1569.
- Wang J, Wreford NG, Lan HY, Atkins R, Hedger MP** (1994) Leukocyte populations of the adult rat testis following removal of the Leydig cells by treatment with ethane dimethane sulfonate and subcutaneous testosterone implants. *Biology of Reproduction* **51** 551–561.
- Wang RS, Yeh S, Chen LM, Lin HY, Zhang C, Ni J, Wu CC, Di Sant’Agnese PA, De Mesy-Bentley KL, Tzeng CR** (2006) Androgen receptor in Sertoli cell is essential for germ cell nursery and junctional complex formation in mouse testes. *Endocrinology* **147** 5624–5633.
- Weber JE, Russell LD, Wong V, Peterson RN** (1983) Three-dimensional reconstruction of a rat stage V Sertoli cell: II. Morphometry of Sertoli–Sertoli and Sertoli–germ-cell relationships. *American Journal of Anatomy* **167** 163–179.
- Widnell CC y Unkeless JC** (1968) Partial purification of a lipoprotein with 5'-nucleotidase activity from membranes of rat liver cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **61** 1050–1057.
- Willems A, Batlouni SR, Esnal A, Swinnen J V., Saunders PTK, Sharpe RM, de França LR, de Gendt K, Verhoeven G** (2010) Selective ablation of the androgen receptor in mouse sertoli cells affects sertoli cell maturation, barrier formation and cytoskeletal development. *PLoS ONE* **5** 1–16.
- Williams DB** (2006) Beyond lectins: the calnexin/calreticulin chaperone system of the endoplasmic reticulum. *Journal of Cell Science* **119** 615–623.
- Wong V y Russell LD** (1983) Three-dimensional reconstruction of a rat stage V Sertoli cell: I. Methods, basic configuration, and dimensions. *American Journal of Anatomy* **167** 143–161.
- Xing J, Ginty DD, Greenberg ME** (1996) Coupling of the RAS-MAPK pathway to gene activation by RSK2, a growth factor-regulated CREB kinase. *Science* **273** 959–963.
- Yeh S, Tsai M-Y, Xu Q, Mu X-M, Lardy H, Huang K-E, Lin H, Yeh S-D, Altuwaijri S, Zhou X** (2002) Generation and characterization of androgen receptor knockout (ARKO) mice: An in vivo model for the study of androgen functions in selective tissues. *PNAS* **99** 12509–12511.
- Yokoe Y y Hall PF** (1970) Testicular phospholipids: I. Action of follicle-stimulating hormone (FSH) upon the biosynthesis of phospholipids by rat testis. *Endocrinology* **86** 18–28.

- Young MM, Kester M, Wang H-G** (2013) Sphingolipids: regulators of crosstalk between apoptosis and autophagy. *Journal of Lipid Research* **54** 5–19.
- Zdravec D, Tvrđik P, Guillou H, Haslam R, Kobayashi T, Napier JA, Capecchi MR, Jacobsson A** (2011) ELOVL2 controls the level of n-6 28:5 and 30:5 fatty acids in testis, a prerequisite for male fertility and sperm maturation in mice. *Journal of Lipid Research* **52** 245–255.
- 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 Research* **67** 6973–6980.
- Zanetti SR, Monclus MA, Rensetti DE, Fornés MW, Aveldaño MI** (2010) Ceramides with 2-hydroxylated, very long-chain polyenoic fatty acids in rodents: From testis to fertilization-competent spermatozoa. *Biochimie* **92** 1778–1786.
- Zhang K, Kniazeva M, Han M, Li W, Yu Z, Yang Z, Li Y, Metzker ML, Allikmets R, Zack DJ** (2001) A 5-bp deletion in ELOVL4 is associated with two related forms of autosomal dominant macular dystrophy. *Nature Genetics* **27** 89–93.
- Zhang X-M, Yang Z, Karan G, Hashimoto T, Baehr W, Yang X-J, Zhang K** (2003) Elovl4 mRNA distribution in the developing mouse retina and phylogenetic conservation of Elovl4 genes. *Molecular Vision* **9** 301–307.
- Zhao F, Zhang J, Liu YS, Li L, He YL** (2011) Research advances on flotillins. *Virology Journal* **8** 2–7.
- Zheng W, Kollmeyer J, Symolon H, Momin A, Munter E, Wang E, Kelly S, Allegood JC, Liu Y, Peng Q** (2006) Ceramides and other bioactive sphingolipid backbones in health and disease: Lipidomic analysis, metabolism and roles in membrane structure, dynamics, signaling and autophagy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1758** 1864–1884.
- Zhu G, Koszelak-Rosenblum M, Connelly SM, Dumont ME, Malkowski MG** (2015) The crystal structure of an integral membrane fatty acid α -hydroxylase. *Journal of Biological Chemistry* **290** 29820–29833.
- Ziulkoski AL, Zimmer AR, Guma FCR** (2001a) De novo synthesis and recycling pathways of sphingomyelin in rat Sertoli cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **281** 971–975.
- Ziulkoski AL, Zimmer AR, Zanettini JS, Trugo LC, Guma FCR** (2001b) Synthesis and transport of different sphingomyelin species in rat Sertoli cells. *Molecular and Cellular Biochemistry* **219** 57–64.
- Zoller I, Meixner M, Hartmann D, Bussow H, Meyer R, Gieselmann V, Eckhardt M** (2008) Absence of 2-hydroxylated sphingolipids is compatible with normal neural development but causes late-onset axon and myelin sheath degeneration. *Journal of Neuroscience* **28** 9741–9754.

PUBLICACIONES Y PRESENTACIONES A CONGRESOS QUE SURGIERON COMO PARTE DE ESTA TESIS

• Publicaciones en revistas científicas

-*Elovl4 and Fa2h expression during rat spermatogenesis: a link to the very-long-chain PUFAs typical of germ cell sphingolipids*". Santiago Valtierra FX, Peñalva DA, Luquez JM, Furland NE, Vazquez C, Reyes JG, Aveldaño MI, Oresti GM. **Journal of Lipid Research**, 2018 May 3; 59: 1175-1189. doi: 10.1194/jlr.M081885. ISSN 0022-2275.

-*Sphingomyelins and ceramides with VLCPUFAs are excluded from low-density raft-like domains in differentiating spermatogenic cells*". Santiago Valtierra FX, Mateos MV, Aveldaño MI, Oresti GM. **Journal of Lipid Research**, 2017 Jan 12; 58:529-542. doi: 10.1194/jlr.M072595. ISSN 0022-2275.

-*Testosterone and soluble factors from Sertoli cells stimulate sphingolipid synthesis in germ cells*". Santiago Valtierra FX, Aveldaño MI, Oresti GM (en preparación).

• Presentaciones a Congresos

A) INTERNACIONALES

-*Sphingomyelins and ceramides with very-long-chain PUFA in membrane fractions and domains from rat spermatogenic cells*". Santiago Valtierra FX, Oresti GM, Mateos MV, Aveldaño MI. 56th Meeting of the International Conference on the Bioscience of Lipids (ICBL). Puerto Iguazú, Misiones, 22 al 26 de septiembre de 2015. Resumen publicado en libro de resúmenes de la Reunión (2015). Presentación P04.

B) NACIONALES

-*Testosterone and soluble factors from Sertoli cells stimulate sphingolipid synthesis in germ cells*". Santiago Valtierra FX; Aveldaño MI; Oresti GM. LIV Reunión Anual Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular. Paraná, Entre Ríos, Argentina, 5 al 8 de noviembre 2018. Resumen publicado en BIOCELL vol. 42 (suppl. 4), (2018) ISSN 1667-5746. Presentación LI-P01, pág. 90.

-*Enzymes involved in the biosynthesis of the very-long-chain polyunsaturated fatty acids of rat spermatogenic cell sphingolipids*". Santiago Valtierra FX; Oresti GM; Aveldaño MI. Reunión Conjunta de Sociedades de Biociencias. CABA, Buenos Aires, Argentina, 13 al 17 de noviembre de 2017. Resumen publicado en Medicina vol. 77 Supl. I (2017) ISSN 1669-9106. Presentación 508, pág. 119.

-*Biosíntesis de novo de especies moleculares poliinsaturadas de esfingomielina y ceramida en células espermatogénicas*". Santiago Valtierra FX, Aveldaño MI, Oresti GM. VII Jornadas de Bioquímica y Biología Molecular de Lípidos y Lipoproteínas. Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia de la Universidad Nacional de San Luis, San Luis, 17 y 18 de agosto de 2017. Comunicación 05, pág. 26 del Libro de Resúmenes de la reunión.

-*Expression of Elovl4 and Fa2h with spermatogenic cell differentiation in the rat testis*". Santiago Valtierra FX; Peñalva DA; Luquez JM; Furland NE; Aveldaño MI; Oresti GM. LII Reunión Anual Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular. Córdoba, Córdoba, 7 al 10 de noviembre 2016. Resumen publicado en BIOCELL vol. 40 (2016) ISSN 1667-5746. Comunicación LI-C05, pág. 37.

-*“Low-density membrane fractions from male germ cells lack sphingolipids with very long chain PUFA”*. Santiago Valtierra FX; Mateos MV; Aveldaño MI; Oresti GM. LII Reunión Anual Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular. Córdoba, Córdoba, 7 al 10 de noviembre 2016. Resumen publicado en BIOCELL vol. 40 (2016) ISSN 1667-5746. Comunicación LI-C06, págs. 37-38.

-*“Ether-linked lipids of rat developing and adult epididymis”*. Luquez JM; Santiago Valtierra FX; Oresti GM; Aveldaño MI; Furland NE. LII Reunión Anual Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular. Córdoba, Córdoba, 7 al 10 de noviembre 2016. Resumen publicado en Biocell vol. 40 (2016) ISSN 1667-5746. Comunicación LI-P14, pág. 105.

-*“Sphingomyelins with very long chain PUFA are excluded from raft membrane domains in male germ cells”*. Santiago Valtierra FX, Oresti GM, Mateos MV, Aveldaño MI. L Reunión Anual Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular. Rosario, Santa Fe, 11 al 14 de noviembre 2014. Resumen publicado en BIOCELL vol. 38 (2014) ISSN 0327-9545. Presentación P22, pág. 127.

-*“Cambios en la distribución de esfingomielina, glicerofosfolípidos y colesterol en fracciones de membrana de células espermatogénicas en diferenciación”*. Santiago Valtierra FX, Oresti GM, Mateos MV, Aveldaño MI. VI Jornadas de Bioquímica y Biología Molecular de Lípidos y Lipoproteínas. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral, Ciudad Universitaria, Santa Fe, 31 de julio y 1 de agosto 2014. Comunicación C13, pág. 26 del Libro de Resúmenes de la reunión.