

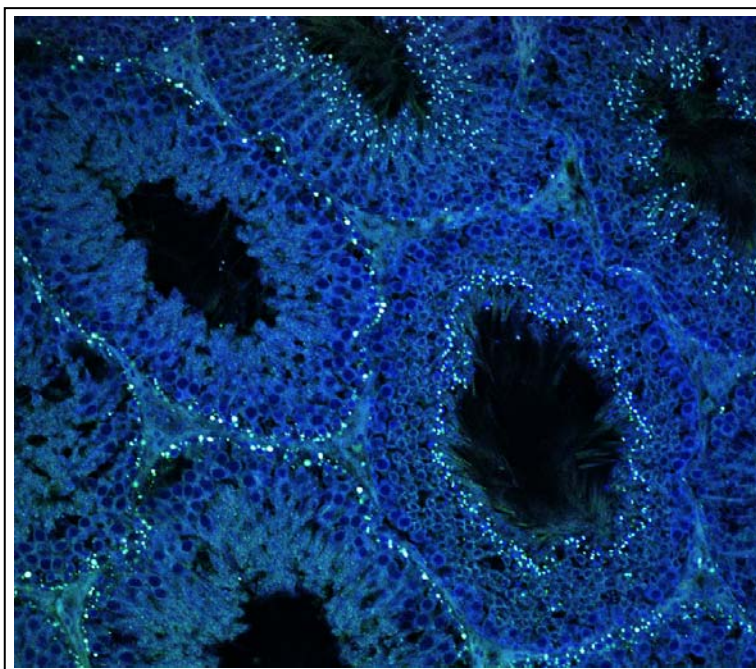


UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

TESIS

DOCTOR EN BIOQUÍMICA

**Lípidos con ácidos grasos poliinsaturados de larga y muy
larga cadena en células del epitelio seminífero y
espermatozoides**



GERARDO MARTÍN ORESTI

BAHÍA BLANCA

ARGENTINA

2008



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

**TESIS
DOCTOR EN BIOQUÍMICA**

**Lípidos con ácidos grasos poliinsaturados de larga y muy
larga cadena en células del epitelio seminífero y
espermatozoides**

GERARDO MARTÍN ORESTI

BAHÍA BLANCA

ARGENTINA

2008

PREFACIO

"Esta tesis se presenta como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Doctor en Bioquímica de la Universidad 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 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 10 de agosto de 2004 y el 15 de Diciembre de 2008, bajo la dirección de la Dra. Marta Isabel Aveldaño, Profesor Titular de la Universidad del Sur e Investigador Principal del CONICET."


Los estudios realizados en esta tesis fueron financiados con subsidios otorgados por el CONICET (PIP), por la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (PICT 01-12621) y por la Universidad Nacional del Sur (24/B134 y 24/B096). A estas instituciones y al Instituto de Investigaciones Bioquímica de Bahía Blanca (INIBIBB) les agradezco el haberme brindado los recursos materiales y humanos para emprender mis estudios de postgrado y realizar esta tesis doctoral, sin los cuales no hubiera sido posible concretar esta etapa.

15 de Diciembre de 2008

Gerardo Martín Oresti

Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

	<p>UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR Secretaría General de Posgrado y Educación Continua</p> <p>La presente tesis ha sido aprobada el .../.../..., mereciendo la calificación de(.....)</p>
---	--

A mis padres, Graciela y Jorge

A mi mitad, Jessica

A mis ojos, Martina

A la memoria de mi abuelo, Bernardo y mi suegra, Marta.

AGRADECIMIENTOS

- *A mi directora de tesis, la Dra. Marta Aveldaño, por su generosidad al brindarme la oportunidad de ser su dirigido, por sus apreciados y relevantes aportes, críticas y comentarios, por su humildad para transmitir sus notables conocimientos y asistirme en los momentos más difíciles, por su contagioso espíritu de trabajo y constantes palabras de aliento.*
- *A la Dra. Natalia Furland, por su asistencia permanente, su convicción en mi trabajo, su colaboración en la realización y discusión de las experiencias, que han ocupado, al igual que su valiosa amistad, un lugar central en la concreción de este trabajo.*
- *A Pablo Ayuza, por su colaboración y compañía durante las horas lerdas de experimentos.*
- *A los integrantes de la Cátedra de Anátomo-Histología por introducirme en el camino de la Ciencia y su apoyo constante durante esta etapa.*
- *A la Dra. Mari Pediconi, por el invaluable apoyo que me brindó como becario del CONICET*
- *Al CONICET por distinguirme con una beca de postgrado para realizar esta tesis.*
- *A los grupos del piso, al grupo de la Dra. Norma Giusto y al grupo de los Dres. Nora Rotstein y Luis Politi porque me permitieron encontrar el apoyo y un ámbito de trabajo con una gran calidad humana.*
- *Al Dr. Ricardo Ferreira y al Físico Luis Reyes por su valiosa ayuda y experto asesoramiento en los experimentos de irradiación.*
- *Al Dr. Juan G. Reyes, quien generosamente me brindó la oportunidad de trabajar en su laboratorio en la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso en Chile, Institución a la cual le agradezco su maravillosa hospitalidad.*
- *A la Secretaria General de Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional del Sur, por su ayuda económica durante mi estancia en Chile.*
- *A todos mis compañeros del INIBIBB que de una u otra manera han colaborado con esta tarea.*

Resumen

El objetivo de esta tesis fue el de reunir información sobre la bioquímica de los lípidos con ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) de larga y muy larga cadena (VLCPUFA) que abundan en células del tracto reproductor masculino. Utilizando ratas adultas como modelo, se investigaron tres sistemas: el tejido testicular *in vivo*, influido por agentes que afectan la espermatogénesis, células germinales en dos etapas distintas de su diferenciación, aisladas a partir del epitelio seminífero, y espermatozoides maduros, aislados de la región caudal del epidídimo.

La primera parte se centró en buscar evidencia que permitiera relacionar los lípidos en estudio con los tipos celulares presentes en los túbulos seminíferos, células germinales y de Sertoli. Se estudiaron los efectos *in vivo* de dos agentes que se sabe inducen la muerte de células germinales: la ciclofosfamida y la exposición a los rayos X. Algunos de los efectos tempranos de la muerte celular sobre los lípidos en estudio pudieron observarse luego de la administración de una dosis única de ciclofosfamida, mientras que las consecuencias a largo plazo de tal muerte pudieron verse claramente varias semanas después de la exposición del testículo a los rayos X.

La pérdida de la línea germinal se correlacionó con una masiva pérdida del peso testicular (húmedo y seco), del fósforo lipídico y del colesterol libre, que tomó unas 6 semanas. Esto se debió a una conjunción de efectos sobre las células: 1) la muerte por apoptosis de células indiferenciadas, que fueron muy radiosensibles porque estaban en activa división al momento de irradiar (desapareciendo en un día o dos y contribuyendo, más tarde, a la despoblación del testículo); 2) aquéllas que no se estaban dividiendo en ese momento pero cuyo genoma fue dañado por los rayos X de forma tal que murieron más tarde (1-4 semanas); 3) aquéllas más diferenciadas que ya no se estaban dividiendo y no se afectaron (radiatorresistentes), por lo que continuaron su diferenciación al ritmo normal de la espermatogénesis hasta que estuvieron listas para salir del testículo en forma de espermatozoides (6 semanas). Después de la 6ª en adelante, y hasta la semana 30, las células de Sertoli eran las únicas pobladoras de los túbulos seminíferos.

La pérdida selectiva y gradual de células de la línea germinal fue concomitante con la disminución del contenido de los glicerofosfolípidos (GPL) ricos en 22:5n-6, incluyendo en ello a los plasmalógenos, y de las esfingomielinas (SM) ricas en VLCPUFA. Estas últimas estuvieron constituidas por especies conteniendo VLCPUFA "normales" o no hidroxilados (como el 28:4n-6, 30:5n-6 y 32:5n-6) y VLCPUFA 2-hidroxilados (como el 2-OH 28:4n-6, 2-OH 30:5n-6 y 2-OH 32:5n-6). Después de la irradiación, las especies de SM (y de ceramida, Cer) que contienen VLCPUFA desaparecieron 2 semanas *antes* que las que tienen 2-OH VLCPUFA. En la *ausencia* de células germinales, los GPL testiculares tenían 20:4n-6 como su PUFA principal, y las SM contenían principalmente AG saturados como el 16:0, revelando la composición de los GPL y las SM de las células somáticas que sobrevivieron a la irradiación, incluyendo en este grupo a las células de Sertoli.

A diferencia de los GPL, los triacilglicerolos (TAG) ricos en 22:5n-6 se mantuvieron prácticamente sin cambio durante las primeras 4 semanas, para caer drásticamente en el estrecho período entre las semanas 4 y 6 post-irradiación. Una tinción específica para gotas de lípidos neutros (*Nile Red*) en cortes de tejido, tanto en controles no irradiados como a la semana 4 (pero ya no más a partir de la semana 6) post-irradiación, mostró la presencia de microgotas lipídicas en las espermátidas tardías, así como en los cuerpos residuales (CR) que se desprenden de ellas. Esto sugirió que estas gotitas debían contener los TAG mencionados, cuya cantidad disminuyó abruptamente al diferenciarse las últimas espermátidas y abandonar el testículo en forma de espermatozoides. Esto fue confirmado más tarde cuando los CR mostraron ser particularmente ricos en este tipo de TAG.

Los minoritarios triglicéridos con una unión éter (TUE), ricos en 22:5n-6 y VLCPUFA de 24-32 carbonos, se distinguieron de los TAG en que en las primeras semanas acumularon VLCPUFA y luego 22:5n-6. Eventualmente, ambos tipos de PUFA desaparecieron de los

TUE testiculares. Más tarde se confirmó que estos lípidos no son componentes de las células germinales.

Los ésteres de colesterol (EC) se asemejaron a los TUE en que inicialmente incrementaron sus VLCPUFA (28:5n-6, 30:5n-6) pero luego empezaron a acumular otros ácidos grasos, especialmente 22:5n-6. A la semana 6 post-irradiación los EC eran los únicos lípidos cuya cantidad había alcanzado valores varias veces mayor a la de los controles no irradiados. Dado que ya no había células germinales, era claro que esos EC se acumulaban en las células de Sertoli. A la semana 6, el Nile Red reveló la presencia de abundantes gotas lipídicas grandes en la zona adluminal de los túbulos seminíferos, sugiriendo que esas gotas eran los sitios celulares en que se acumulaban los EC. Teniendo en cuenta que las células germinales que mueren por apoptosis son fagocitadas por las células de Sertoli, éstas deben procesar los GPL ricos en 22:5n-6 y el colesterol provenientes de aquéllas, lo que sugiere que los EC se forman en ellas esterificando el colesterol libre con ácidos grasos liberados desde los GPL.

En la segunda parte de esta tesis los lípidos de células germinales puras aisladas, espermatoцитos en paquiteno (EP) de la meiosis y espermátidas redondas (ER), dos estadios bien definidos de la diferenciación, más una fracción conteniendo los cuerpos residuales (CR) que se desprenden de formas más maduras, elongadas, de las espermátidas, proveyeron varias respuestas y abrieron algunas nuevas preguntas sobre sus especiales lípidos. Por una parte, estos resultados confirmaron las conclusiones a que habíamos arribado por inferencia a partir de los estudios *in vivo* sobre la distribución celular de los varios lípidos en estudio. Por otra, proveyeron nuevos datos que pusieron en evidencia que, así como lo hacen los GPL, las Cer y las SM con VLCPUFA sufren cambios relevantes con la diferenciación de las células germinales.

Los TAG fueron los únicos lípidos neutros en cantidades apreciables en ambos tipos celulares, así como en los cuerpos residuales, donde fueron especialmente abundantes, mientras que los TUE y los EC con PUFA y VLCPUFA fueron casi indetectables en cualquiera de las tres fracciones, reforzando la conclusión de que estos lípidos pertenecen a las células de Sertoli. Conforme avanzó la diferenciación de EP a ER, los GPL incluyendo a los plasmalógenos se volvieron progresivamente más pobres en 20:4n-6 y más ricos en 22:5n-6.

Los dos tipos celulares estudiados, EP y ER, contuvieron SM y Cer con proporciones asombrosamente altas de VLCPUFA. Los VLCPUFA “normales” (no hidroxilados) predominaron ampliamente en la SM y Cer de los EP, mientras los 2-HO VLCPUFA lo hicieron en la SM y Cer de las ER. Esto evidenció que la formación de estas últimas especies moleculares es una característica estrechamente asociada a la diferenciación de las células germinales. Esta convicción se reforzó cuando los espermatozoides epididimales mostraron que sus SM y Cer contenían una proporción de 2-OH VLCPUFA aún mayor que las de las ER. Durante la progresión EP → ER → espermatozoides, el 28:4n-6 disminuyó menos que el 30:5n-6, mientras que por el contrario el 2-HO 30:5n-6 aumentó más que el 2-HO 28:4n-6 en ambos lípidos. La SM espermática tuvo al 28:4n-6 como principal y casi *único* VLCPUFA, y al 2-OH 30:5n-6 como principal 2-OH VLCPUFA. Llamativamente, los CR casi no tenían Cer, y su SM *sólo* contuvo 2-HO VLCPUFA.

En los espermatozoides de rata aislados de la región caudal del epidídimo se estudiaron las principales clases de los GPL (incluyendo plasmalógenos) y sus PUFA, así como la SM y Cer y sus VLCPUFA, para determinar su distribución entre la cabeza y la cola de las gametas. Más del 80% de los GPL se localizó en la gran cola, mientras que toda la SM con VLCPUFA y 2-HO VLCPUFA se concentró en la pequeña cabeza.

La reacción SM → Cer resultó ser altamente sensible y activa en los espermatozoides. Mediante el agregado de EDTA a los medios de aislamiento esta conversión fue inhibida, determinando así que es estrictamente dependiente de iones bivalentes, principalmente calcio. Cuando se incubaron los espermatozoides en un medio que por contener Ca^{2+} ,

bicarbonato y albúmina promueve la capacitación y, en parte, la reacción acrosomal, un porcentaje importante de los GPL y casi toda la SM fueron perdidas por las gametas. La SM con 28:4n-6, así como las SM con 2-OH VLCPUFA, propias de la cabeza espermática, se hidrolizaron para generar cantidades casi equivalentes de las correspondientes Cer.

Un hallazgo sorprendente fue que mientras la cola del espermatozoide carecía completamente de SM con VLCPUFA (no hidroxilados o hidroxilados), era en cambio rica en Cer con 2-OH VLCPUFA (2-HO 28:4n-6, 2-OH 30:5n-6 y 2-OH 32:5n-6). Estos eran, en similares proporciones, los mismos VLCPUFA que aparecían en las abundantes Cer de las espermátidas redondas. Mientras los principales GPL (en especial los de colina) se “remodelan” en el espermatozoide a medida que progresa su maduración en el epidídimo, cambiando sus principales subclases y sus PUFA, tanto la SM con 2-OH VLCPUFA (destinada a la cabeza), como la Cer con 2-OH VLCPUFA (destinada a la cola espermática), se generan ambas en el testículo, acompañando al espermatozoide casi sin cambios desde sus primeros esbozos en el epitelio seminífero (espermátida redonda) hasta su madurez casi total después de su pasaje a través del epitelio epididimal. Las posibles funciones que cumplen estas inusuales Cer en la cola espermática serán el objeto de futuros estudios.

Summary

The aim of this work was to gather information on the biochemistry of lipids with long-chain and very-long-chain (VLC) polyunsaturated fatty acids (PUFA) that abound in cells of the mammalian reproductive tract. Using the adult rat as a model, three systems were investigated: the testicular tissue *in vivo*, as influenced by agents that affect spermatogenesis, germ cells in two separate stages of their differentiation, isolated from the seminiferous epithelium, and mature spermatozoa, isolated from the caudal region of the epididymis.

The first part focused on finding evidence that would allow to relate the lipids under study with the cell types present in seminiferous tubules, germ cells and Sertoli cells. The *in vivo* effects were studied of two agents that are known to induce the death of germ cells: cyclophosphamide and exposure to X-rays. Some of the early effects of germ cell death on the lipids under study could be observed after the administration of a single dose of cyclophosphamide, whereas the long-term consequences of such death could be clearly seen several weeks after exposure of the testis to a single dose of X rays.

The loss of the germ cell lineage correlated with a massive drop of the testicular weight (wet and dry), lipid phosphorus, and free cholesterol, taking about 6 weeks. This could be ascribed to a concurrence of effects on germ cells: 1) the death by apoptosis of undifferentiated germ cells that were highly radio-sensitive because they were actively dividing at irradiation time (disappearing in a day or two and contributing, later on, to the depopulation of the testis); 2) those that were not dividing at that moment but that were genome-damaged by X rays in such way that they died later on (1-4 weeks); 3) those more differentiated cells that were no longer dividing, unaffected by X rays (radio-resistant), that continued their differentiation at the normal rhythm of spermatogenesis until they were ready to exit from the testis in the form of spermatozoa (6 weeks). After week 6 and onwards, up to week 30, only Sertoli cells populated the seminiferous tubules.

The gradual and selective loss of cells of the germinal lineage was concomitant with the decrease of 22:5n-6-rich glycerophospholipids (GPL), including plasmalogens, and of VLCPUFA-rich sphingomyelins (SM). The latter were made up by species containing "normal" or non-hydroxylated VLCPUFA (such as 28:4n-6, 30:5n-6 and 32:5n-6) and 2-hydroxylated VLCPUFA (such as 2-OH 28:4n-6, 2-OH 30:5n-6 and 2-OH 32:5n-6). After irradiation, the species of SM (and ceramide, Cer) that contain VLCPUFA disappeared 2 weeks *before* those that contain 2-OH VLCPUFA. In the *absence* of germ cells, testicular GPL had 20:4n-6 as their main PUFA, and SM contained mainly saturated fatty acids like 16:0, revealing the composition of the GPL and SM of the somatic cells that survived irradiation, including Sertoli cells in this group.

In disparity with GPL, the 22:5n-6-rich triacylglycerols (TAG) were maintained virtually unchanged during the first 4 weeks, to drop drastically in the short period going between weeks 4 and 6 post-irradiation. A specific staining to reveal neutral lipid droplets (*Nile Red*) in tissue sections from both non-irradiated controls and at week 4 (but no longer at week 6 and later) post-irradiation, showed the presence of micro-droplets both in late spermatids and in the residual bodies (RB) emitted from the latter. This suggested that these small droplets probably contained the 22:n-6-rich TAG whose amount fell down abruptly in the last 2 weeks when the last spermatids ended their differentiation and exited from the testis in the form of spermatozoa. This was confirmed later on when the RB showed to be particularly rich in this kind of TAG.

The minor triglycerides with an ether bond (TEB), rich in 22:5n-6 and VLCPUFA with 24-32 carbons, differed from the TAG in that they initially accumulated VLCPUFA and then 22:5n-6. Eventually, both kinds of PUFA disappeared from the testicular TEB. These lipids were confirmed later on not to be components of germ cells.

The cholesterol esters (CE) were similar to TEB in that they initially increased their VLCPUFA (28:5n-6, 30:5n-6) but then started to accumulate other fatty acids, especially 22:5n-6. At week 6 post-irradiation, EC were the only lipids whose amounts had reached

values several fold higher than those of the non-irradiated controls. Since no germ cells remained in seminiferous tubules, it was clear that those EC accumulated in Sertoli cells. At week 6, Nile Red revealed the presence of abundant large lipid droplets in the adluminal zone of seminiferous tubules, suggesting that such droplets were the cellular sites of EC accumulation. Taking into account that the germ cells that die by apoptosis are phagocytized by Sertoli cells, the latter must process the 22:5n-6-rich GPL and (free) cholesterol coming from the former, suggesting that the EC are formed in Sertoli cells by esterifying free cholesterol and fatty acids released from GPL.

In the second part of this thesis the lipids of pure isolated germ cells, pachytene spermatocytes (PS) of meiosis and round spermatids (RS), two well-defined stages of germ cell differentiation, plus a fraction containing the residual bodies (RB) that are released from more mature, elongating forms of spermatids, provided several answers and opened some new exciting questions on their special lipids. On the one hand, these results confirmed the conclusions arrived at by inference from the *in vivo* studies on the cell distribution of the various lipids under study. On the other, provided new data that put into evidence that, as the GPL do, the Cer and SM containing VLCPUFA undergo relevant changes related with germ cell differentiation.

The TAG were the only neutral lipids in appreciable amounts in both cell types, as well as in the residual bodies, where they were especially abundant, whereas the PUFA- and VLCPUFA-rich TUE and EC were almost undetectable in any of the three fractions, reinforcing the conclusion that these lipids belong to Sertoli cells. significant amounts As differentiation from RS to RS proceeded, the GPL including plasmalogens became progressively poorer in 20:4n-6 and richer in 22:5n-6.

Both germ cell types, PS and RS, contained SM and Cer with astonishingly high proportions of VLCPUFA. The "normal" (non-hydroxy) VLCPUFA predominated massively in the SM and Cer of the PS, whereas the 2-OH VLCPUFA prevailed in the RS. This evidenced that the formation of these latter species is a feature tightly linked to germ cell differentiation in the rat. This conviction was reinforced when spermatozoa from the epididymis showed that their SM and Cer contained a proportion of 2-OH VLCPUFA even higher than those of RS. During the progression PS → → RS → → spermatozoa, 28:4n-6 decreased less than did 30:5n-6, whereas, on the contrary, 2-OH 30:5n-6 increased more than did 2-OH 28:4n-6 in both lipids. Spermatozoal SM had 28:4n-6 as the main and almost only VLCPUFA, and 2-OH 30:5n-6 as the main VLCPUFA. Remarkably, the RB had virtually no Cer and their SM *only* contained 2-OH VLCPUFA.

In rat spermatozoa isolated from the caudal region of the epididymis, the main classes of GPL (including plasmalogens) and their PUFA, as well as SM and Cer and their VLCPUFA were studied to determine their distribution between the head and the tail of the gametes. More than 80% of the GPL was localized in the large tail, whereas all of the SM with VLCPUFA and 2-OH VLCPUFA was concentrated in the small head.

The SM → Cer reaction was highly sensitive and active in the spermatozoa. By means of adding EDTA to the isolation media this conversion was inhibited, thus determining that it is strictly dependent on bivalent ions, mostly calcium. When sperm were incubated in a medium that, because it contained Ca²⁺, bicarbonate and albumin promoted sperm capacitation, and, in part, the acrosome reaction, an important percentage of the total GPL and most of the SM were lost from the gametes. The 28:4n-6-containing SM as well as the 2-OH-VLCPUFA containing SM, typical of the sperm head, were hydrolyzed to generate almost equivalent amounts of the corresponding Cer.

A surprising finding was that, whereas the tail of spermatozoa lacked SM with VLCPUFA altogether, it was instead rich in Cer with 2-OH VLCPUFA (2-OH 28:4n-6, 2-OH 30:5n-6 y 2-OH 32:5n-6). These were, in similar proportions, the same VLCPUFA that appeared in the abundant Cer of round spermatids. In contrast to the main sperm GPL (especially those of choline) that change their subclasses and their PUFA *types* while they mature in the

epididymis, both the SM with normal and 2-hydroxy VLCPUFA (destined o the sperm head) and the Cer with 2-OH VLCPUFA (destined to the sperm tail) are generated in the testis and accompany the gamete almost without changes from their first appearance in the seminiferous epithelium (round spermatids) to their almost complete maturity after their passage through the epididymal epithelium. The possible functions these unusual Cer play in the sperm tail will be the aim of future studies.