

# Rol de la isoforma 2 de la glicerol-3-fosfatoaciltransferasa en el metabolismo lipídico testicular

*Role of isoform 2 of glycerol-3-phosphate acyltransferase in testicular lipid metabolism*

*Função da isoforma 2 da glicerol-3-fosfatoaciltransferase no metabolismo lipídico testicular*

► Elizabeth Renée Cattáneo<sup>1</sup>, Magalí Pellon-Maison<sup>1</sup>, María del Rosario Gonzalez-Baró<sup>2</sup>

---

<sup>1</sup> Dra. en Ciencias Exactas, UNLP.

<sup>2</sup> Dra. en Ciencias Naturales, UNLP.

INIBIOLP, Facultad de Ciencias Médicas, UNLP.

Este es un resumen de la tesis doctoral número 60 dirigida por el Dr R. Brenner, la cual fue aprobada el 10 de agosto de 2011 en la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata.

## Resumen

El primer paso en la síntesis *de novo* de glicerolípidos es la acilación del glicerol-3-fosfato, la cual es catalizada por la enzima glicerol-3-fosfato aciltransferasa (GPAT). En mamíferos han sido descritas hasta el momento cuatro isoformas de GPAT, las cuales pueden diferenciarse por su localización tisular y subcelular, y por su sensibilidad a reactivos que reaccionan con los grupos sulfhidrilos. El objetivo de este trabajo fue estudiar la localización y función de GPAT2, una isoforma mitocondrial que se expresa principalmente en testículo utilizando como modelo células CHO-K1 que sobreexpresan GPAT2. Se observó que esta isoforma utiliza como sustrato específicamente al ácido araquidónico, estimula la síntesis de triacilgliceroles (TAG) con alto contenido de ácido araquidónico, y favorece la incorporación de [1-14C] ácido araquidónico en los TAG. Utilizando modelos animales se observó por un lado que el ARNm de GPAT2 se expresa sólo en los espermatozoides primarios, mientras que la expresión de la proteína se mantiene a lo largo de la espermatogénesis; y por otro lado que la expresión de GPAT2 varía durante el desarrollo sexual, alcanzando un máximo de expresión y actividad a los 30 días de edad en la rata. A esta edad se observó también un máximo en el contenido de TAG y de AA esterificado en los TAG del testículo. Se concluye que los resultados sugieren que GPAT2 sería la enzima responsable de esterificar el ácido araquidónico en los TAG de las células de la línea espermática.

**Palabras clave:** glicerol-3-fosfatoaciltransferasa 2 \* ácido araquidónico \* triacilgliceroles \* espermatogénesis

## Summary

*De novo glycerolipid synthesis begins with the acylation of glycerol-3 phosphate catalyzed by glycerol-3-phosphate acyltransferase (GPAT). In mammals, at least four GPAT isoforms have been described, differing in their cell and*

Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana

Incorporada al Chemical Abstract Service.

Código bibliográfico: ABCLDL.

ISSN 0325-2957

ISSN 1851-6114 en línea

ISSN 1852-396X (CD-ROM)

tissue locations and sensitivity to sulfhydryl reagents. The objective of the present work was to study localization and function of GPAT2, a mitochondrial isoform that is mainly expressed in testis, using as a model CHO-K1 cells that overexpress GPAT2. Incubation of GPAT2-transfected CHO-K1 cells with arachidonoyl-CoA increased GPAT activity 2-fold and the incorporation of [1-14C] arachidonate into TAG. Consistently, arachidonic acid was present in the TAG fraction of cells that overexpressed GPAT2, but not in control cells, corroborating GPAT2's role in synthesizing TAG that is rich in arachidonic acid. In rat and mouse testis, Gpat2 mRNA was expressed only in primary spermatocytes; the protein was also detected in late stages of spermatogenesis. During rat sexual maturation, both the testicular TAG content and the arachidonic acid content in the TAG fraction peaked at 30 d, matching the highest expression of Gpat2 mRNA and protein. These results strongly suggest that GPAT2 expression is linked to arachidonoyl-CoA incorporation into TAG in spermatogenic germ cells.

**Key words:** glycerol-3-phosphate acyltransferase-2 \* arachidonic acid \* triacylglycerols \* spermatogenesis

## Resumo

O primeiro avanço na síntese de novo de glicerolípídios é a acidulação do glicerol-3-fosfato, a qual é catalizada pela enzima glicerol-3-fosfato aciltransferase (GPAT). Em mamíferos tem sido descritas até o momento quatro isoformas de GPAT, as quais se podem distinguir pela sua localização tissular e subcelular, e pela sua sensibilidade aos reagentes que reagem com os grupos sulfidrilos. O objetivo deste trabalho foi estudar a localização e função de GPAT2, uma isoforma mitocondrial que se expressa principalmente no testículo, utilizando como modelo células CHO-K1 que superexpressam GPAT2. Observou-se que esta isoforma utiliza como substrato especificamente o ácido araquidônico, estimula a síntese de triacilgliceróis (TAG) com alto conteúdo de ácido araquidônico, e favorece a incorporação de [1-14C] ácido araquidônico nos TAG. Utilizando modelos animais se observou de um lado que o ARNm de GPAT2 se expressa apenas nos espermatócitos primários, enquanto que a expressão da proteína se mantém ao longo da espermatogênese; e do outro que a expressão de GPAT2 varia durante o crescimento sexual, atingindo um máximo de expressão e atividade aos 30 dias de idade no camundongo. Nessa idade foi observado também um máximo no conteúdo de TAG e de AA esterificado nos TAG do testículo. Conclui-se que os resultados sugerem que GPAT2 seria a enzima responsável por esterificar o ácido araquidônico nos TAG das células da linha espermatócica.

**Palavras-chave:** glicerol-3-fosfatoaciltransferase 2 \* ácido araquidônico \* triacilgliceróis \* espermatogênese

## Introducción

Una de las principales características que presentan los testículos de los mamíferos adultos es la de poseer un alto contenido de ácidos grasos (AG) poliinsaturados de 18 a 22 átomos de carbono (PUFA) y de AG poliinsaturados (PUFA) de muy larga cadena (24 a 32 átomos de carbono, VLCPUFA). En testículo de rata y ratón predominan los PUFA de la serie n6, siendo los AG docosapentaenoico (DPA, 22:5n6) y araquidónico (AA, 20:4n6) los más abundantes en la rata, y el 18:2n6 el mayoritario en el ratón (1), mientras que en el testículo humano son abundantes los PUFA de la serie n3, predominando el 22:6n3 (2)(3). Dentro de los lípidos testiculares estos PUFA se esterifican principalmente en los glicerofosfolípidos (GPL) y en los triacilgliceroles (TAG). El AA y el 22:5n6 son los principales PUFA de los GPL y, por lo tanto, los AG mayoritarios en las células de la línea espermatócica tanto en la rata como en el ratón, mientras que el 22:5n6 en la rata, y los AG 18:2n6 y 22:5n6 en el ratón, se esterifican principalmente en los TAG (1)(4).

La composición en AG de los GPL debe estar controlada debido a que de ella dependen las propiedades de fluidez y permeabilidad de la membrana, así como también la actividad de diversas proteínas presentes en la misma. Por otro lado, la continua formación de espermatozoides que ocurre en el testículo de los animales adultos requiere de un aporte continuo de GPL y colesterol para sintetizar sus membranas, y se ha planteado que los TAG podrían cumplir el rol de intermediarios en los cuales se almacenarían de manera temporaria estos AG preformados, los cuales servirían también como precursores para la biosíntesis de los PUFA de 22 carbonos que forman parte de los GPL de membrana de las células de la línea germinal.

Cada uno de los pasos de la vía de síntesis *de novo* de glicerolípídios en mamíferos puede ser catalizado por numerosas isoformas enzimáticas. El primer paso de esta vía está catalizado por la enzima glicerol-3-fosfato aciltransferasa (GPAT [EC 2.3.1.15]), e involucra al menos cuatro isoformas productos de distintos genes. Los estudios realizados hasta el momento indican que cada

una de ellas presenta un patrón de expresión específico de tejido, diferentes localizaciones subcelulares, diferente sensibilidad al tratamiento con *N*-etilmaleimida (NEM) y distintos modos de regulación. Esto sugiere que cada una de estas isoformas cumpliría una función específica en el tejido en el cual se expresa.

En este trabajo se realizó una caracterización de GPAT2 (Genebank # NP\_001074558), una isoforma mitocondrial sensible al tratamiento con NEM, e identificada por primera vez en el hígado de ratones nulos para el gen que codifica para GPAT1 (*Gpat1*<sup>-/-</sup>). El ADNc correspondiente a la isoforma GPAT2 de ratón fue clonado a partir del ARNm de estos animales teniendo en cuenta la alta similitud de secuencia que presenta con la isoforma GPAT1 (identidad 27% y similitud 70%). Para determinar la distribución tisular de GPAT2 se realizaron estudios de *q-Real Time-PCR* (qRT-PCR) y esto permitió demostrar que en animales normales el ARNm correspondiente a *Gpat2* se encuentra principalmente en testículos, siendo su expresión relativa 50 veces mayor en este órgano que en el hígado o el tejido adiposo (5).

Teniendo en cuenta esta particular distribución tisular, como hipótesis se planteó que GPAT2 estaría involucrada en la síntesis de los TAG con un alto contenido de PUFA característicos del testículo, y necesarios para un normal desarrollo de la espermatogénesis.

## Materiales y Métodos

Para realizar los ensayos se utilizó como modelo experimental un cultivo de células CHO-K1 transfectadas de manera transitoria con el ADNc correspondiente a GPAT2 marcado en su extremo 3' con el epítopo antigénico FLAG (células G2), clonado en el vector de expresión eucariota pcDNA3.1 (Invitrogen). En simultáneo se realizaron transfecciones con el vector vacío (sin inserto) para utilizar como control (células control). La eficiencia de la transfección se determinó por Western blot utilizando un anticuerpo contra el epítopo FLAG que permite reconocer a la proteína expresada de manera heteróloga.

En simultáneo se realizaron transfecciones con el vector vacío (sin inserto) para utilizar como control (células control). La eficiencia de la transfección se determinó por Western blot utilizando un anticuerpo contra el epítopo FLAG que permite reconocer a la proteína expresada de manera heteróloga.

## Resultados

### 1. LA SOBREEXPRESIÓN DE GPAT2 EN CÉLULAS DE MAMÍFERO PROMUEVE LA SÍNTESIS Y ALMACENAMIENTO DE TAG CON ALTO CONTENIDO DE ÁCIDO ARAQUIDÓNICO

Para estudiar los efectos de la sobreexpresión de GPAT2 sobre la síntesis de TAG se determinó el contenido de lípidos neutros intracelulares cuantificando la formación de las gotas de lípidos citoplasmáticas. Para esto las células fueron incubadas durante 24 h en Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) suplementado con un 10% de suero fetal bovino (DMEM 10% FBS), y luego teñidas con el colorante Oil Red-O. La cantidad y el tamaño de las gotas de lípidos presentes en las mismas se determinaron utilizando el programa Image Pro Plus v5.1 (Fig. 1A). Este experimento permitió observar que la sobreexpresión de GPAT2 produce un aumento en el tamaño de las gotas de lípidos con respecto a las células control (Fig. 1B). Esto indica que se produjo un aumento en el almacenamiento de TAG, debido probablemente a un aumento de su síntesis. Teniendo en cuenta que para realizar estos experimentos las células fueron incubadas durante 24 h en DMEM con 10% de FBS, sin el agregado de AG exógenos al medio de cultivo, esto permite inferir que este aumento en la síntesis de TAG se debe exclusivamente a la sobreexpresión de GPAT2.

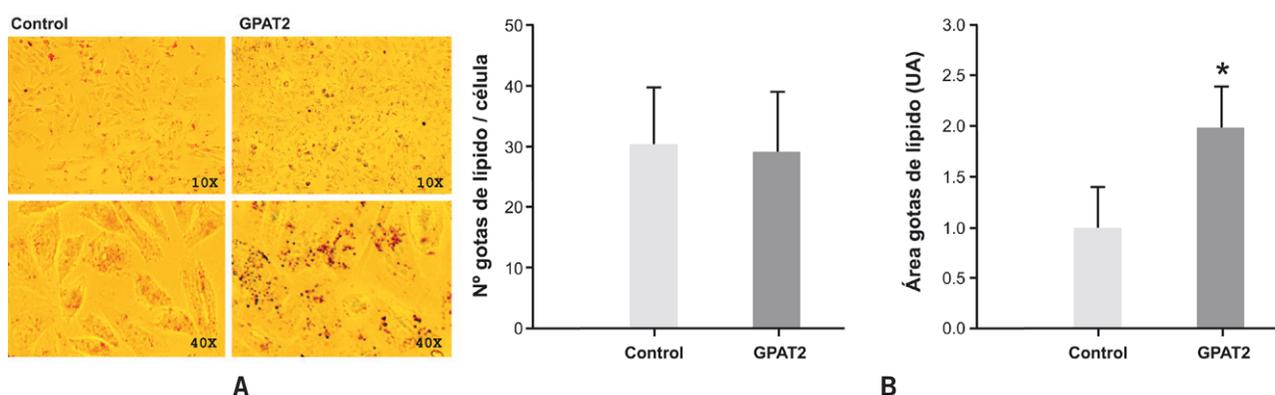


Figura 1. Acumulación intracelular de TAG en las células que sobreexpresan GPAT2

Figura 1.A. Se teñieron con el reactivo Oil Red-O células CHO-K1 transfectadas con el vector vacío (Control) o con el cDNA que codifica para GPAT2 (GPAT2).

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

Posteriormente, se estudió la composición en AG de esos TAG para poder determinar si la sobreexpresión de GPAT2 facilitaba la esterificación de algún AG en particular. Para ello se utilizaron células control y G2 las cuales fueron incubadas durante 24 h post-transfección en DMEM con 10% de FBS. La composición en AG de los TAG fue evaluada por cromatografía gas-líquido (Fig. 2). Estos experimentos permitieron observar que sólo las células transfectadas con GPAT2 esterificaban el AA aportado por el medio de cultivo en la fracción TAG (5,3% AA esterificado en los TAG en células G2, mientras que el AA no fue detectado en los TAG de las células control). Este resultado es sorprendente debido a que el AA, al igual que otros PUFA, se esterifica normalmente en los GPL. Incluso en el testículo donde los TAG presentan un alto contenido de PUFA, el AA se encuentra esterificado también principalmente en los GPL.

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

## 2. LA ISOFORMA GPAT2 ES ESPECÍFICA PARA EL AA

Luego de observar los cambios producidos por la sobreexpresión de GPAT2 en la composición en AG de los TAG de las células CHO-K1 se decidió corroborar esta aparente especificidad de GPAT2 por el AA. Para

ello se midió la actividad GPAT utilizando las membranas totales de células control y G2 y distintos acilgraso-CoA como sustratos. Estos experimentos permitieron demostrar que no existen diferencias significativas en los valores de actividad GPAT entre las células control y las G2 cuando se utilizan como sustratos palmitoil-CoA, oleoil-CoA o linoleoil-CoA. En cambio, la actividad específica es dos veces mayor para las células G2 cuando se utiliza araquidonil-CoA como sustrato, lo que demuestra una mayor afinidad de GPAT2 por este sustrato poliinsaturado. Para determinar si este aumento de actividad con araquidonil-CoA era específico, se determinó la actividad GPAT utilizando otro PUFA como sustrato, el docosahexanoil-CoA (22:6n3), pero los valores de actividad específica obtenidos fueron muy bajos y no hubo diferencias significativas entre las células control y las G2 (Fig. 3).

Teniendo en cuenta, por un lado, que las células que sobreexpresan GPAT2 presentan un mayor contenido de TAG que las células control, y por otro las diferencias observadas en la composición en AG de esos TAG, se decidió estudiar la capacidad de incorporación de [ $1-^{14}\text{C}$ ]AA a los distintos lípidos celulares. Para ello las células control y G2 fueron incubadas durante tres horas con trazas de [ $1-^{14}\text{C}$ ]AA. Transcurrido ese tiempo se extrajeron los lípidos totales, se separaron por cromatografía en capa fina y se determinó la radiactividad

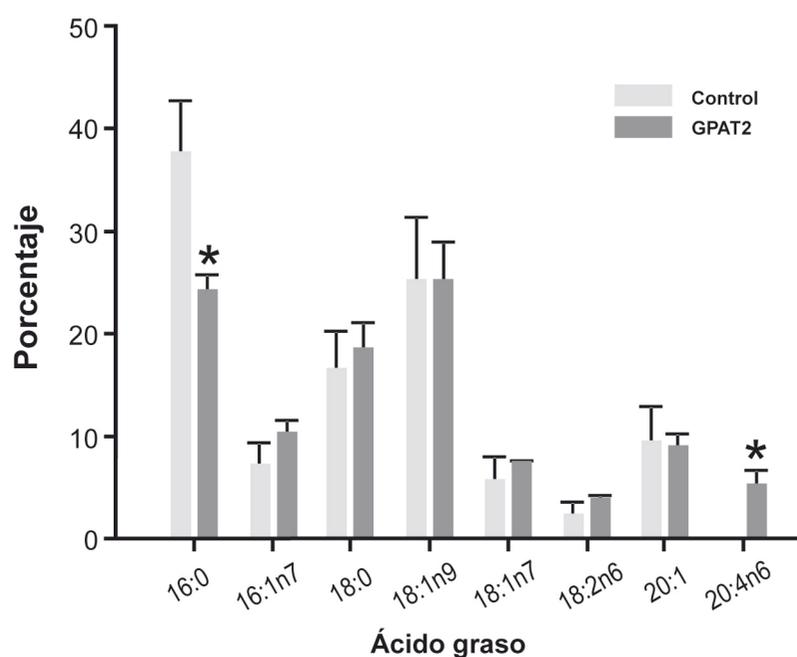


Figura 2. Composición en AG de los TAG de las células que sobreexpresan GPAT2

Figura 2. Se determinó la composición en AG de los TAG de células CHO-K1 transfectadas con el vector vacío (barras gris claro), o con el cDNA correspondiente a GPAT2 (barras gris oscuro) incubadas durante 24 hs en DMEM con 10% de FBS. Los lípidos fueron extraídos por la técnica de Folch y separados por TLC. Los TAG fueron saponificados y los AGL se derivatizaron, se separaron y se identificaron por GLC. Los resultados se expresan como el promedio  $\pm$  desvío estándar de tres experimentos independientes. \*  $p < 0,05$ .

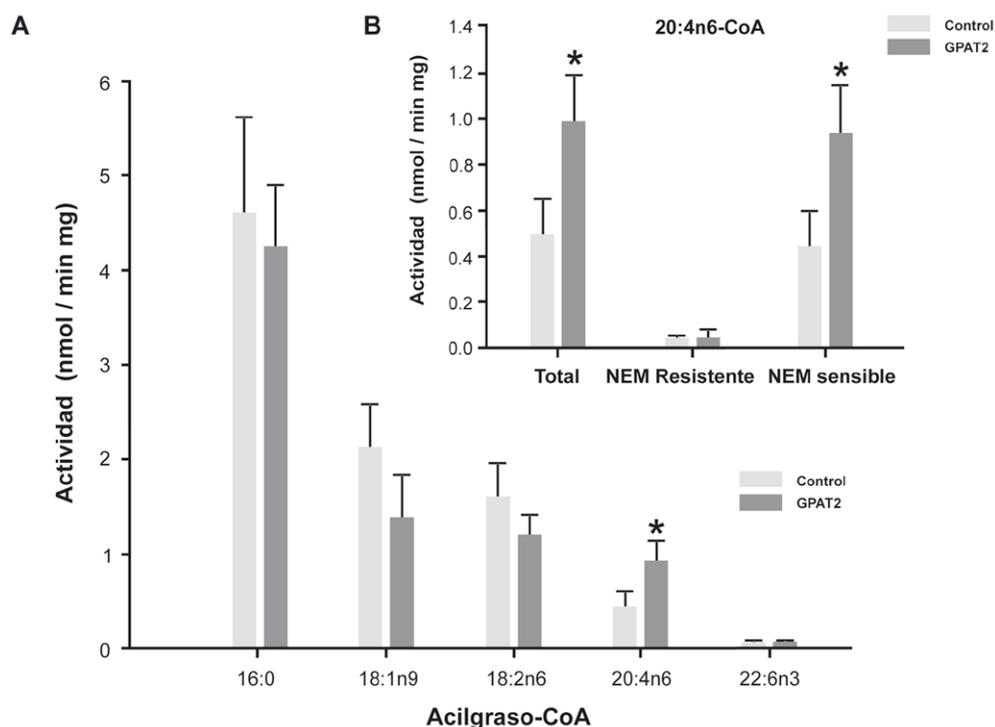


Figura 3. Actividad GPAT NEM sensible de células que sobreexpresan GPAT2 utilizando diferentes acilgraso-CoAs como sustratos

Figura 3.A. Actividad GPAT NEM sensible utilizando diferentes acilgraso-CoAs como sustratos: se midió la actividad GPAT (nmol/min mg) sin el agregado (actividad total) y con el agregado (actividad resistente) de NEM 2mM, y se calculó la actividad NEM sensible por diferencia entre estos valores. Se utilizaron 100 mg de proteínas correspondientes a células CHO-K1 transfectadas con el vector vacío (barras grises) o con el cDNA correspondiente a GPAT2 (barras verdes), y diferentes acilgraso-CoAs como sustratos. Los resultados se expresan como el promedio  $\pm$  error estándar de dos experimentos independientes. \*  $p < 0,05$

Figura 3.B. Distribución de actividad GPAT utilizando 20:4n6-CoA: se midió la actividad GPAT (nmol/min mg) sin el agregado (actividad total) y con el agregado (actividad resistente) de NEM 2mM, y se calculó la actividad NEM sensible por diferencia entre estos valores utilizando araquidonil-CoA como sustrato y 100 mg de proteínas correspondientes a células CHO-K1 transfectadas con el vector vacío (barras gris claro) o con el cDNA correspondiente a GPAT2 (barras gris oscuro).

correspondiente a cada fracción. Este ensayo permitió observar que luego de 3 horas de incubación las células que sobreexpresan GPAT2 esterificaron un 40% más de [1-<sup>14</sup>C]AA en sus TAG que las células control, y disminuyeron la esterificación de [1-<sup>14</sup>C]AA en la fosfatidiletanolamina. Este resultado es coherente con la participación de GPAT2 en la vía de síntesis de TAG y con su preferencia por el araquidonil-CoA como sustrato (Fig. 4).

El modelo de células en cultivo permitió demostrar que GPAT2 esterifica preferentemente el AA en la fracción TAG. Teniendo en cuenta que el ARNm correspondiente a Gpat2 se expresa principalmente en testículo (5) y que una característica de las células testiculares es la presencia de PUFA en sus TAG (6), se decidió estudiar la expresión y actividad de GPAT2 en testículos de rata, y correlacionar estos resultados con la composición en AG de los TAG del testículo y con la funcionalidad de este órgano.

### 3. GPAT2 ES UNA ISOFORMA MITOCONDRIAL BIOLÓGICAMENTE ACTIVA EN TESTÍCULO DE RATAS NORMALES

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

Para realizar las medidas de actividad GPAT se purificaron mitocondrias a partir de un homogenato total de testículo de animales adultos, por un método optimizado en este laboratorio (7). La purificación se realizó para eliminar los restos de retículo endoplásmico, en el cual se localizan las isoformas 3 y 4 de GPAT las cuales, al igual que GPAT2, son sensibles al N-etilmaleimida (NEM). Se midió la actividad GPAT aplicando una técnica estándar y teniendo en cuenta los resultados obtenidos al sobreexpresar GPAT2 en células en cultivo; para realizar la

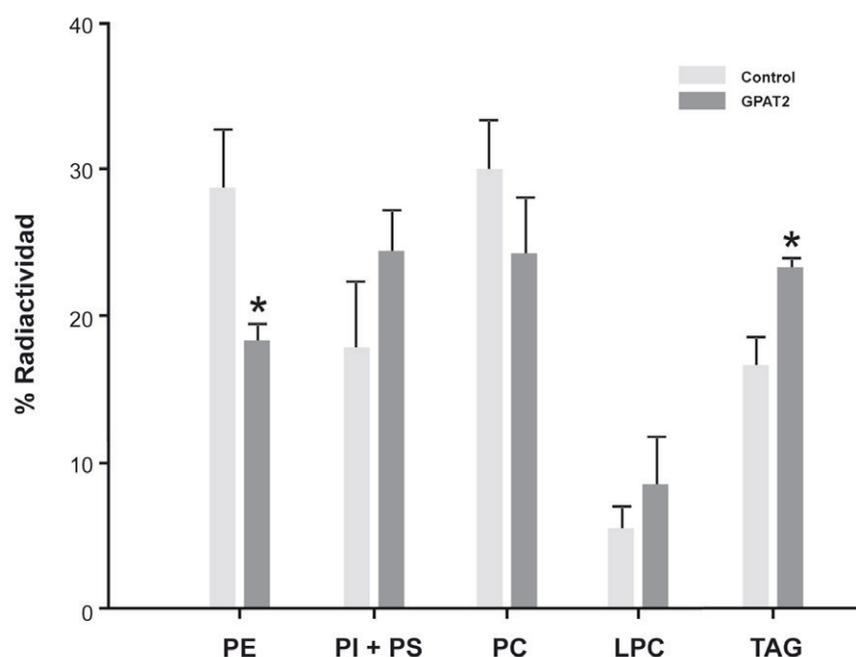


Figura 4. Esterificación de [1-<sup>14</sup>C]AA en los diferentes lípidos de células que sobreexpresan GPAT2

Figura 4. Se determinó el porcentaje de AA radiactivo esterificado en cada una de las fracciones lipídicas indicadas por las células CHO-K1 transfectadas con el vector vacío (barras gris claro), o con el cDNA correspondiente a GPAT2 (barras gris oscuro) incubadas durante 3 h en MEM con 10% de FBS suplementado con 0,5% de BSA y 0,25 mCi de [1-<sup>14</sup>C]AA. Los lípidos fueron extraídos por la técnica de Blight y Dyer, separados por TLC y cuantificados en un lector de radiactividad. Los resultados se expresan como el promedio  $\pm$  desvío estándar de tres experimentos independientes. \*  $p < 0,05$ . PE: fosfatidiletanolamina, PI: fosfatidilinositol, PS: fosfatidilserina, PC: fosfatidilcolina, LPC: lisofosfatidilcolina, TAG: triacilglicéridos

medida de actividad GPAT en testículo se utilizó como sustrato el araquidonil-CoA. Este ensayo permitió medir por primera vez una actividad GPAT NEM sensible en mitocondrias puras de animales normales (actividad GPAT NEM sensible corresponde a un 65% de la actividad GPAT total) y confirmar así que el producto del gen *Gpat2* es activo en testículo de rata (Fig. 5).

#### 4. EL ARNm CORRESPONDIENTE A *Gpat2* SE EXPRESA EN LOS ESPERMATOCITOS PRIMARIOS, MIENTRAS QUE LA EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA SE MANTIENE A LO LARGO DEL PROCESO DE DIFERENCIACIÓN CELULAR

Para estudiar la localización del ARNm correspondiente a *Gpat2* se realizó la técnica de hibridación *in situ* (HIS). Esta técnica presenta la ventaja de que permite observar en simultáneo a todas las células, tanto somáticas como germinales, que constituyen el testículo directamente en un corte del tejido, discriminando además entre los distintos tipos de células que constituyen la línea espermática. La HIS permitió confirmar que el ARNm correspondiente a *Gpat2* de ratón se expresa solo en las células de la línea espermática, en particular en los espermatoцитos primarios (Fig. 6).

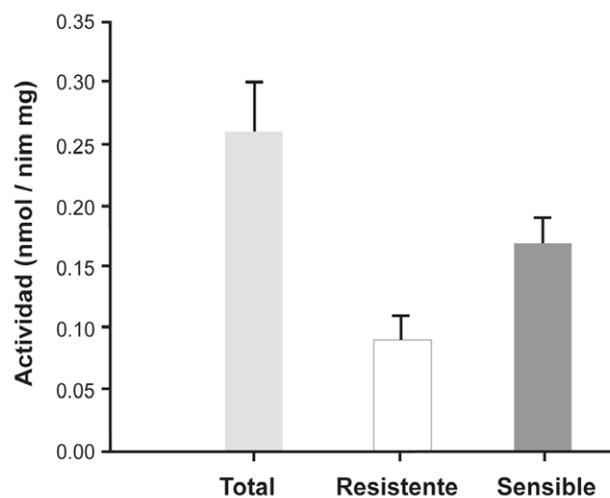


Figura 5. Actividad GPAT en mitocondrias puras de testículo de rata

Figura 5. Se midió la actividad GPAT (nmol/min mg) en mitocondrias puras obtenidas a partir de testículo de ratas adultas utilizando araquidonil-CoA como sustrato. Los resultados se expresan como el promedio  $\pm$  desvío estándar de tres aislamientos independientes.

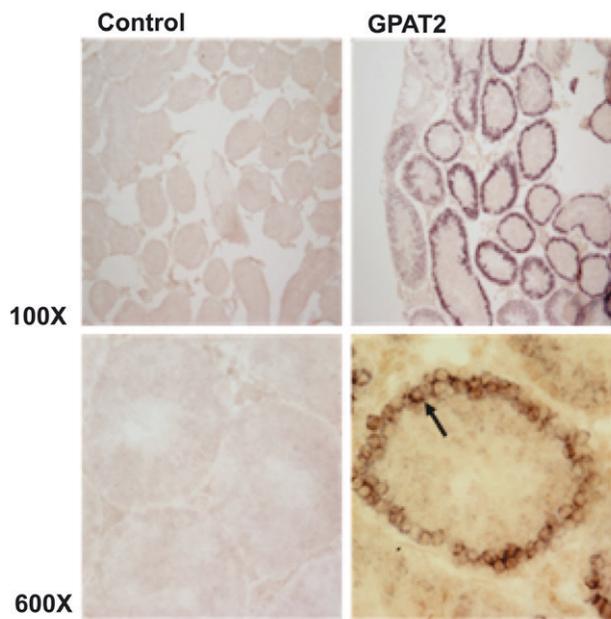


Figura 6. Expresión del ARNm correspondiente a *Gpat2* en células de testículo por HIS

Figura 6. Se realizó la HIS utilizando como muestras cortes de testículo de ratones adultos los cuales fueron incubados con la sonda sentido (Control) y con la sonda antisentido para *Gpat2* (*Gpat2*) marcadas con digoxigenina. La flecha negra indica las células sobre las que se detectó señal positiva. No se observa señal en las muestras incubadas con la sonda sentido.

La localización de la proteína GPAT2 se estudió por inmunofluorescencia en cortes de testículo de ratas adultas, en los cuales se pudo observar por un lado que esta proteína se expresa en los espermatoцитos primarios, y por otro, que su expresión se mantiene durante las etapas siguientes de diferenciación celular (Fig. 7).

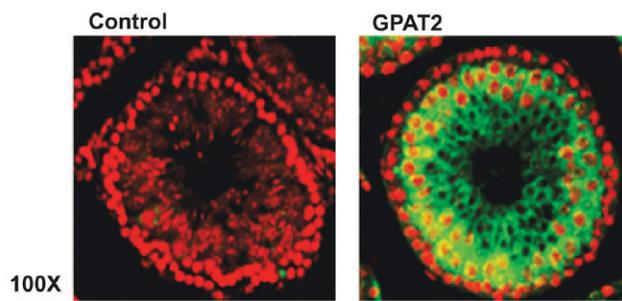


Figura 7. Expresión de GPAT2 por inmunofluorescencia

Figura 7. Se realizó la técnica de inmunofluorescencia en cortes de testículo de ratas de 60 días los cuales fueron incubados en PBS (Control) o con un anticuerpo comercial anti-GPAT2 (GPAT2), y luego con un anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado al fluoróforo Alexa Fluor 488. Los núcleos fueron teñidos con Ioduro de propidio. No se observa señal en las muestras incubadas con PBS.

#### 5. LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE GPAT2 VARIAN DURANTE EL DESARROLLO POSTNATAL ALCANZANDO UN VALOR MÁXIMO DURANTE LA PRIMERA ESPERMATOGÉNESIS

La presencia de GPAT2 en las células de la línea espermática sugiere que la misma podría cumplir alguna función durante la espermatogénesis. Por lo tanto, se estudiaron los niveles de expresión y actividad de GPAT2 a lo largo del desarrollo postnatal. Para ello se trabajó con animales de edades correspondientes a cuatro estadios del desarrollo: infantiles (19 días), pre-púberes (30 días), púberes (40 días) y adultos jóvenes (60 días), que permitieran abarcar los sucesivos niveles de maduración testicular postnatal (8).

Se estudiaron los niveles de expresión del ARNm correspondiente a *Gpat2* por medio de ensayos de PCR cuantitativa medida en tiempo real (qRT-PCR) (Fig. 8), y los niveles de expresión de la proteína GPAT2 por Western blot (Fig. 9). Como muestras se utilizaron respectivamente el ARN total y mitocondrias puras obtenidos ambos a partir de testículos de animales de las diferentes edades mencionadas anteriormente. Ambos resultados permitieron observar que la expresión de *Gpat2* varía durante el desarrollo postnatal, alcanzando un máximo a los 30 días de edad.

Teniendo en cuenta las diferencias observadas en los niveles de expresión de GPAT2 en función de la edad se decidió estudiar la actividad GPAT NEM sensible en mitocondrias de testículo utilizando araquidonil-CoA como sustrato. Para ello se obtuvieron mitocondrias puras a partir

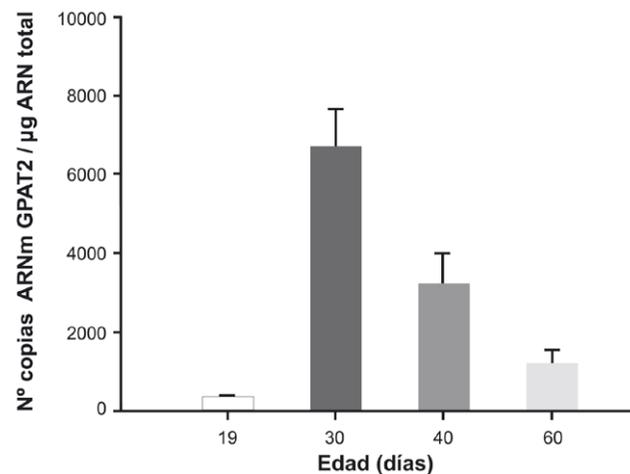


Figura 8. Expresión del ARNm correspondiente a *Gpat2* en testículo de ratas de diferentes edades

Figura 8. Se cuantificó la expresión del ARNm correspondiente a *Gpat2* por qRT-PCR utilizando ARN total obtenido a partir de homogenato de testículo de ratas de 19, 30, 40 y 60 días. Los cambios en los niveles de expresión fueron determinados utilizando el método de la curva de calibración. Los resultados se expresan como el promedio  $\pm$  desvío estándar de tres experimentos independientes.

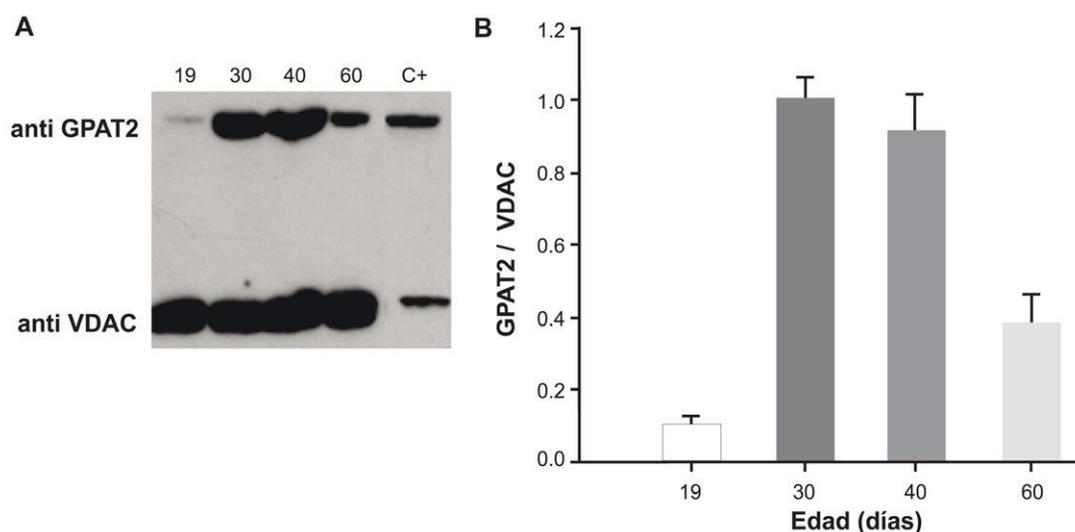


Figura 9. Expresión de GPAT2 en testículo de ratas de diferentes edades

Figura 9.A. Se analizaron mediante Western blot 100  $\mu$ g de proteína correspondiente a mitocondrias puras aisladas de testículo de ratas de 19, 30, 40 y 60 días, y a células CHO-K1 transfectadas con el cDNA correspondiente a GPAT2 como control positivo (C+). El revelado se realizó utilizando los anticuerpos anti GPAT2 y anti VDAC. La banda de GPAT2 corresponde a un PM de ~ 80 KDa y la de VDAC a 30 KDa. Figura 9.B. Los Western blot se cuantificaron utilizando el programa Image J y los resultados se grafican como niveles de expresión de GPAT2/VDAC correspondientes a las edades de 19, 30, 40 y 60 días. Los resultados corresponden al promedio  $\pm$  desvío estándar de cuatro experimentos independientes.

de testículos de ratas de diferentes edades y se midió la actividad GPAT de las mismas sin (actividad total) y con (actividad NEM resistente) el agregado de NEM 2 mM, para poder determinar la actividad GPAT2 NEM sensible por diferencia. A partir de estos ensayos se pudo observar que la actividad GPAT NEM sensible mitocondrial (GPAT2) alcanza un valor máximo a los 30 días de edad. Estas variaciones en los niveles de actividad GPAT NEM sensible en función de la edad son coherentes con las obtenidas en las medidas del ARNm y de la proteína (Fig. 10).

Los ensayos realizados en células en cultivo permitieron determinar que GPAT2 estimula tanto la síntesis de TAG como la esterificación de AA en los mismos. Los resultados obtenidos en el modelo animal permitieron determinar que GPAT2 se expresa y es activa en testículo al utilizar araquidonil-CoA como sustrato, mostrando un perfil de expresión y actividad que varía a lo largo del desarrollo postnatal. Teniendo en cuenta estos resultados, se decidió estudiar el contenido de TAG en testículo de ratas de diferentes edades y su composición en AG. El contenido de TAG se determinó por TLC y la composición en AG por cromatografía gas-líquido (Fig. 11).

Estos ensayos permitieron observar que solo el contenido de AA varía en función de la edad, presentando un máximo a los 30 días, lo cual es coherente con las variaciones observadas en las medidas de expresión y actividad de GPAT2. Teniendo en cuenta la mayor afinidad por el AA demostrada por GPAT2 en los ensayos realizados en cultivos celulares, esta correlación entre el contenido de

AA en los TAG y la expresión de GPAT2 en función de la edad sugiere que GPAT2 sería la enzima responsable de la esterificación del AA en los TAG del testículo.

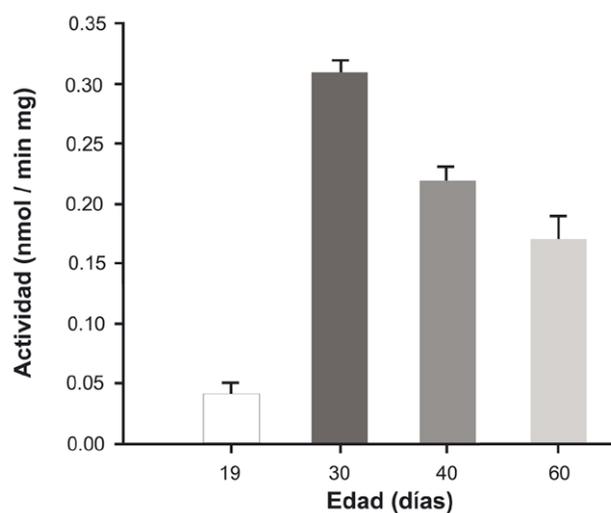


Figura 10. Actividad GPAT2 en mitocondrias puras de testículo de ratas de diferentes edades utilizando araquidonil-CoA como sustrato

Figura 10. Se determinó la actividad GPAT NEM sensible en mitocondrias puras aisladas de testículos de ratas de distintas edades utilizando araquidonil-CoA como sustrato. Los resultados se expresan como el promedio  $\pm$  desvío estándar de tres aislamientos independientes.

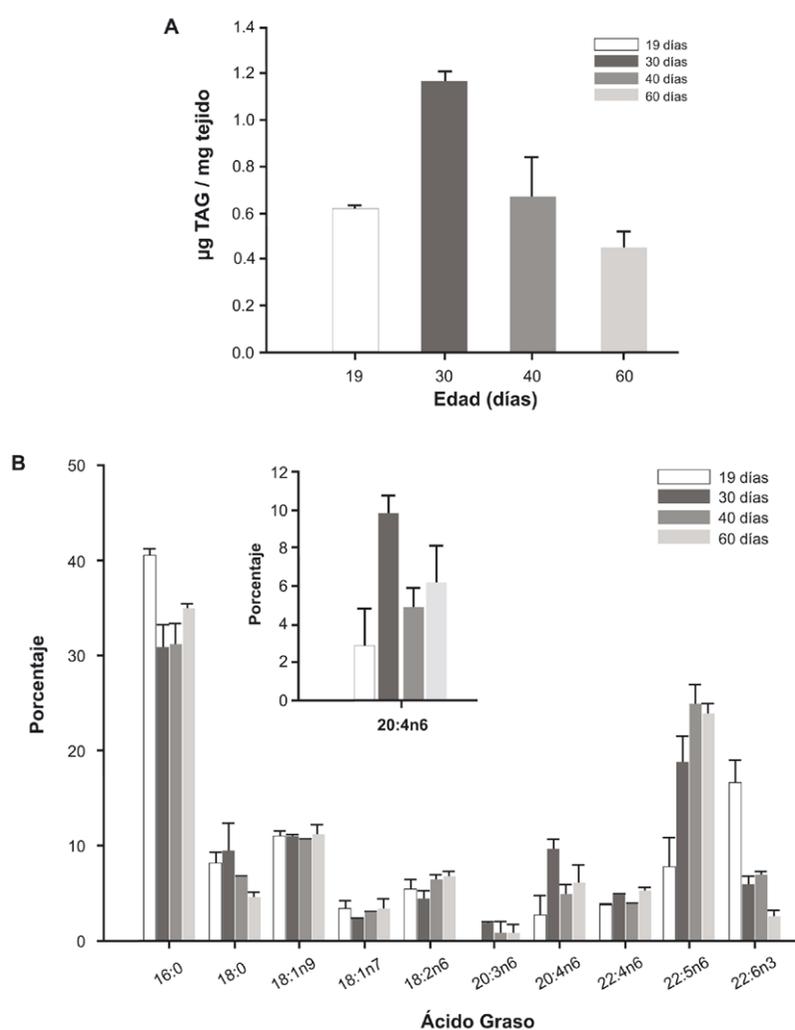


Figura 11. Contenido de TAG y composición en AG en testículo de ratas de diferentes edades.

Figura 11.A Se extrajeron los lípidos totales de testículos de ratas de 19, 30, 40 y 60 días con la técnica de Folch y se separaron por TLC. Luego se realizó una carbonización de la placa y se cuantificó la fracción correspondiente a los TAG utilizando el programa Image Quant. Los resultados se expresan como el promedio  $\pm$  desvío estándar de tres experimentos independientes.

Figura 11.B Se extrajeron los lípidos totales de testículos de ratas de 19, 30, 40 y 60 días con la técnica de Folch, se separaron por TLC, y los ácidos grasos correspondientes a los TAG fueron derivatizados y resueltos por GLC. En la figura inserta puede observarse el porcentaje correspondiente al AA: Los resultados se expresan como el promedio  $\pm$  la desviación estándar de tres experimentos independientes.

## Discusión y Conclusiones

La capacidad reproductiva del hombre adulto está condicionada, esencialmente, por el proceso de espermatogénesis. La producción continua de un número adecuado de espermatozoides funcionalmente competentes depende de múltiples factores, y la alteración parcial o total de este proceso representa alrededor del 80% de las causas de subfertilidad o esterilidad masculina (9).

El normal desarrollo de la espermatogénesis implica, además de cambios histológicos, importantes cambios

bioquímicos. Estos resultados permiten demostrar que el máximo de expresión de GPAT2 ocurre durante la primera espermatogénesis, la cual se desarrolla en la rata entre las semanas 1 y 8 de vida postnatal, y es un proceso clave para la maduración sexual y la funcionalidad del testículo. Durante esta primera espermatogénesis se ha podido observar que un gran número de células germinales mueren por apoptosis. Esta apoptosis ocurre de manera fisiológica como un mecanismo necesario para mantener una relación óptima entre el número de células germinales y el número de células de Sertoli. Las medidas de actividad y expresión de pro-

teínas proapoptóticas permitieron demostrar que en la rata esta apoptosis asociada a la primera espermatogénesis alcanza un máximo a los 25 días de edad y afecta principalmente a los espermatoцитos primarios (10). Es interesante destacar que en estas células se inicia la expresión de GPAT2.

Por otro lado, los ensayos realizados en células en cultivo permiten concluir que GPAT2 está implicada en la síntesis de TAG utilizando como sustrato específicamente al AA, y aunque muchos de los efectos ejercidos por el AA dependen de su estructura química o de productos de su metabolismo, hoy en día se sabe que el AA, de por sí cumple un rol muy importante participando de las vías de transducción de señales involucradas en la proliferación y supervivencia celular (11). En mamíferos ha sido observado que altos niveles de AA libre intracelular promueven apoptosis, y se ha sugerido que las vías metabólicas que disminuyen los niveles de AA libre dentro de las células podrían, por lo tanto, prevenir la apoptosis (12) (13).

La presencia en el genoma de los mamíferos de varias isoenzimas de GPAT sugiere que cada una de ellas cumpliría una función específica en el metabolismo de los glicerolípidos. Existen diferencias importantes entre GPAT2 y las demás isoformas de GPAT. Las isoformas de GPAT 1 y 3 se localizan principalmente en tejidos lipogénicos, como el hígado y el tejido adiposo, y son las enzimas responsables de la síntesis de TAG. GPAT4 ha sido detectada en testículo, pero a diferencia de GPAT2 también se expresa en hígado, tejido adiposo, y glándula mamaria. GPAT4 se localiza en el RE y es la enzima responsable del 50% de la actividad GPAT en el hígado. Los ratones nulos para GPAT4 presentan valores disminuidos de TAG en el hígado, en el tejido adiposo y en la leche materna, pero en ellos no han sido reportados defectos en la fertilidad (14).

Por su parte, GPAT2 también está implicada en la síntesis de TAG, pero presenta un alto nivel de expresión en el testículo, en particular en células cuya principal característica es la de encontrarse en división celular activa, en las cuales GPAT2 cataliza la esterificación del araquidonil-CoA en los TAG. GPAT2, al contrario de lo que sucede con GPAT4, no ha sido detectada en tejidos lipogénicos y además, al contrario de lo que sucede con GPAT1 y otras enzimas lipogénicas como la ácido graso sintasa y la acetil-CoA carboxilasa, los niveles del ARNm correspondiente a *Gpat2* no resultan alterados en experimentos de ayuno-realimentación (5). Esto sugiere que GPAT2 podría estar involucrada en la síntesis de TAG que estarían cumpliendo una función diferente a la de ser moléculas de reserva energética.

Los TAG de testículo de ratas adultas se caracterizan por poseer un alto contenido de PUFA siendo el mayoritario el 22:5n6, y por ensayos de depleción de células de la línea germinal y de detección de las gotas de lípidos neutros intracelulares realizados en animales adultos ha

sido demostrado que la síntesis de TAG en el testículo ocurre principalmente en las células germinales (15). Varios resultados experimentales apoyan la idea que, una posible función de estas especies moleculares de TAG con alto contenido de PUFA presentes en el testículo es la de almacenar estos AG preformados, los cuales pueden servir también como precursores para la síntesis de los PUFA de 22 carbonos presentes en los GPL (1).

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

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

#### CORRESPONDENCIA

DRA. ELIZABETH CATTÁNEO  
INIBIOLP, Fac. Cs. Médicas, UNLP  
Calle 60 y 120 S/N, 1900 La Plata  
Tel. 02214824894 int 102  
E-mail: elizabethcattaneo@gmail.com

#### Referencias bibliográficas

1. Furland NE, Maldonado EN, Aveldaño MI. Very long chain PUFA in murine testicular triglycerides and cholesterol esters. *Lipids* 2003; 38: 73-80.
2. Retterstol K, Tran TN, Haugen TB, Christophersen BO. Metabolism of very long chain polyunsaturated fatty acids in isolated rat germ cells. *Lipids* 2001a; 36: 601-6.

3. Retterstol K, Haugen TB, Tran TN, Christophersen BO. Studies on the metabolism of essential fatty acids in isolated human testicular cells. *Reproduction* 2001 b; 121: 881-7.
4. Furland NE, Maldonado EN, Ayuza Aresti P, Aveldaño MI. Changes in lipids containing long- and very long-chain polyunsaturated fatty acids in cryptorchid rat testes. *Biol Reprod* 2007; 77: 181-8.
5. Wang S, Lee DP, Gong N, Schwerbrock NM, Mashek DG, Gonzalez-Baro MR, et al. Cloning and functional characterization of a novel mitochondrial N-ethylmaleimide-sensitive glycerol-3-phosphate acyltransferase (GPAT2). *Arch Biochem Biophys* 2007; 465: 347-58.
6. Aveldaño MI, Robinson BS, Johnson DW, Poulos A. Long and very long chain polyunsaturated fatty acids of the n-6 series in rat seminiferous tubules. Active desaturation of 24:4n-6 to 24:5n-6 and concomitant formation of odd and even chain tetraenoic and pentaenoic fatty acids up to C32. *J Biol Chem* 1993; 268: 11663-9.
7. Pellon-Maison M, Montanaro MA, Coleman RA, Gonzalez-Baro MR. Mitochondrial glycerol-3-P acyltransferase 1 is most active in outer mitochondrial membrane but not in mitochondrial associated vesicles (MAV). *Biochem Biophys Acta* 2007; 1771: 830-8.
8. Nogueiras R, Barreiro ML, Caminos JE, Gaytán F, Suominen JS, Navarro VM, et al. Novel expression of resistin in rat testis: functional role and regulation by nutritional status and hormonal factors. *J Cell Sci* 2004; 117: 3247-57.
9. Serio M, Forti G. The impact of andrological research on the treatment of male infertility. En: Waites GMH, Frick J, Baker GWH (Eds). *Current advances in andrology*. London: Monduzzi Ed; 1997; 23-9.
10. Jahnukainen K, Chrysis D, Hou M, Parvinen M, Eksborg S, So O. Increased apoptosis occurring during the first wave of spermatogenesis is stage-specific and primarily affects midpachytene spermatocytes in the Rat Testis. *Biology of Reproduction* 2004; 70: 290-6.
11. Surette ME, Winkler JD, Fonteh AN, Chilton FH. Relationship between arachidonate-phospholipid remodeling and apoptosis. *Biochemistry* 1996; 35: 9187-96.
12. Rizzo MT, Regazzi E, Garau D, Akard L, Dugan M, Boswell HS, et al. Induction of apoptosis by arachidonic acid in chronic myeloid leukemia cells. *Cancer Research* 1999; 59: 5047-53.
13. Finstad HS, Kolset SO, Holme JA, Wiger R, Farrants AK, Blomhoff R, et al. Effect of n-3 and n-6 fatty acids on proliferation and differentiation of promyelocytic leukemic HL-60 cells. *Blood* 1994; 84: 3799-809.
14. Nagle CA, Vergnes L, DeJong H, Wang S, Lewin TM, Reue K, et al. Identification of a novel sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase isoform, GPAT4, as the enzyme deficient in *Agpat6*<sup>2/2</sup> mice. *J Lipid Res* 2008; 49: 823-31.
15. Oresti GM, Reyes JG, Luquez JM, Osses N, Furland NE, Aveldaño MI. Differentiation-related changes in lipid classes with long-chain and very long-chain polyenoic fatty acids in rat spermatogenic cells. *J Lipid Res* 2010; 51: 2909-21.

**Aceptado para su publicación el 9 de abril de 2013**