

PEDECIBA
Area Biología
Subárea Biología Celular y Molecular

Tesis de Maestría:

**Evaluación de un nuevo fluorocromo para la
purificación en flujo de diversos estadios
espermatogénicos y células somáticas, de testículo
de ratón.**

Elisa Souza Sadetzki

Directora de tesis: Rosana Rodríguez Casuriaga

Co-directora de tesis: Adriana Geisinger Wschebor

Tribunal evaluador: Dra. Rebeca Chávez

Dra. Alejandra Kun

Dra. Cristina Touriño

Para mi amado hijo Ismael Jones que me hace feliz todos los días de mi vida.

AGRADECIMIENTOS:

A la Agencia Nacional de Investigación e Innovación, al programa de posgrados PEDECIBA y al departamento de Genética y Biología Molecular del IIBCE, que hicieron posible la realización de mis estudios de maestría.

A mi directora de maestría la Dra. Rosana Rodríguez Casuriaga por los conocimientos adquiridos y su dedicación junto con la co-directora la Dra. Adriana Geisinger.

Al Técnico en Citometría de Flujo el Mag. Federico Santiñaque por su colaboración en mis estudios de maestría y buena disposición. A compañeros del Instituto: Mag. Adrian Capoano, Paola Bianchimano y el Dr. Gustavo Folle.

A los miembros del tribunal: Dras. Rebeca Chávez, Alejandra Kun, Cristina Touriño por su participación en la etapa final de la tesis.

A mis padres y hermana: Ana María Sadetzki, Enrique Alberto Souza y Claudia Souza por enseñarme a ser mejor persona y nunca bajar los brazos.

A mi compañero Washington Jones por estos diez años juntos y por intentar salir adelante viviendo de la ciencia.

A mis amigos: María Fernanda San Roman, Daniela Lima, Lucía Alonso, Rosina Nielsen Andrés Rinderknecht, Norma Rodríguez, Antonio Morelli y Leandro Guliani por el apoyo y optimismo durante el transcurso del posgrado.

A mi prima Beatriz Souza por ser un ejemplo de lucha.

A mis abuelas y tía Susana Sadetzki que no se encuentran físicamente, por su profundo amor y por sus huellas que dejaron en mí.

TABLA DE CONTENIDOS

Lista de abreviaturas.....	6
RESUMEN.....	7
I. INTRODUCCIÓN.....	9
I.1. Morfología e histoarquitectura testicular.....	10
I.2. Espermatogénesis y meiosis.....	13
I.3. Citomorfología de principales tipos celulares de testículo.....	19
I.4. Dificultades y estrategias clásicas para el estudio de la espermatogénesis.....	23
I.5. La citometría de flujo para la clasificación celular basada en contenido de ADN.....	26
I.6. La espermatogénesis vista a través de la citometría de flujo.....	27
I.7. Antecedentes del grupo de trabajo.....	31
II. OBJETIVOS.....	33
II.1. Objetivo general.....	34
II.2. Objetivos específicos.....	34
III. MATERIALES y MÉTODOS.....	35
III.1. Animales.....	36
III.2. Preparación de las suspensiones celulares de testículo.....	36
III.2.a. Preparación de suspensiones celulares con método exclusivamente mecánico.....	36
III.2.b. Preparación de suspensiones celulares con método combinado.....	37
III.3. Análisis y separación por citometría de flujo.....	37
III.3.a. Exposición de suspensiones celulares a VDG.....	37
III.3.b. Análisis citométrico en flujo.....	37
III.3.c. Clasificación en flujo de poblaciones de interés.....	38
III.4. Inmunolocalizaciones.....	39
III.4.a. Anticuerpos empleados.....	40
III.4.b. Preparación de soportes con Poli-L-Lisina.....	40
III.4.c. Inmunohistoquímica sobre criosecciones testiculares.....	40
III.4.d. Inmunocitoquímica sobre portaobjetos.....	41
III.4.e. Inmunocitoquímica sobre cubreobjetos.....	42
III.5. Análisis confirmatorios de identidad de poblaciones clasificadas por qRT-PCR.....	44

III.5.a. Diseño de iniciadores para transcritos marcadores de tipo celular.....	44
III.5.b. Ensayos de transcripción reversa (RT) seguida por PCR a tiempo final.....	34
III.5.c. Confirmación de identidades celulares mediante RT y PCR a tiempo real.....	45
IV. RESULTADOS	
IV.1. <i>Vybrant Dye Cycle Green</i> aplicado a suspensiones celulares de testículo de ratón: clasificación de poblaciones celulares C y 4C.....	48
IV.2. <i>Vybrant Dye Cycle Green</i> y su poder de discriminación dentro de la población 4C de testículo de ratón.....	51
IV.3. Diferencias en enriquecimiento relativo de poblaciones celulares testiculares de interés para diferentes edades posparto.....	53
IV.4. <i>Vybrant Dye Cycle Green</i> y la distinción de subpoblaciones celulares dentro de la población 2C.....	59
IV.5. Determinación de identidad de subpoblaciones dentro de población 2C.....	62
IV.6. Ensayos confirmatorios de identidades mediante qRT-PCR.....	71
IV.7. Optimización de protocolo de preparación de suspensiones celulares.....	72
V. DISCUSIÓN y PERSPECTIVAS.....	75
V.1. <i>Vybrant Dye Cycle Green</i> aplicado a suspensiones celulares de testículo de ratón.....	76
V.2. <i>Vybrant Dye Cycle Green</i> y su poder de discriminación dentro de la población 4C de testículo de ratón.....	78
V.3. Utilidad del parámetro SSC-H para ubicación inequívoca de la población 2C de células testiculares.....	79
V.4. SSC-H como parámetro discriminador de células somáticas y células de línea germinal en la población 2C.....	80
V.5. Aportes metodológicos en relación a la preparación de suspensiones celulares de testículo.....	82
V.6. Desarrollos originados y potenciales aplicaciones a futuro, a partir de los resultados de este trabajo.....	83
VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	86
VII. ANEXOS.....	99
VII.1. Tabla de iniciadores empleados en los PCR.....	100
VII.2. Ensayos de inmunohistoquímica.....	101

Lista de abreviaturas

C - población celular con contenido de ADN=C
2C - población celular con contenido de ADN=2C
4C - población celular con contenido de ADN=4C
BSA – seroalbúmina bovina
CMF – citometría de flujo
CS – complejo sinaptonémico
D - espermatocitos diploténicos
DIC – microscopía de contraste de interferencia diferencial o Nomarski
dpp – días posparto
EAs – ejes axiales
EC – elemento central del complejo sinaptonémico
ELs – elementos laterales del complejo sinaptonémico
ER – espermátidas redondas
FL1-A – Intensidad de fluorescencia (área de pulso)
FL1-W – Duración de la detección de fluorescencia (ancho de pulso)
FSC-H – Forward scatter o dispersión frontal
FTs – filamentos transversos del complejo sinaptonémico
L – espermatocitos leptoténicos
NGS – *Next generation sequencing*
P - espermatocitos paquiténicos
PCR – reacción en cadena de la polimerasa
qPCR – PCR en tiempo real
RT – transcripción reversa
SFB – suero fetal bovino
SSC-H – Side scatter o dispersión lateral
TA – temperatura ambiente
VDG – *Vybrant DyeCycle Green*
Z – espermatocitos cigoténicos

RESUMEN:

La espermatogénesis en los mamíferos implica tres grandes procesos: proliferación mitótica de las espermatogonias, divisiones meióticas y espermiogénesis. El testículo presenta una gran heterogeneidad celular, conteniendo diversos tipos de células germinales y somáticas. Las células de línea germinal masculina comprenden varios tipos morfológicos que representan diferentes fases de desarrollo y diferenciación de los gametos masculinos: varios tipos de espermatogonias, espermatocitos primarios en diferentes estadios de primera profase meiótica, espermatocitos secundarios, espermatidas redondas, espermatidas en elongación y elongadas. Las células somáticas testiculares corresponden a las células de Sertoli, células de Leydig y células mioideas peritubulares, entre otras. Poder discriminar y purificar células espermatogénicas cursando diversos estadios de interés, así como también células somáticas de importancia para el proceso de espermatogénesis (Leydig, Sertoli), tiene gran relevancia para estudios moleculares que requieren material puro o altamente enriquecido, como por ejemplo estudios de transcriptómica a través de NGS (next generation sequencing).

En este estudio se evaluó la utilidad de un miembro de la relativamente nueva familia de fluorocromos *Vybrant DyeCycle* en la distinción de diferentes poblaciones celulares de testículo de ratón mediante citometría de flujo (CMF) sin necesidad de marcas fluorescentes adicionales, lo que representa importantes ventajas en relación al uso de anticuerpos. Para ello se emplearon y adaptaron métodos desarrollados por nuestro grupo de investigación para la preparación de suspensiones celulares testiculares, y se incorporó el fluorocromo vital *Vybrant DyeCycle Green* (VDG), mediante el cual rindió patrones peculiares de tinción de la cromatina. Se pudieron distinguir diferentes poblaciones celulares testiculares mediante análisis citométricos en flujo y purificarlas en base a diferencias en el contenido de ADN, tamaño celular y complejidad interna-externa de las mismas, entre otros parámetros.

En relación a células meióticas, dentro de la población con contenido de ADN 4C (primera profase meiótica) se identificaron dos poblaciones celulares que correspondieron a diferentes estadios de espermatocitos primarios: espermatocitos en profase temprana (leptoteno y cigoteno) y espermatocitos tardíos (paquiteno y diploteno). Esto implicó un gran avance respecto que en el ratón - modelo mamífero por excelencia- no se había podido discriminar claramente (como poblaciones independientes bien definidas en los gráficos) estadios meióticos tempranos de estadios tardíos debido a la escasa representación que presentan los primeros a consecuencia de su corta duración.

Con respecto a la fracción en la cual se encuentran las espermatogonias, los espermatocitos secundarios y diversos tipos de células somáticas testiculares, denominada fracción 2C, se exploró el potencial discriminatorio del VDG en relación a las diversas poblaciones espermatogénicas y somáticas testiculares de interés, en base a diferencias en varios parámetros (tamaño celular, granularidad o complejidad interna-externa, intensidad de fluorescencia emitida). Es importante destacar, que se logró discriminar con éxito la población de células somáticas de las espermatogonias debido a las grandes diferencias en su complejidad interna-externa. Estos resultados fueron confirmados mediante análisis citológico, inmunomarcación con anticuerpos dirigidos contra antígenos específicos, y posterior qRT-PCR.

Finalmente, también pudieron realizarse aportes metodológicos relacionados con la preparación de las suspensiones celulares, los que condujeron a un procesamiento combinado enzimático-mecánico que mostró una mayor reproducibilidad que lo que se venía empleando anteriormente.

Los datos de esta tesis demuestran sensibilidad a las variaciones de organización cromosómica y somática durante la espermatogénesis en el ratón. En conjunto, los datos aportados en la presente tesis demuestran el gran potencial del uso del *Vybrant DyeCycle Green* en la purificación en flujo de diversos estadios espermatogénicos y células somáticas de testículo de ratón.

I. INTRODUCCIÓN

1.1. Morfología e Histoarquitectura testicular

El aparato reproductor masculino está constituido por una serie de estructuras cuya misión es producir las células reproductoras masculinas (espermatozoides) y las hormonas responsables de los caracteres masculinos. Está integrado por los testículos (gónadas), un sistema tubular de almacenamiento y conducción (túbulos seminíferos), glándulas accesorias que participan en la formación del semen y el pene, órgano de la copulación (Chemes, 1986). Los testículos son órganos pares, ovoides, situados en el interior del escroto, y son los responsables de la producción de gametos.

Los testículos están cubiertos exteriormente por la túnica vaginal. Esta estructura está constituida por dos capas, una parietal adherida al escroto, y otra visceral que representa el revestimiento peritoneal del testículo y está asociada a la capa subyacente que es la túnica albugínea. Su constitución histológica es la de una serosa: mesotelio y tejido conectivo laxo que se fusiona con la albugínea. La túnica albugínea se encuentra debajo de la anterior y está constituida por tejido conjuntivo denso irregular que presenta un aspecto blanco nacarado. En la mayoría de las especies aparece en la parte interna de esta túnica, un sector muy vascularizado que recibe el nombre de estrato o capa vascular. De la túnica albugínea se originan tabiques de tejido conjuntivo laxo hacia el interior, denominados tabiques o septos interlobulillares, que dividen el parénquima testicular en lobulillos (Figura 1.1), cada uno de los cuales contiene de uno a cuatro túbulos seminíferos. Los tabiques se continúan con el tejido conjuntivo laxo que rodea a los túbulos seminíferos y contiene numerosas fibras reticulares, y es donde se sitúan las células intersticiales o de Leydig, que producen andrógenos testiculares, sobre todo testosterona (Chemes, 1986). Se ha determinado que la testosterona es requerida para importantes procesos, como ser la progresión de las células germinales a través de la meiosis; la liberación de espermátidas maduras (Sharpe, 1994); la adhesión celular de las espermátidas redondas a las células de Sertoli (Holdcraft y Braun, 2004); y la integridad de la barrera hematotesticular (Willems *et al.*, 2010; Meng *et al.*, 2011). Además, se han identificado numerosos efectos beneficiosos de la terapia con testosterona exógena, en casos de niveles deficientes por diversas causas (revisión reciente por Traish, 2016).

Cada túbulo seminífero está rodeado de una lámina de tejido conjuntivo. Cerca de 30 tipos celulares coexisten en los túbulos seminíferos de los mamíferos entre las células de la línea germinal y las células somáticas (De Rooij, 2001). Las células germinales comprenden varios tipos morfológicos que representan diferentes fases de desarrollo y diferenciación de los gametos masculinos. Incluyen varios tipos de espermatogonias, espermatocitos primarios en diferentes estadios de profase meiótica, espermatocitos secundarios, espermátidas redondas, espermátidas en elongación y elongadas. Las células somáticas

son las células de Sertoli, de función nodriza, y las células mioideas peritubulares. A nivel del intestecio entre los túbulos seminíferos se encuentra un tejido conjuntivo laxo que contiene células de Leydig y otras células ubicuas como macrófagos, fibroblastos, mastocitos, linfocitos y otros.

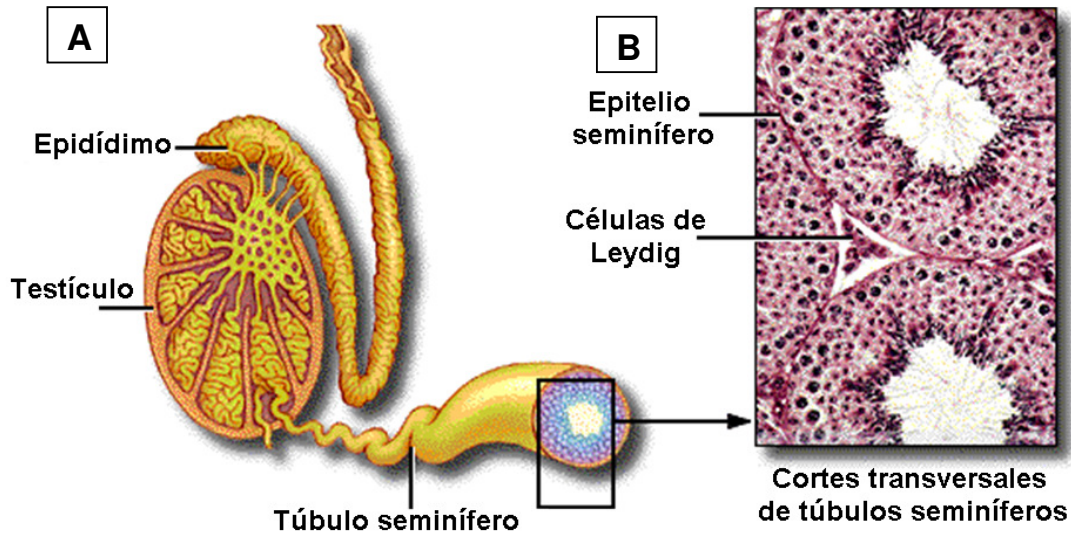


Figura 1.1 – **A)** Esquema representativo de estructura testicular. **B)** Cortes transversales de túbulo seminífero visualizados por microscopía óptica, mostrando entre ellos los espacios intersticiales que alojan a las células de Leydig.

Dentro de los túbulos, los diferentes estadios celulares espermatogénicos en secciones transversales definen asociaciones celulares características de cada especie, según fuera descrito por Clermont para varias especies de mamíferos (Leblond y Clermont, 1952; Clermont, 1960, 1963). La secuencia ordenada de estas asociaciones en determinado sector de un túbulo constituye un ciclo del epitelio seminífero.

En la pared de los túbulos seminíferos las células espermatogénicas se encuentran dispuestas en varias capas ubicadas entre las células de Sertoli (Figura 1.2). Estas células tienen funciones de sostén, nutritivas y participan en la liberación de los espermatozoides en la luz del túbulo seminífero. Además, eliminan los productos de desecho y sobre todo, los restos citoplasmáticos de las espermátidas. Sin el soporte físico y metabólico de las células de Sertoli la diferenciación de las células germinales, la meiosis y la transformación en espermatozoides no ocurriría (Sharpe, 1994). La cantidad de células de Sertoli en el testículo adulto determina tanto el tamaño del testículo como la producción diaria de esperma.

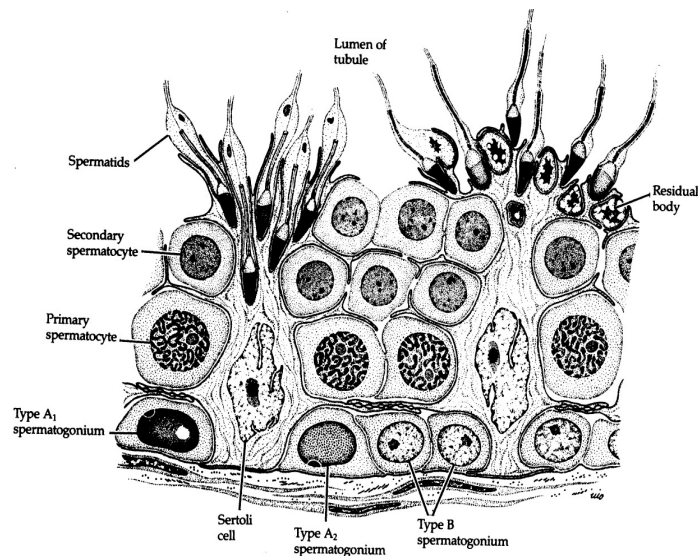


Figura 1.2.- Esquema de una sección transversal de túbulo seminífero de mamífero, mostrando la gran heterogeneidad celular. Obsérvese el relacionamiento de las células de Sertoli (nodrizas) con las de la línea germinal en el epitelio seminífero. A medida que las células maduran, progresan hacia la luz del túbulo. También se observa en este esquema la naturaleza sincicial de este epitelio con clones de células unidas a través de puentes citoplásmicos (extraído de Dym, 1977).

Uniones estrechas existentes entre células de Sertoli adyacentes constituyen la barrera hemato-testicular, de gran importancia para evitar respuestas autoinmunes, y que definen dos compartimentos en el epitelio seminífero (Mital *et al.* 2011). En el compartimento basal se encuentran las espermatogonias, que proliferan mitóticamente permitiendo que el proceso de espermatogénesis (a diferencia de la ovogénesis) pueda darse desde la pubertad hasta el final de la vida del individuo. En el compartimento adluminal se disponen los espermatocitos primarios (cursando meiosis I), los espermatocitos secundarios (en meiosis II), y las espermátidas (en etapa de diferenciación terminal o espermiogénesis). Estas últimas, se ubican más cercanas a la luz tubular, en la zona apical del epitelio.

En el testículo prepuberal los túbulos seminíferos son de mayor diámetro que los del testículo fetal y todavía no poseen una luz central. El epitelio seminífero contiene espermatogonias y células de Sertoli inmaduras. En los espacios intertubulares han desaparecido las células de Leydig fetales, por la ausencia de gonadotrofinas placentarias, y se observan células con aspecto fibroblástico. Luego de la pubertad se produce la maduración del testículo hasta su estado adulto en el que se pueden observar todas las características del órgano maduro (Chemes, 1986).

1.2. Espermatogénesis y Meiosis

La espermatogénesis es un complejo proceso que conduce a la formación de gametos masculinos en los testículos, y puede subdividirse en tres grandes etapas: a) proliferación mitótica de las espermatogonias, células precursoras de las células meióticas, b) divisiones meióticas de los espermatocitos, y c) espermiogénesis (Figura 1.3).

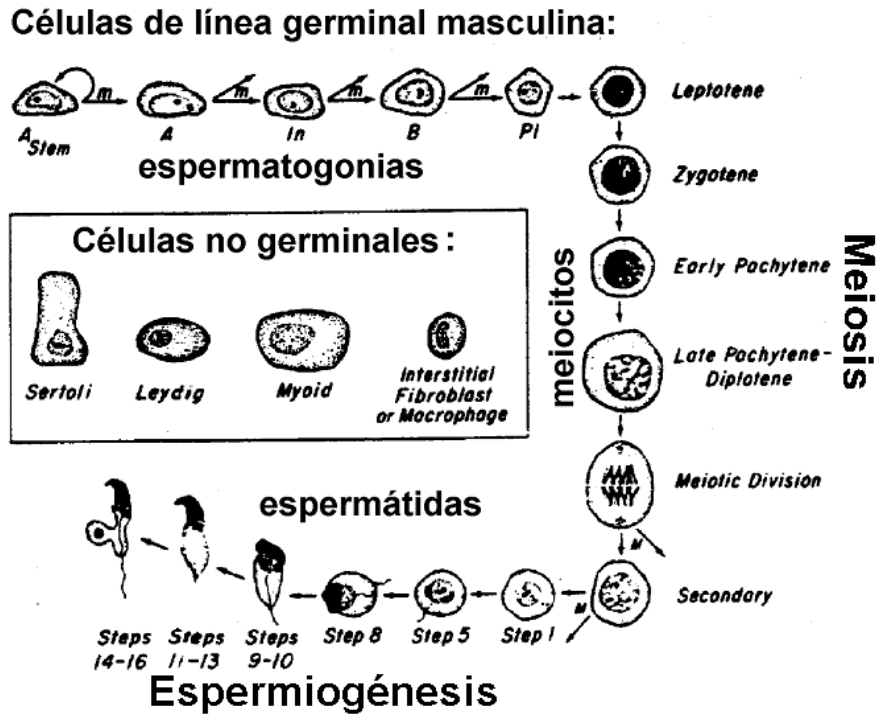


Figura 1.3 – Esquema representando las tres grandes fases de la espermatogénesis y los tipos celulares presentes en el epitelio seminífero, representativos de cada etapa (modificado a partir de Meistrich, 1977).

Durante la primera fase, las espermatogonias se dividen mitóticamente asegurando la renovación celular en el epitelio seminífero, que posibilita la producción de gametos desde la pubertad y durante toda la vida adulta del individuo. Existen diferentes tipos de espermatogonias. En los mamíferos no primates, las espermatogonias *A-single* (As) son las células madres conocida en inglés como stem (Huckins, 1971; Oakberg, 1971; Lok *et al.*, 1982; De Rooij, 1998) que se dividen por mitosis generando nuevas células stem. Las espermatogonias *A-paired* (Apr) producen células hermanas que permanecen conectadas por puentes intercelulares. La espermatogonia Apr está predestinada a desarrollarse a través de la línea espermatogénica y dividirse en cadenas de 4 espermatogonias *A-aligned*

(Aal). Las cadenas de espermatogonias Aal pueden dividirse en cadenas de 8, 16 y raramente 32 células.

La espermatogénesis es un proceso cíclico que en ratones puede dividirse en 12 estadios (I–XII). En el estadio VIII, As, Apr y pocas Aal espermatogonias están presentes. A partir del estadio X en adelante, esas células empiezan a proliferar de manera que se forman cada vez más espermatogonias Aal. El estadio XII es seguido del estadio I. En los estadios II-III se detiene la proliferación y las células quedan en fase de arresto G1-GO. Subsecuentemente, en los estadios VII-VIII, sin división, casi todas las espermatogonias Aal formadas durante el período de proliferación activa se diferencian en A1. La espermatogonia A1 entra en fase S y en el estadio IX se divide en espermatogonia A2, luego hay 5 divisiones subsecuentes en A3, A4, intermedias (In), espermatogonias B y espermatocitos primarios, respectivamente. En total hay 9-11 divisiones mitóticas durante el desarrollo espermatogénico (De Rooij, 2001).

La meiosis es un tipo de división celular especial de línea germinal consistente en una duplicación del ADN seguida de dos divisiones consecutivas (meiosis I y II), cuyo resultado son células haploides con un único juego de cromosomas. Está altamente conservada en los eucariotas. La primera división meiótica es única por mantener asociadas las cromátidas hermanas a nivel de sus centrómeros, mientras que los cromosomas homólogos se comportan coordinadamente, migrando a polos opuestos. Durante la segunda división meiótica las cromátidas hermanas pierden sus conexiones centroméricas y segregan a polos opuestos (Figura I.4).

Algunos de los eventos principales de la meiosis como el apareamiento y recombinación de cromosomas homólogos, ocurren durante la profase de la primera división meiótica y se encuentran mediados por complejos proteicos especializados llamados complejos sinaptonémicos (CSs) (Fraune *et al.*, 2012). La recombinación meiótica o *crossing-over* es fuente fundamental de biodiversidad para las especies con reproducción sexual, ya que los cambios producidos pueden pasar a la generación siguiente. El apareamiento de cromosomas homólogos y su segregación posterior mantienen el número cromosómico de la especie. La importancia de estos eventos es evidente ya que sus eventuales alteraciones suelen detectarse por puntos de control o *check-points*, desencadenando apoptosis e infertilidad. Varias proteínas del apareamiento y recombinación meióticas en mamíferos resultan esenciales y su alteración, además de causar infertilidad, está vinculada a numerosas patologías como algunos síndromes y tipos de cáncer (Cohen *et al.*, 2006).

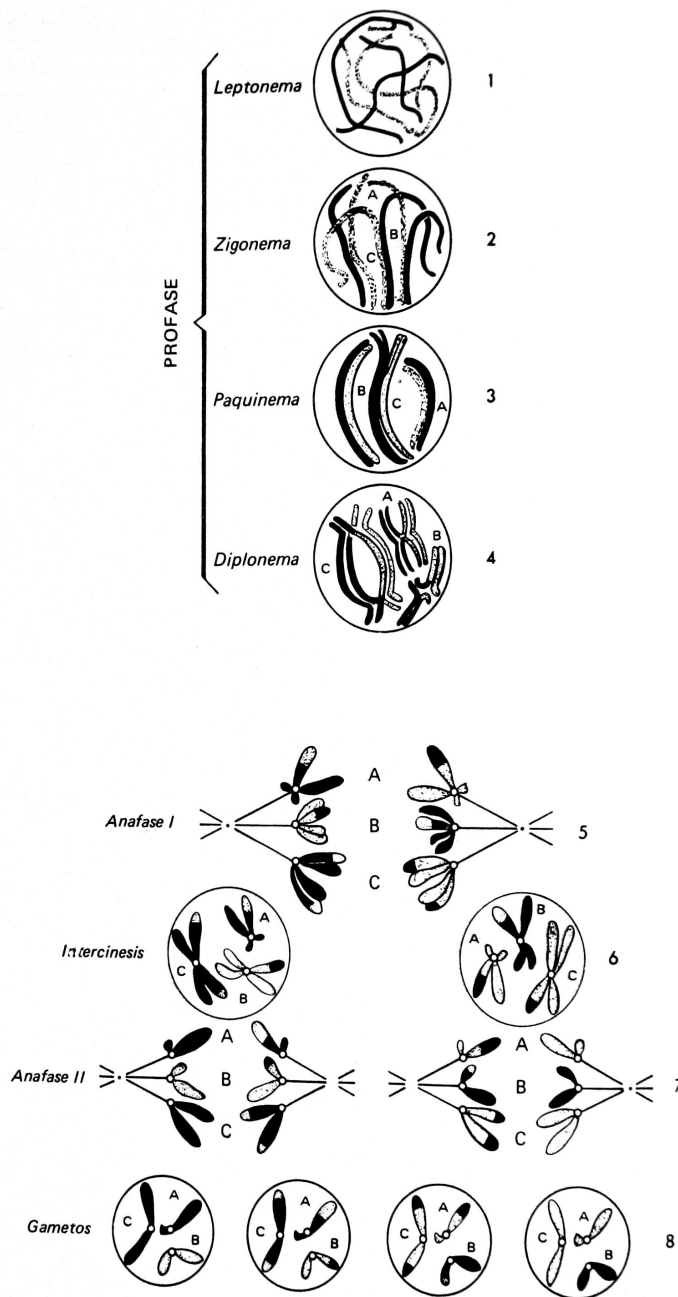


Figura I.4.- Esquema representativo del proceso de meiosis. Se muestran los principales estadios de la extensa y compleja profase I, y las dos divisiones consecutivas que resultan en células con un único complemento cromosómico (adaptado de De Robertis y De Robertis, 1981).

La meiosis I se caracteriza por una extensa profase que ha sido subdividida en cinco estadios para facilitar su descripción: leptoteno (L), cigoteno (Z), paquiteno (P), diploteno (D) y diacinesis. En L aún no ha comenzado el apareamiento homólogo. Este estadio se caracteriza por el aspecto de la cromatina dispuesta como finos filamentos y por la organización de ejes de naturaleza proteica a lo largo de los cromosomas. A estos ejes se

les conoce como ejes cromosómicos simples o elementos axiales (EAs). Es también durante el L que los extremos teloméricos insertos a nivel de la periferia nuclear se mueven en el plano de la envoltura nuclear (EN), y comienzan a agruparse (Moses, 1968). En la transición al estadio siguiente, el cigoteno (Z), los telómeros llegan a concentrarse en un sector limitado de la envoltura nuclear, lo cual conduce a una peculiar conformación cromosómica denominada *bouquet* (Esponda y Giménez-Martín, 1972; Scherthan, 2007) (Figura I.5).

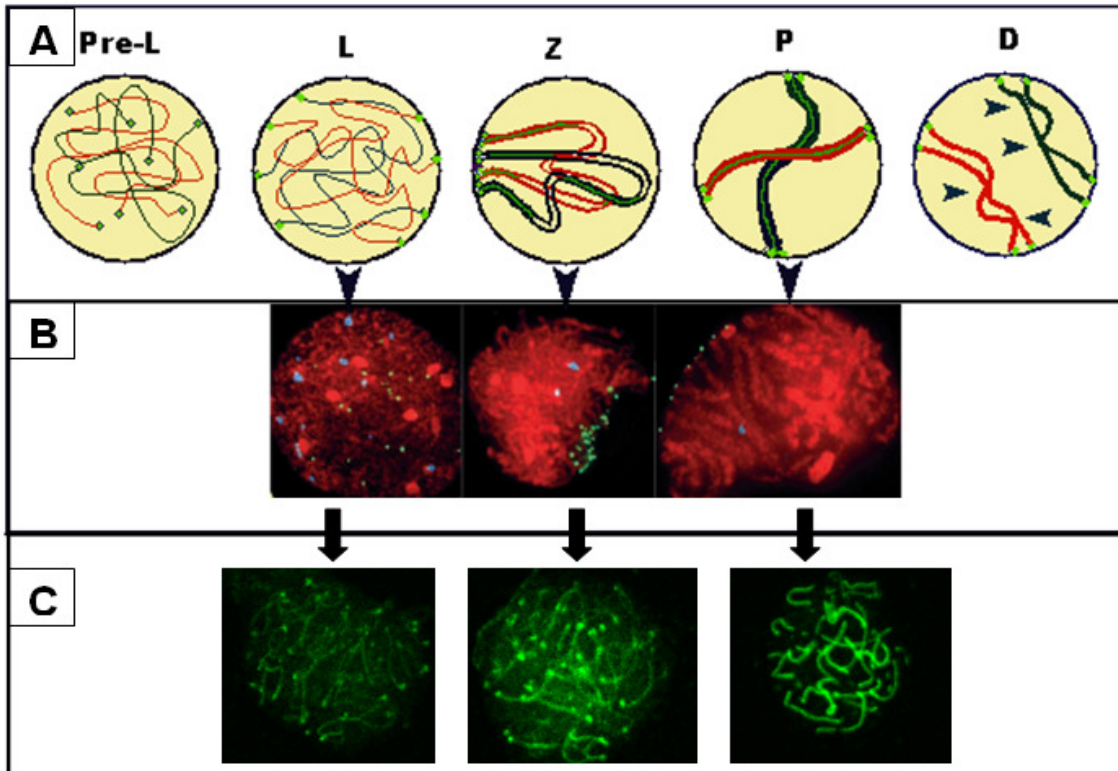


Figura I.5 – A) Esquema mostrando el comportamiento de los cromosomas durante la primera profase meiótica. Nótese la inserción de los extremos teloméricos (puntos verdes) a nivel de la EN en el estadio de leptoteno (L) y su desplazamiento y final congregación en un área limitada de la EN durante el cigoteno (Z), resultando en la formación del bouquet. Obsérvese que mientras que en Z los cromosomas homólogos se encuentran parcialmente sinapsados, coexistiendo tramos de CS (líneas verdes) con ejes simples aún no ensamblados, en paquiteno (P) la sinapsis se extiende de un extremo cromosómico al otro. En diploteno (D) puede apreciarse la presencia de quiasmas (cabezas de flecha). **B)** Modificaciones de la cromatina y formación del bouquet en meiocitos de maíz. La cromatina teñida con DAPI se muestra en rojo y los telómeros teñidos con FITC en verde. Puede observarse que en Z la cromatina está más condensada que en L. En P puede intuirse que se ha completado la sinapsis ya que la cromatina exhibe un ancho que duplica lo observado en estadios anteriores (extraído de Harper et al., 2004). **C)** Inmunomarcación de la proteína SYCP3 (synaptonemal complex protein 3), componente de elemento lateral de CS de ratón. Nótese los diferentes patrones de marca obtenidos según el estadio meiótico en cuestión.

Ha sido sugerido que esta disposición peculiar de los telómeros durante la profase facilitaría el reconocimiento cromosómico y el apareamiento estable de los homólogos (Zickler y Kleckner, 1998), ya que es durante el Z que los cromosomas homólogos

comienzan a aparearse (sinapsis homóloga), y los EAs pasan a constituir, en tramos de longitud creciente, los elementos laterales (ELs) de estructuras más complejas: los complejos sinaptonémicos (CSs) (von Wettstein *et al.*, 1984; Kleckner, 2006; Zickler, 2006; Cohen *et al.*, 2006). Los CSs son complejos macropoteicos específicos de la meiosis que al microscopio electrónico (ME) de transmisión se observan como estructuras tripartitas integradas por dos ELs y un elemento central o medial (EM) (Fig. I.6). Los ELs y el EM se mantienen unidos por finas fibras denominadas filamentos transversos (Wettstein y Sotelo, 1971; Schmekel y Daneholt, 1995).

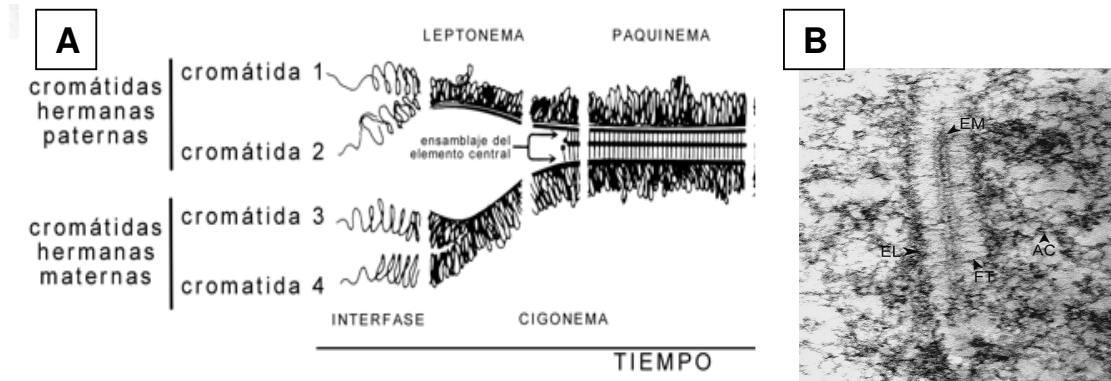


Figura I.6 - A, Esquemización de los cambios en la organización de la cromatina y estructuras asociadas, desde finales de la interfase premeiótica hasta el estadio de paquiteno de la primera profase meiótica (extraído de De Robertis y De Robertis, 1981). **B**, CS de *Grillus argentinus* observado al microscopio electrónico. EL, elemento lateral; EM, elemento medial; FT, filamentos transversos; AC, asas de cromatina (microfotografía obtenida en el Departamento de Biología Molecular del IIBCE).

En estas etapas tempranas, L y Z, es posible detectar complejos proteicos sobre los cromosomas (nódulos de recombinación tempranos) que marcarían todos los sitios vinculados al intercambio de hebras. Los nódulos de recombinación tardíos pueden observarse durante el P, y son menores en número a los nódulos tempranos detectados en L/Z, ya que se corresponden con aquellos intercambios efectivamente resueltos como *cross-overs* (Moens *et al.*, 2007; revisión por Handel y Schimenti, 2010).

En la siguiente etapa, paquiteno (P), los cromosomas se encuentran totalmente sinapsados de un extremo a otro, lucen más cortos y gruesos, y la configuración en *bouquet* comienza a desarmarse (Fig. I.5). Es durante este estadio que tiene lugar la recombinación homóloga o *crossing over*, que aparece también mediada por los CSs, y que conduce al intercambio recíproco de material entre las cromátidas homólogas apareadas, como se mencionó anteriormente.

La recombinación homóloga representa una importante fuente de variabilidad genética, y por lo tanto, de biodiversidad, por las siguientes razones: a) genera el

intercambio de fragmentos génicos de origen paterno y materno; b) incorpora durante el proceso posibles errores o modificaciones; c) es cuantitativamente importante, dado que necesariamente existirá al menos un punto de recombinación (usualmente varios) por cromosoma (la ocurrencia de al menos un evento de *crossing over* por par cromosómico resulta crucial para una correcta segregación de homólogos durante la metafase I y, la no ocurrencia, de aneuploidías); d) es trascendente, dado que al producirse en los gametos, de ser éstos viables, transmitirán la modificación génica a la descendencia y, a través de ella, a la población y a la especie. De este modo, la recombinación constituye, junto a los procesos de mutación y segregación, uno de los principales sustratos de la evolución. Desde un punto de vista genético, el generar nuevas combinaciones de genes ligados y no ligados, es la principal consecuencia de la reproducción sexual (Rice y Chippindale, 2001).

La recombinación continúa hasta el siguiente estadio, el diploteno (D), durante el cual los CSs se desensamblan y los homólogos comienzan a separarse, al desaparecer las cohesinas que se encontraban uniendo a los homólogos (Buonomo *et al.*, 2000). En esta etapa los cromosomas permanecen, en general, unidos en varios puntos denominados *quiasmas*, que representarían la evidencia morfológica de los intercambios que tuvieron lugar (sitio de ruptura y reunión recíproca entre cromátidas no hermanas) (Fig. 1.7).

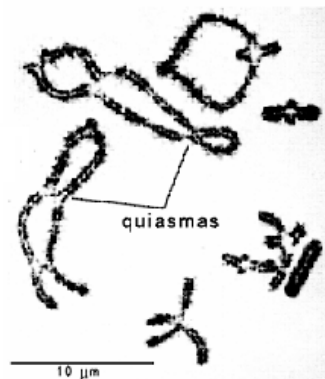


Figura 1.7 - Microfotografía mostrando cromosomas extendidos provenientes de un núcleo meiótico en estadio de diploteno, en los que se pueden apreciar los quiasmas o sitios en que tuvo lugar el intercambio recíproco de material genético entre los cromosomas homólogos (extraído de De Robertis y De Robertis, 1981).

En la última etapa, la diacinesis, los centrómeros se separan y los cromosomas se mantienen unidos únicamente por los extremos de las cromátidas.

Los procesos de alineamiento, sinapsis y recombinación que tienen lugar en los meiocitos primarios o meiocitos I (diploides, y con contenido de ADN 4C) durante la profase I, son esenciales ya que aseguran la correcta segregación cromosómica en la primera división meiótica. Su alteración suele tener consecuencias deletéreas para la meiosis pudiendo incluso ocasionar infertilidad (Hunt, 2006).

Luego de culminada la profase meiótica I tiene lugar la metafase I, marcada por la migración de los cromosomas hacia la placa ecuatorial. En la anafase I los cromosomas homólogos se segregan, dando lugar, en la telofase I, a dos células hijas denominadas meiocitos secundarios o meiocitos II (haploides, pero con contenido de ADN 2C).

Finalmente, la segunda división meiótica lleva a la separación de las cromátidas hermanas obteniéndose, como resultado, cuatro células haploides con contenido de ADN C, llamadas espermátidas redondas en el proceso de espermatogénesis (Hunt, 2006).

Durante la última fase de diferenciación, la espermiogénesis, las células haploides resultantes de las dos divisiones meióticas (espermátidas redondas, carentes de flagelo) sufren profundos cambios morfológicos y adquieren estructuras que serán funcionales en lo referente a la motilidad y la interacción con el gameto femenino. Los cambios más notables son los siguientes: a) a partir del aparato de Golgi, se genera la vesícula acrosómica; b) el acrosoma forma una caperuza sobre la superficie nuclear; c) ocurre rotación del núcleo posicionando al acrosoma hacia la membrana basal y al centríolo hacia la luz del túbulo; d) comienza a formarse el flagelo a partir del centríolo; e) el núcleo se aplana; f) el material nuclear adquiere un estado altamente condensado; g) gran parte del citoplasma es eliminado; h) las mitocondrias forman un anillo en la base del flagelo. Finalmente, los espermatozoides maduros son liberados a la luz de los túbulos seminíferos (Bergmann, 2006).

I.3. Citomorfología de principales tipos celulares de testículo

El epitelio seminífero de los testículos de ratones neonatos contiene dos tipos de células distintivas: gonocitos y células de Sertoli. Los gonocitos tienen aproximadamente 20-24 μm de diámetro, un núcleo esférico con cromatina homogénea dispersa y un nucléolo filamentososo central. El citoplasma contiene mitocondrias esféricas en relativo bajo número.

Al día 6 de nacidos, las células germinales están adjuntas a la membrana basal y se han diferenciado a espermatogonias tipo A primitivas, que comprenden el 16% de las células en el epitelio seminífero. Estas células son similares en apariencia a los gonocitos excepto que son menores en diámetro (14-15 μm) y el núcleo contiene escamas dispersas de heterocromatina. El nucleolema es prominente, ocupa una posición excéntrica en el núcleo y tiene una forma irregular (Bellvé *et al.*, 1977) (Figura I.8.A).

Como hemos mencionado, las espermatogonias son las células *stem* de la espermatogénesis. Son células diploides ($2n2C$) y su clasificación principal es en tipo A y tipo B. Al día 8 de nacidos ya se encuentran presentes ambos tipos de células. Las espermatogonias A, también denominadas células madre, representan el estrato germinal del epitelio seminífero, mientras las espermatogonias tipo B se diferencian y entran en el proceso de meiosis (Bergmann, 2006). La clasificación de los diferentes tipos de espermatogonias está principalmente basada en los patrones nucleares de la cromatina,

presentando la espermatogonia tipo A un núcleo oval eucromático, en contraste con la tipo B que tiene un núcleo heterocromatínico redondo (Figura I.8.B).

En relación al tamaño, las espermatogonias tipo A son más pequeñas que las espermatogonias primitivas tipo A, al tiempo que las espermatogonias tipo B son considerablemente menores (Bellvé *et al.*, 1977). Con respecto a las espermatogonias In, éstas presentan núcleos ovoides y delgadas placas de cromatina intensamente teñida sobre la membrana nuclear (Clermont, 1963), mayor cantidad de heterocromatina y un único nucléolo reticulado generalmente ubicado cerca del centro del núcleo (Bellvé *et al.*, 1977).

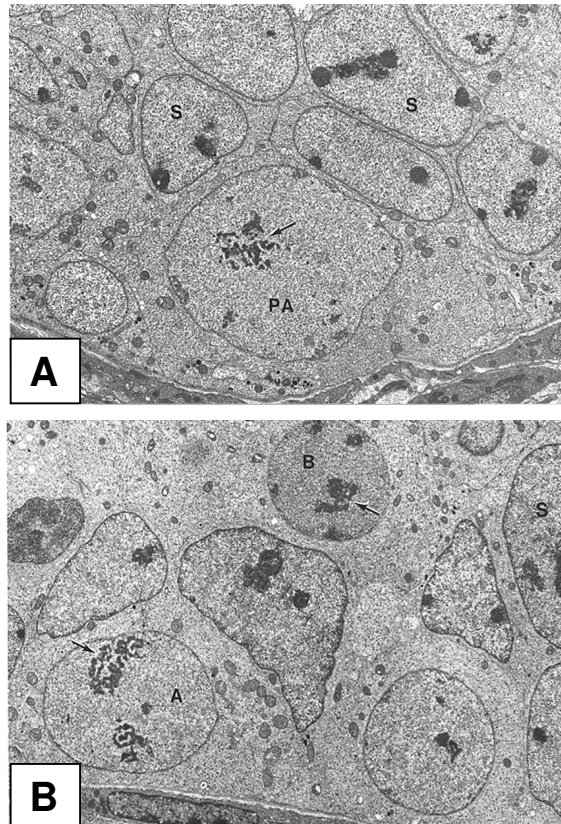


Figura I.8 – A) Micrografía electrónica de transmisión de un sector de epitelio seminífero de un ratón de 6 dpp donde pueden apreciarse varias células de Sertoli (S) y una espermatogonia tipo A primitiva (PA). La flecha señala al nucléolo de esta última. **B)** Micrografía electrónica del epitelio seminífero de un ratón de 8 dpp mostrando el aspecto de las espermatogonias tipo A (A) y tipo B (B), cuyos nucléolos están señalados con flechas. Extraído de Bellvé *et al.*, 1977.

Los espermatoцитos primarios en estadios de profase meiótica de preleptoteno y leptoteno en el ratón se encuentran presentes al día 10 de desarrollo. Los espermatoцитos preleptoténicos son las células germinales de menor diámetro con sólo 7.5-8.2 μm y están usualmente separadas de la membrana basal por procesos de las células de Sertoli (Nicander, 1967; Nicander y Plöen, 1969; Solari, 1969). Contienen una limitada cantidad de

citoplasma, núcleos esféricos pequeños con cromatina granular intensamente teñida y placas grandes de cromatina sobre la periferia nuclear (Clermont, 1963; Bellvé *et al.*, 1977).

Los espermatocitos primarios leptoténicos (L) tienen un diámetro de 8-10 μm y son similares en tamaño a las espermatogonias tipo B (Bellvé *et al.*, 1977). Poseen núcleos pequeños que se agrandan progresivamente, y su cromatina, intensamente teñida, forma filamentos delgados con engrosamiento en forma de cuentas (Clermont, 1963; Bellvé *et al.*, 1977) (Figura I.9.A).

A partir del día 12 posnatal se observan espermatocitos cigoténicos (Z) caracterizados por la aparición de segmentos cortos de complejos sinaptonémicos. Estas células son más grandes que los espermatocitos L, con un diámetro de 10-12 μm . Sus núcleos presentan filamentos delgados (cromosomas homólogos) que comienzan a aparearse formando segmentos más gruesos y bucles (Clermont, 1963; Bellvé *et al.*, 1977) (Figure I.9.B).

Los espermatocitos primarios alcanzan el estadio de paquitenio (P) en el día 14, mientras que los espermatocitos P tardíos generalmente no se observan hasta el día 18. Durante el P, el diámetro celular aumenta de 12 μm a un máximo de 18 μm . Los espermatocitos P tempranos presentan núcleos con cromosomas gruesos pero aún largos, tortuosos y muy teñidos, mientras que los núcleos de los P medios son más grandes con cromosomas más cortos y gruesos (Clermont, 1963; Bellvé *et al.*, 1977) (Figuras I.10.A).

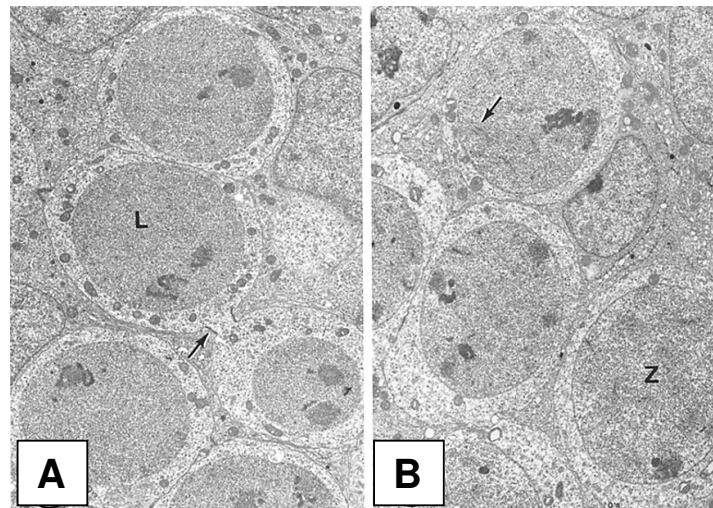


Figura I.9 - A) Micrografía electrónica de transmisión del epitelio seminífero de un ratón de 18 dpp mostrando espermatocitos leptoténicos (L). La flecha señala un puente citoplásmico conectando dos células adyacentes. **B)** Espermatocitos cigoténicos (Z) registrados al MET. La flecha señala un pequeño segmento de CS. Extraído de Bellvé *et al.*, 1977.

Los espermatoцитos secundarios y espermátidas redondas aparecen en número aumentado al día 20 (Bellvé *et al.*, 1977). Los espermatoцитos secundarios tienen un diámetro de 14 μm y la mitad del volumen de los espermatoцитos primarios y se encuentran más cerca de la luz. Son de carácter haploide (1n) pero con de contenido de ADN 2C. Rara vez se observan en cortes de túbulos seminíferos, pues su vida es corta; rápidamente entran en una nueva etapa de división celular (meiosis II) de citocinesis también incompleta, para dar como resultado a dos espermátidas redondas haploides y con un solo juego de cromosomas (1n1C) (Bergmann, 2006).

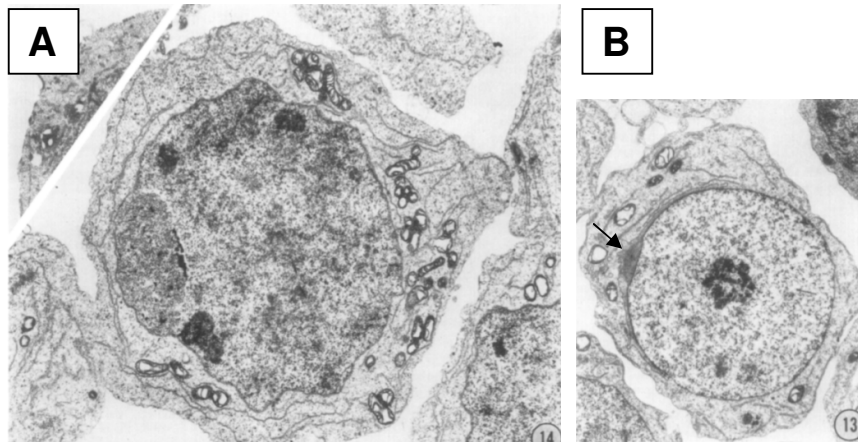


Figura 1.10 – A) Micrografía electrónica de un espermatoцитo en *P.* Puede apreciarse su cromatina condensada en parches, la presencia de CS y el cuerpo XY. **B)** Aspecto de una espermátida redonda al MET, con su característico nucleolo central. Puede observarse, asimismo, la vesícula acrosómica bien desarrollada (flecha). Extraído de Romrell *et al.*, 1976.

Las espermátidas redondas rondan los 10 μm de diámetro y se disponen en conglomerados cerca de la luz del túbulo seminífero. Sus núcleos exhiben patrón de cromatina homogénea y pueden ser identificadas por la vesícula acrosómica. Estas células presentan retículo endoplasmático rugoso abundante, numerosas mitocondrias y complejo de Golgi bien desarrollado. Durante la fase de elongación, acumulan enzimas hidrolíticas, ordenan los organelos y los reducen en número, forman el flagelo y un citoesqueleto asociado, con reducción de citoplasma. Este proceso de transformación comprende cuatro fases: fase de Golgi, fase de capucha o cubierta, fase acrosómica y fase de maduración. La característica principal de este proceso se relaciona con la formación del acrosoma desde el complejo de Golgi, condensación y elongación del núcleo, formación de un flagelo movable, y un desprendimiento extensivo de citoplasma (Bergmann, 2006).

Los espermatozoides son la fase madura del gameto masculino, y presentan una morfología sumamente peculiar. Poseen tres partes principales: una cabeza con escaso citoplasma que aloja al núcleo; un cuello con numerosas mitocondrias; y un flagelo a modo

de cola que le permite desplazarse. Su núcleo presenta un muy alto grado de compactación de la cromatina, dado por la sustitución de las histonas por unas proteínas exclusivas de espermatozoide que son, en primer lugar las proteínas de transición, y luego las protaminas. Estas últimas son proteínas básicas con alto contenido en arginina, que producen un estado de compactación muy superior al de los nucleosomas (Fawcett, 1975a).

Las células de Sertoli se extienden desde la membrana basal hasta la luz del conducto. Son células altas, delgadas y ramificadas. Tienen un núcleo con cromatina altamente eucromática y un nucléolo central acompañado de dos cromocentros (Figura 1.8.A). En la mayoría de las especies incluidos los roedores el núcleo se encuentra en la parte basal de la célula (Fawcett, 1975b), presenta diferentes formas de acuerdo al grado del desarrollo que presente el epitelio seminífero y va cambiando su apariencia durante la maduración del testículo (Hess *et al.*, 2005). A menudo se observan invaginaciones profundas de la membrana nuclear delimitadas por filamentos intermedios de vimentina (França *et al.*, 2017). El citoplasma de las células de Sertoli es abundante en mitocondrias, lo cual indica el alto grado de actividad metabólica que posee la célula.

Las células de Leydig son poliédricas o irregulares, y se disponen en cordones o racimos en los espacios intertubulares. Su número es variable según las especies. Cinco tipos principales de células de Leydig, diferenciables por sus características morfológicas, se encuentran presentes en el linaje de las células de Leydig, (Chamindrani *et al.*, 2001). A grandes rasgos, en los testículos inmaduros aparecen en mayor número y presentan un citoplasma acidófilo sin apenas liposomas y con un núcleo central. En los testículos maduros presentan las características típicas de células productoras de esteroides, caracterizadas por tener un núcleo central vesiculoso y un citoplasma acidófilo y vacuolizado debido a la presencia de numerosos liposomas. Presentan también numerosas mitocondrias. La madurez funcional de estas células se adquiere en presencia de enzimas esteroideogénicas como la 3β HSD, localizada en el retículo endoplasmático liso (Chemes, 1996).

1.4. Dificultades y estrategias clásicas para el estudio de la espermatogénesis

La heterogeneidad celular del testículo representa la principal dificultad para el estudio a nivel molecular de la espermatogénesis. Se han empleado diferentes abordajes metodológicos para sortear esta dificultad.

La estrategia más básica de todas ha sido empleo de testículos enteros de individuos juveniles de diferentes edades, con primera onda espermatogénica incompleta, naturalmente enriquecidos en ciertos estadios (Almstrup *et al.*, 2004; Maratou *et al.*, 2004). El grado de avance de la espermatogénesis dependerá del momento de desarrollo posnatal

elegido para la obtención de la muestra. La comparación de muestras colectadas en diversos momentos del desarrollo posnatal, permite realizar hipótesis atribuyendo las diferencias observadas a los tipos celulares presentes/ausentes en cada caso, lo cual en un sistema tan complejo no siempre se condice con la realidad. Si bien este abordaje ha permitido la obtención de una considerable cantidad de información sobre los patrones de expresión diferencial durante la primera onda espermatogénica (Villardell *et al.*, 1989; Thomas *et al.*, 1989; Almstrup *et al.*, 2004; Maratou *et al.*, 2004; Shima *et al.*, 2004; Iguchi *et al.*, 2006), la distinción inequívoca de los tipos celulares responsables de los cambios observados en la expresión génica requiere de otros ensayos (por ejemplo, hibridación *in situ* e inmunocitoquímica). Uno de los problemas de asignar los cambios de expresión a los tipos celulares que van apareciendo a medida que progresa la primera onda espermatogénica, es que los cambios producidos en el “ambiente” del túbulo seminífero precisamente a causa de la aparición de esos nuevos tipos celulares, muchas veces ocasionan cambios de expresión de genes en los tipos celulares preexistentes (recordemos la estrecha relación que existe entre los distintos tipos celulares), por lo cual esa solución simplista puede no necesariamente reflejar la realidad. Un problema adicional es que al emplearse testículos enteros para los estudios, cambios de expresión génica en tipos celulares muy poco representados pueden pasar desapercibidos al ser “enmascarados” por la expresión génica en los tipos celulares más abundantes.

Otra estrategia clásicamente empleada ha sido la obtención de poblaciones celulares enriquecidas en ciertos estadios espermatogénicos mediante técnicas de separación celular basadas en diferencias de tamaño y densidad: Staput (Lam *et al.*, 1970, Romrell *et al.*, 1976) y elutriación (Meistrich, 1977). La técnica de Staput se basa en la decantación gravimétrica de células en un gradiente de albúmina: las células son cargadas en una cámara de separación, luego se les deja decantar sobre el gradiente durante un período mínimo de 2,5 hs, y se procede a la colecta de fracciones lográndose la separación de ciertos tipos celulares, principalmente en base a sus diferentes tamaños. En la elutriación se emplea un rotor de centrifuga con cámara única lateral (elutriador), en el interior del cual se establece un gradiente de flujos. Se ha determinado que permite la separación de meiocitos P y espermátidas redondas con una pureza que ronda el 80% en el mejor de los casos (Meistrich, 1977). Si bien la obtención de fracciones enriquecidas en otros estadios celulares es posible, el grado de pureza logrado es mucho menor (Romrell *et al.*, 1976).

En los últimos años, merced a los trabajos de nuestro grupo y otros, estos métodos de enriquecimiento celular en etapas específicas de la espermatogénesis han comenzado a ser sustituidos por la purificación por citometría de flujo (CMF), como se explicará más adelante.

La gran mayoría de las técnicas de separación celular requieren que el material esté en suspensión en un medio líquido. En consecuencia, en la búsqueda de obtener poblaciones celulares más homogéneas a partir de material complejo como el testículo, un primer paso es la preparación de suspensiones celulares a través de la disgregación del tejido, destruyendo las asociaciones celulares entre células vecinas. Es deseable contar con muestras disgregadas representativas del tejido original, evitando el daño selectivo de tipos celulares específicos (algunos tipos celulares son más sensibles que otros), maximizando el número de células viables, y evitando la formación de cúmulos celulares.

En el caso del material procedente de testículo, es además fundamental lograr minimizar la presencia de multinucleados (Meistrich, 1977). Los multinucleados son una dificultad adicional para el estudio de la espermatogénesis, ya que tienden a formarse debido a la naturaleza sincitial del epitelio seminífero. Están formados mayormente por espermátidas redondas coalescentes que han sido descritas como la mayor contaminación de la población de espermatoцитos en paquitenio (Meistrich, 1977; Grogan *et al.*, 1981). Los protocolos de preparación celular testicular implican o bien disociación exclusivamente mecánica (Lam *et al.*, 1970), o la combinación de métodos mecánicos con tratamientos enzimáticos usando tripsina, Dnasa (Meistrich *et al.*, 1973) y colagenasa (Romrell *et al.*, 1976).

La obtención de células cursando ciertos estadios espermatogénicos en estado puro o al menos altamente enriquecido es aún más difícil, ya que existen estadios más fuertemente representados que otros en el epitelio seminífero. Por ejemplo, dentro de los espermatoцитos primarios, los P son los más representados debido a la extensa duración de esta etapa. Sin embargo, los espermatoцитos L y Z se encuentran pobremente representados por tratarse de etapas muy breves.

Una dificultad adicional para el estudio de la espermatogénesis ha sido el no disponer aún de un sistema eficiente y permanente de cultivo *in vitro* de las células espermatogénicas. La espermatogénesis *in vitro* podría proveer detalles de la diferenciación celular bajo condiciones experimentales controladas. Se han volcado grandes esfuerzos en busca de este fin, se han logrado algunos avances y se continúa trabajando en ello. Por ejemplo, Sato y colaboradores lograron generar espermatozoides morfológicamente maduros a partir de células testiculares provenientes de ratones inmaduros, empleando sistemas de cultivo tridimensionales (Sato *et al.*, 2011). A pesar de este avance, no lograron que el sistema fuera efectivo. El desarrollo de un sistema *in vitro* efectivo se presenta como extremadamente complejo, ya que debería asegurar la sobrevivencia de una mezcla de células somáticas y células germinales en una disposición espacial óptima, proveer señales endócrinas y parácrinas y permitir el mantenimiento del potencial *stem* al autorenovarse y diferenciarse en las condiciones *in vitro* (Reuter *et al.*, 2012).

Una alternativa no *in vitro* relacionada con la maduración de células germinales por fuera del donante, pero dentro de un organismo, es el trasplante de una línea germinal en el animal receptor por *xenografting* o trasplante de las células germinales. El *xenografting* de fragmentos de testículos ha permitido la generación de espermatozoides de varias especies (Schlatt *et al.*, 2011). Otra opción para generar tejidos testiculares funcionales es el xeno-trasplante de cordones seminíferos reconstruidos *in vitro*. En un experimento desarrollado por Honaramooz *et al.*, 2007, células testiculares aisladas de testículos de cerdos fueron centrifugadas y los pellets obtenidos fueron injertados en ratones desnudos huéspedes donde se formaron tejidos testiculares funcionales luego de unos pocos meses. Se lograron similares resultados en roedores (Gassei *et al.*, 2007).

Algunas estrategias adicionales han sido ocasionalmente empleadas para la purificación de poblaciones celulares específicas de testículo, como es el caso de la separación celular activada magnéticamente (Van der Wee *et al.*, 2001; Ryu *et al.*, 2005; Zhou *et al.*, 2008). Sin embargo, requiere el uso de anticuerpos específicos no siempre disponibles.

1.5. La citometría de flujo para la clasificación celular basada en contenido de ADN

En 1969, Van Dilla y colaboradores demostraron que las diferencias en el contenido de ADN pueden ser utilizadas, a través de la CMF, como parámetro de distinción de diferentes poblaciones celulares dentro de una suspensión celular heterogénea (Van Dilla *et al.*, 1969). Estos autores observaron la relación existente entre el contenido de ADN e intensidad de fluorescencia en la cuantificación de ADN, y generaron histogramas para visualizar las diferentes fases del ciclo celular (G1, S y G2). La exposición celular a fluorocromos de unión estequiométrica al ADN y análisis por CMF permiten, de este modo, la discriminación de poblaciones celulares según las diferentes intensidades de fluorescencia que emiten de acuerdo a su ploidia y contenido de ADN. Tales poblaciones celulares podrán eventualmente también ser clasificadas, si se dispone de un citómetro de flujo con esta función (*sorter*).

El fluorocromo que más habitualmente se utiliza para los estudios de contenido de ADN es el yoduro de propidio (IP), que se excita en el rango del azul y verde, y su emisión máxima es a 620 nm (rojo). El láser azul (488 nm) es el más común, ya que es el que viene por defecto en prácticamente todos los citómetros de flujo. Dado que el IP no es un colorante vital, únicamente teñirá células muertas o con su pared dañada, por lo cual no es adecuado si el objetivo es clasificar células vivas.

El fluoróforo que se ha venido utilizando más frecuentemente para la identificación de células vivas en CMF es el Hoechst (bisbenzimidazol) 33342, un intercalante que se incorpora entre los pares A-T del ADN. Es excitable a bajas longitudes de onda, en el rango del

ultravioleta y violeta. Si bien el 33342 es un colorante vital y por ende tiñe tanto las células muertas como las vivas, presenta algunas desventajas. En primer lugar, no todos los citómetros de flujo disponen de un láser UV. En segundo lugar, precisamente por excitarse en el UV este colorante produce daños en el material genético, lo que no lo hace apropiado para clasificar células para usos posteriores que requieran integridad de ácidos nucleicos (por ejemplo, estudios de transcriptómica). Dada su acción mutagénica y citotoxicidad, tampoco es un fluorocromo idóneo para aplicaciones en las cuales el material quiera ser empleado en estudios con futuros objetivos de aplicación a la clínica, como el cultivo de espermatogonias para trasplante, o el sexado de espermatozoides.

1.6. La espermatogénesis vista a través de la citometría de flujo

Como se mencionó anteriormente, en los testículos de mamíferos adultos coexisten diversos tipos celulares, con diferente contenido de ADN:

- células **C** (espermátidas redondas y en diversas etapas de elongación, espermatozoides maduros);
- células **2C** (espermatogonias de diversos tipos cursando fase G1 de mitosis, espermatocitos secundarios, diversas células somáticas);
- células **4C** (diferentes estadios de espermatocitos primarios, espermatogonias en fase G2 de mitosis).

Sobre suspensiones celulares de testículo, la CMF también ha permitido la discriminación de diferentes poblaciones celulares, en base a sus diferentes contenidos de ADN (revisión por Geisinger y Rodríguez-Casuriaga, 2010). El análisis por CMF de suspensiones celulares testiculares de especímenes adultos ha revelado cuatro grandes niveles de fluorescencia, de acuerdo a su ploidía y nivel de incorporación del fluorocromo (Meistrich *et al.*, 1978; Janca *et al.*, 1986; Malkov *et al.*, 1998; Aslam *et al.*, 2002; Wistuba *et al.*, 2003). En consecuencia, los histogramas resultantes del análisis de estas suspensiones de testículo provenientes de adultos presentan cuatro picos principales, que de izquierda a derecha son: un primer pico aparentemente sub-haploide, y tres picos correspondientes a las poblaciones celulares con contenido de ADN C, 2C y 4C (Fig. I.11). Mientras que la población celular que presenta fluorescencia correspondiente al contenido C contiene espermátidas redondas y en elongación, el pico aparentemente sub-haploide representa espermátidas ya elongadas y espermios maduros. El menor nivel de tinción de estas células ha sido atribuido a los cambios químicos y morfológicos que ocurren durante la maduración espermática y la transición del empaquetamiento del ADN con histonas al empaquetamiento con protaminas, que ocasiona un nivel de compactación mucho mayor de la cromatina.

Como resultado de este fenómeno, se reduce el número de sitios en el ADN disponibles para la unión de fluorocromos (Spanò y Evenson, 1993).

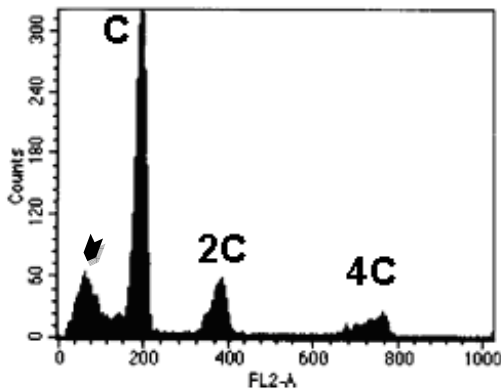


Figura I.11.- Histograma resultante del análisis de una suspensión celular de testículo de ratón adulto, representando el número de células en cada nivel de fluorescencia. El pico más alto corresponde a células con contenido de ADN=C, y el que aparece a su izquierda, de contenido aparentemente sub-haploide (señalado con una punta de flecha), corresponde a células también haploides (espermátidas elongadas y espermios maduros), pero que muestran una menor intensidad de fluorescencia, dada la elevada compactación de su cromatina (extraído de Malkov *et al.*, 1998).

La combinación de dos o más parámetros ha permitido una discriminación más fina entre diferentes tipos celulares que poseen igual cantidad de ADN. Por ejemplo, combinando la información sobre el contenido de ADN con la magnitud de la dispersión frontal de la luz (que provee información sobre los tamaños relativos), se han logrado separar poblaciones celulares testiculares con alto grado de pureza (Grogan *et al.*, 1981). Posteriormente, se describió la aplicación de la CMF basada en cuatro parámetros citométricos diferentes, para la caracterización y separación de poblaciones celulares específicas de testículo (Malkov *et al.*, 1998). Los parámetros utilizados en este caso fueron: dispersión frontal que representa el tamaño celular (*forward scatter*, FSC-H); dispersión lateral que refleja granularidad o complejidad interna-externa de la célula (*side scatter*, SSC-H); fluorescencia total emitida (área de pulso, FL-A), indicativo del contenido total de ADN de cada célula; y fluorescencia ancho de pulso (FL-W), representativo del tamaño nuclear). Este análisis multiparamétrico se basa en que, como hemos visto más arriba, además de las diferencias en contenido de ADN mencionadas, los diferentes estadios de maduración de las células germinales masculinas (desde espermatogonias hasta espermios) presentan grandes variaciones en la estructura de su cromatina (nivel de compactación, distribución espacial) así como también en su tamaño y forma nuclear, por lo cual la consideración de un mayor número de parámetros podría ayudar a la discriminación de un mayor número de poblaciones celulares y las haría pasibles de purificación en flujo.

La CMF ha sido utilizada para estudiar el desarrollo testicular posnatal y la composición celular testicular de varias especies de mamíferos, entre ellas ratón (Meistrich *et al.*, 1978; Janca *et al.*, 1986; Petit *et al.*, 1995), rata (Clausen *et al.*, 1982; Van Kroonenburgh *et al.*, 1985; Suter *et al.*, 1997; Malkov *et al.*, 1998), hámster (Vigodner *et al.*, 2003, 2004), cerdo (Oskam *et al.*, 2008), gato (Neubauer *et al.*, 2004), cobayo (Rodríguez-Casuriaga *et al.*, 2011) y varios primates (Aravindan *et al.*, 1990; Aslam *et al.*, 2002; Wistuba

et al., 2003), incluyendo el hombre (Blanchard *et al.*, 1991; Hittmair *et al.*, 1992). En la figura I.12 se muestra un ejemplo de visualización del avance espermatogénico mediante CMF.

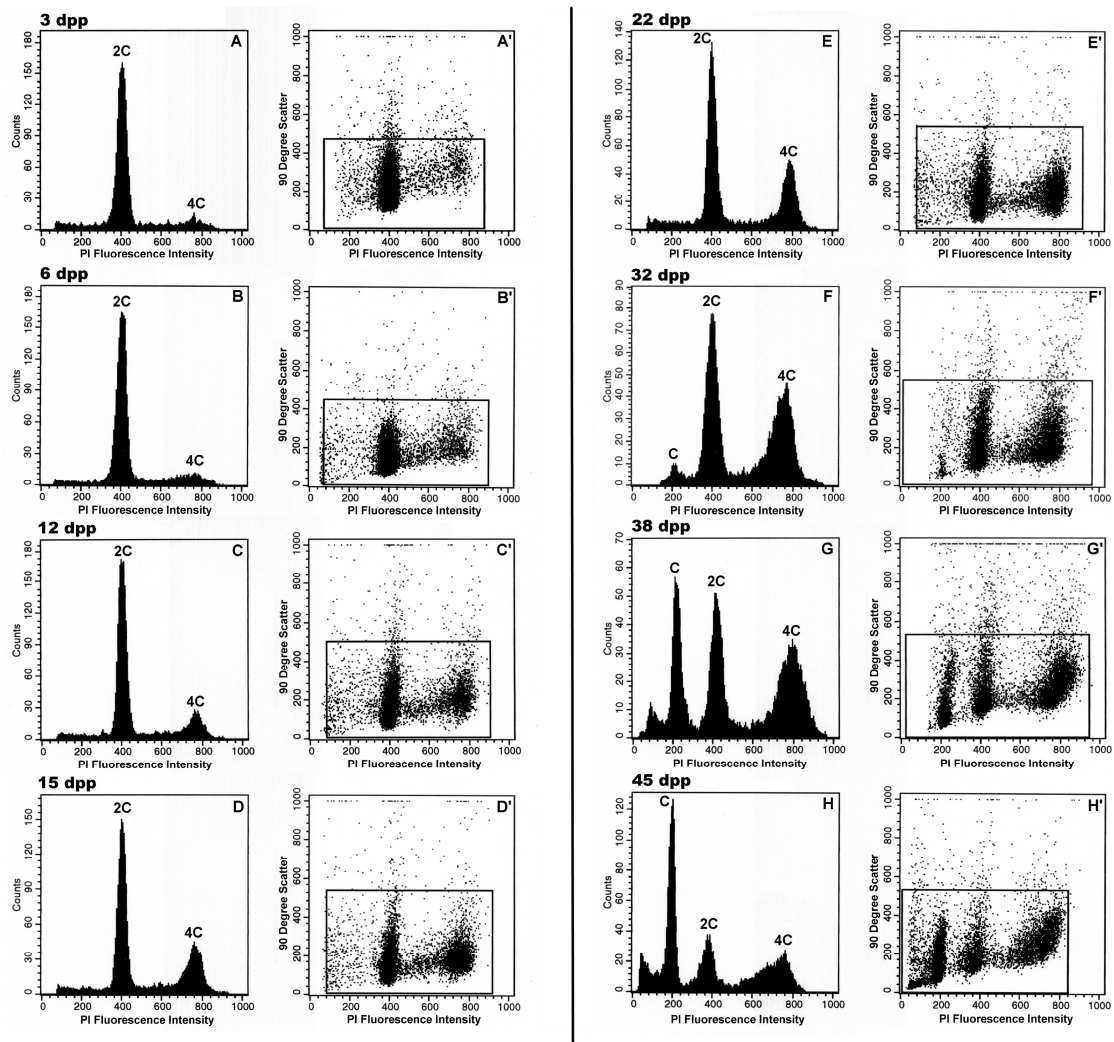


Figura I.12 - Avance de la espermatogénesis durante el desarrollo postnatal del testículo de cobayo seguido por CMF. Las adquisiciones mostradas fueron realizadas luego de la tinción con yoduro de propidio (IP). Las edades de los especímenes están expresadas en días posparto (dpp). **A-H**, histogramas de intensidad de fluorescencia de IP. **A'-H'**, dot plots mostrando dispersión lateral (SSC-H o 90° scatter) vs intensidad de fluorescencia de IP, en los que cada punto corresponde a un evento. El progreso de la espermatogénesis puede visualizarse a través de las variaciones en las poblaciones C, 2C y 4C en los especímenes en maduración. Obsérvese el aumento en la proporción de células 4C a medida que avanza la meiosis (6 a 32 dpp). Del mismo modo, el inicio de la espermiogénesis a los 32 días luego del nacimiento queda marcado por la aparición de las primeras células C. (**F**, **F'**). Extraído de Rodríguez-Casuriaga *et al.*, 2011.

Los análisis mediante CMF han sido extensamente utilizados en temas vinculados a la biología reproductiva, tanto en humanos como en animales. Los efectos toxicológicos de

agentes químicos, físicos y ambientales sobre la reproducción masculina han sido evaluados a lo largo de la espermatogénesis (modificaciones en las cantidades relativas de diferentes tipos celulares, alteraciones en los histogramas) (Jagetia *et al.*, 1996; 1997; Jyothi *et al.*, 2001; Yoon *et al.*, 2003; Ojha *et al.*, 2008), así como en ensayos sobre la integridad de la cromatina y calidad del semen (De Iuliis *et al.*, 2009). La utilidad de la CMF en el diagnóstico de la infertilidad masculina en humanos (Clausen y Abyholm, 1980; Hittmair *et al.*, 1994; Kostakopoulos *et al.*, 1997), y en la capacidad fecundante de animales (Druart *et al.*, 2009) ha sido claramente puesta en evidencia, y existen varias revisiones en el tema (Garrido *et al.*, 2002; Cordelli *et al.*, 2005; Marchesi *et al.*, 2007, Evenson *et al.*, 2007). Además, se ha logrado discriminar y separar espermatozoides conteniendo un cromosoma X de aquellos que poseen un cromosoma Y en base a pequeñas diferencias en el contenido de ADN. Esta técnica es actualmente de uso habitual en ciencias veterinarias para el control del sexo de la progenie (revisión por Garner, 2006; Hamano, 2007; Vazquez *et al.*, 2008; Rath y Johnson, 2008; Sharpe y Evans, 2009).

La CMF también ha sido utilizada en una gran variedad de abordajes experimentales, como la caracterización y purificación de poblaciones de espermatogonias pluripotenciales (células madre o *stem cells*) (Shinohara *et al.*, 2000; Hermann *et al.*, 2009) para su cultivo *in vitro* (Ryu *et al.*, 2005) o con fines de trasplante (Falciatori *et al.*, 2004; Lassalle *et al.*, 2004; Fujita *et al.*, 2005, 2006), el estudio del avance de la espermatogénesis y la diferenciación celular en intentos de desarrollo de sistemas de cultivo *in vitro* de células de línea germinal masculina (Weiss *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 2011), el monitoreo de la proliferación de células germinales en ratones transgénicos (Jeyaraj *et al.*, 2002), y el estudio de la apoptosis celular a nivel del epitelio seminífero (Blottner *et al.*, 2007; Martínez-Pastor *et al.*, 2008; Zhou *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2009).

Sin embargo, salvo algunos ejemplos aislados (Tanaka *et al.*, 2002; Fallahi *et al.*, 2010), la CMF no ha sido utilizada como un método estándar para obtener poblaciones celulares espermatogénicas específicas, para su posterior empleo en estudios de expresión génica. Este es uno de los grandes intereses del equipo de investigación en Biología Molecular de la Reproducción del IIBCE, como se describe en la siguiente sección. Es importante señalar que la capacidad de clasificar poblaciones específicas de células de testículo en base a contenido de ADN, y prescindiendo del uso de anticuerpos, es importante por varias razones. Por un lado, es un procedimiento más rápido (menos pasos) y económico. Además, las células salen del *sorter* prontas para usar, y no unidas a un anticuerpo, lo que dificultaría abordajes posteriores. Más aún, no se han descrito anticuerpos de superficie que sean realmente específicos para la mayor parte de los tipos celulares del testículo.

1.7. Antecedentes del grupo de trabajo

Una de las principales líneas de investigación del grupo de Biología Molecular de la Reproducción del IIBCE consiste en estudiar la expresión génica diferencial durante la espermatogénesis de los mamíferos empleando modelos roedores. La sensibilidad de los estudios moleculares ha ido en incremento y contamos hoy día con técnicas sumamente sensibles, que requieren elevada calidad y pureza del material de partida. En relación al testículo, es necesario salir de la heterogeneidad inicial de la muestra y lograr poblaciones celulares lo más homogéneas posibles correspondientes a diferentes fases del proceso de espermatogénesis.

Las técnicas de separación celular permiten estudiar qué transcritos están presentes en un determinado tipo celular. Como se ha mencionado, los métodos clásicos de preparación de suspensiones celulares de testículo y posterior separación de estadios mediante elutriación o Staput, sólo permiten un enriquecimiento relativo, y únicamente en algunos tipos celulares que son los más fáciles de separar, por abundancia relativa y diferencias de tamaño. Además, son procedimientos extensos y laboriosos. En consecuencia, pueden terminar afectando los niveles de expresión génica durante el largo proceso de purificación. Además, debe considerarse que la duración del proceso es especialmente crítica para la representación de algunos RNAs y proteínas con períodos de vida cortos (Geisinger, 2008). Por lo tanto, cuando el objetivo es el estudio de la expresión génica, deben minimizarse la duración del proceso y la manipulación implicada de manera de prevenir la degradación o pérdida de macromoléculas de interés, y cambios con respecto a la situación *in vivo*.

Desde hace varios años el grupo de Biología de la Reproducción del IIBCE, en colaboración con el Servicio de Citometría de Flujo y Clasificación Celular del mismo instituto, ha incorporado la CMF para purificar células en distintas etapas de la espermatogénesis de roedores para su posterior empleo en estudios moleculares. Entre los aportes realizados, se destacan: a) el desarrollo y optimización de métodos de preparación de suspensiones celulares de testículo que mantienen una buena integridad celular y proporciones celulares testiculares para su posterior análisis por CMF (Rodríguez-Casuriaga *et al.*, 2009, 2013); b) la distinción y purificación mediante CMF de estadios tempranos de la profase meiótica (L/Z) separadamente de los medios/avanzados (P/D) en el cobayo, modelo biológico con un inusualmente elevado contenido de L/Z (Rodríguez-Casuriaga *et al.*, 2011). Este desarrollo se llevó a cabo mediante la utilización del fluorocromo yoduro de propidio (IP).

Este último desarrollo logrado en el cobayo, no pudo ser reproducido en el ratón, modelo mamífero por excelencia, a pesar de los intentos realizados. Sin embargo, era de

gran interés del grupo poder obtener una población de elevada pureza representativa de estos estadios meióticos tempranos en el ratón (pobremente conocidos a nivel molecular), y empleando, además, fluorocromos vitales de unión al ADN para asegurar una buena calidad del material clasificado. La obtención de este material permitiría al grupo acceder a estudios de transcriptómica incluyendo estas etapas tempranas, de altísimo interés por tratarse del momento de la profase meiótica en que los cromosomas homólogos se reconocen, se alinean, y comienzan a sinapsarse (formación de CS). Es además sabido que la alteración de estos procesos producirá errores de apareamiento y segregación, que se encuentran en muchos casos en la base de patologías como la infertilidad y el cáncer testicular (Hann *et al.*, 2011; Tvrda *et al.*, 2015). Dado que el equipo disponible en el IIBCE sólo contaba con una línea de excitación 488, el fluorocromo debía además ser excitable a esta longitud de onda. En este sentido, debe mencionarse que otros grupos de investigación (Gaysinskaya *et al.*, 2014) han realizado aportes en relación a la discriminación de subpoblaciones meióticas empleando el fluorocromo vital de unión al ADN *Hoechst 33342*. Sin embargo, debe recordarse que este fluorocromo es excitable en el rango no visible (laser *uv*), y los niveles de pureza que obtuvieron los autores fueron moderados (por ejemplo, 60-80% enriquecimiento en L).

Paralelamente, también era de interés del grupo comenzar a descifrar la ubicación de los diferentes tipos celulares dentro de la población con contenido de ADN 2C, con el objetivo de poder desarrollar ulteriores estudios de expresión génica.

Esta tesis de maestría surge como consecuencia de estas inquietudes. Durante la misma se analizó el potencial del fluorocromo *Vybrant DyeCycle Green* (VDG) para la clasificación de las distintas poblaciones celulares de testículo, y presentamos los resultados obtenidos en este sentido.

La **hipótesis de trabajo** manejada fue la siguiente:

Es posible lograr una buena discriminación de diversas poblaciones celulares de testículo y su purificación por CMF, mediante la optimización de protocolos y el empleo de un fluorocromo vital de última generación.

II. OBJETIVOS

II.1. Objetivo general

Contribuir al desarrollo de métodos que permitan la purificación de los distintos tipos celulares del testículo de ratón (el modelo mamífero por excelencia), que sienten las bases para la realización de estudios moleculares sobre la espermatogénesis de los mamíferos.

II.2. Objetivos específicos

- Optimizar el protocolo de tinción con VDG para suspensiones celulares de testículo de ratones juveniles y adultos.
- Analizar el establecimiento de la primera onda espermatogénica mediante CMF utilizando VDG y determinar las proporciones relativas de los distintos tipos celulares para las diferentes edades analizadas, de modo de establecer las edades óptimas para la purificación de cada tipo celular.
- Purificar poblaciones celulares testiculares distinguibles en los perfiles citométricos obtenidos, establecer sus identidades y confirmarlas.
- Comparar los resultados obtenidos con reportes previos sobre este material biológico utilizando otros fluorocromos, en cuanto a sus capacidades de distinción (en los perfiles citométricos) y purificación en flujo de diferentes poblaciones celulares del testículo.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

III.1. Animales

Para las preparaciones de las suspensiones celulares testiculares se usaron ratones (*Mus musculus*) machos *CD-1 Swiss* de edades de 10 a 29 dpp provenientes del bioterio del IIBCE. Se usaron 4-5 especímenes de cada edad. Los animales fueron sacrificados siguiendo las recomendaciones de los comités especializados (en Uruguay Comisión Nacional de Experimentación Animal [CNEA]; protocolo experimental 001/02/2012).

III.2. Preparación de las suspensiones celulares de testículo

III.2.a. Preparación de suspensiones celulares con método exclusivamente mecánico

Se disecaron y decapsularon los testículos y se colocaron en hielo, en una caja de Petri de vidrio de 60mm de diámetro conteniendo medio de separación (MS) frío (D-MEM) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB). La túnica albugínea fue removida y se cortaron los testículos decapsulados en trozos de 2-3 mm de lado cada uno.

Se colocaron 4-5 de estos trozos, junto con 1 ml de medio de separación frío, en un disgregador mecánico descartable "Medicon" [Becton Dickinson (BD), San José, CA, USA] provisto de una malla metálica con orificios de 50 μm ("separator mesh") y un molinillo metálico. Posteriormente, se procesó el material en el "Medimachine System" (BD) durante 30 seg.

La suspensión celular resultante de la disgregación se recuperó usando una jeringa plástica de 3-5 mL sin aguja. Se realizó filtración a través de una malla de nylon de 50 μm de poro previamente humedecida con 0,5 mL de D-MEM suplementado. Para prevenir cúmulos celulares, se agregó NDA (ácido Naftol Disulfónico: 2-naphthol-6,8-disulfonic acid, sal dipotásica) a concentración final 0,2%. Posteriormente, se repitió la filtración por malla de 50 μm y se colocó en hielo.

Los conteos en cámara de Neubauer permitieron también determinar la concentración de células en la suspensión y ajustarla a $1 \times 10^6/\text{ml}$ previo a la exposición al fluorocromo.

La cantidad de multinucleados eventualmente generados durante el procesamiento del tejido se determinó mediante conteos al microscopio óptico con un $n \geq 300$.

III.2.b. Preparación de suspensiones celulares con método combinado

Alternativamente al método descrito en el punto anterior, se prepararon suspensiones celulares de testículo mediante un método combinado enzimático-mecánico, según el siguiente detalle:

Luego de remover la túnica albugínea, cada testículo entero fue colocado en un tubo eppendorf conteniendo 0,5 mL de PBS conteniendo colagenasa 0,6 U/mL y CaCl_2 5mM. Se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente (TA), mezclando cada 3-4 minutos por inversión del tubo y vortex breve. Para detener la acción enzimática se agregó el quelante de calcio EGTA a concentración final 10 mM. Posteriormente, se colocó en un Medicon el material testicular tratado y el contenido total del eppendorf junto a 0,5 mL de D-MEM frío suplementado, y se continuó con la disgregación mecánica y filtrados según descrito en III.2.a.

III.3. Análisis y separación por citometría de flujo

III.3.a. Exposición de suspensiones celulares a *Vybrant DyeCycle Green*

Una vez preparadas las suspensiones celulares y ajustada su concentración a 1×10^6 /ml, se procedió a teñirlas con el fluorocromo vital de unión al ADN *Vybrant DyeCycle Green* (VDG, Invitrogen). Se empleó una concentración final de VDG de 10 mM (2 μ l de fluorocromo/ml de suspensión celular). Los tubos muestra se llevaron luego a estufa de incubación durante 1 hora a 35°C, con agitación moderada (80 rpm), en posición horizontal y protegido de la luz.

III.3.b. Análisis citométrico en flujo

Las suspensiones celulares de testículo fueron analizadas con un citómetro de flujo y clasificador celular FACSVantage (BD) equipado con un láser de argón con emisión a 488 nm (Coherent, Innova 304) y un sistema de enfriamiento por circulación de agua. La intensidad del láser fue fijada en 100 mW y la fluorescencia emitida por el VDG colectada en FL1 utilizando un filtro de banda de 530/30. Se seleccionó una boquilla de 70 μ m para realizar las medidas citométricas en flujo [este tamaño de boquilla es apropiado para permitir el pasaje de los meiocitos I, de gran tamaño (Mays-Hoopers *et al.*, 1995)]. Se utilizaron partículas DNA QC (BD) para optimizar la detección de fluorescencia, chequear la linealidad del equipo y permitir la discriminación de dobletes. Se empleó el programa CELLQuest (BD)

para el análisis de los siguientes parámetros: dispersión frontal o *forward scatter* (FSC-H), dispersión lateral o *side scatter* (SSC-H), área total del pulso o intensidad total de fluorescencia (FL1-A), y ancho del pulso o duración de la emisión para cada evento (FL1-W). Todos los parámetros fueron operados en escala lineal y se emplearon los mismos *settings* para cada experimento (con leves ajustes en detección de FL1). El *threshold* fue establecido en el parámetro de dispersión frontal (*forward scatter*) al menor nivel posible. Los dobletes se excluyeron del análisis usando *dot plots* con FL1-A vs FL1-W. Todos los estudios con FACSVantage se llevaron a cabo utilizando el equipo ubicado en el Servicio de Citometría de Flujo y Clasificación Celular (SECIF) del IIBCE, manejado por el técnico especializado de la plataforma.

III.3.c. Clasificación en flujo de poblaciones de interés

Al igual que los análisis por CMF, todas las clasificaciones celulares fueron realizadas en el equipo FACSVantage (BD) del SECIF. Las regiones de *sorting* fueron determinadas en los *dot plots* FL1A/SSC-H. Las células fueron clasificadas a una velocidad de aproximadamente 1500 eventos/seg. Las poblaciones fueron clasificadas utilizando *gates* combinados para exclusión de restos celulares y dobletes en gráficos de FL1-A vs SSC-H. Se seleccionaron fracciones de 2C con SSC-H alto y bajo, según se muestra en los perfiles de sección Resultados.

Para fines analíticos (microscopía, inmunocitoquímica), las células fueron directamente depositadas sobre diversos soportes sólidos (placas de Petri o cubreobjetos) empleando el programa *CloneCyt* (BD). En el caso de las cajas de Petri, el material clasificado se empleó para análisis bajo microscopía confocal laser y contraste por interferencia diferencial (DIC) para rápidamente realizar la determinación primaria de la homogeneidad de las fracciones clasificadas y la integridad celular post-*sorting*. En el caso de cubreobjetos, el material depositado se utilizó en ensayos de inmunocitoquímica (ver más abajo). En el caso del material clasificado para ser empleado en ensayos de qRT-PCR se empleó el modo de clasificación *Counter* (el modo de mayor pureza del *sorter*) y se colectó un número conocido de células en tubos eppendorf. Se mantuvieron muestras y tubos de colecta a 3–4 °C usando una unidad de refrigeración.

III.4. Inmunolocalizaciones

III.4.a. Anticuerpos específicos empleados

Luego de los *sorting*, un pequeño panel de anticuerpos primarios fue empleado en ensayos inmunocitoquímicos sobre el material clasificado, a modo de marcadores de diferentes poblaciones celulares de interés:

- Anticuerpo policlonal de conejo **anti-SYCP3** (*Acris Antibodies* RA25051; dilución 1:100); la proteína SYCP3 es un componente de los elementos laterales de CS (Fraune *et al.*, 2012).

- Anticuerpo monoclonal de ratón **anti-vimentina** (*Abcam ab20346*; dilución 1:400); la vimentina es un componente de filamentos intermedios ausente en células de línea germinal (Franke *et al.*, 1979).

- Anticuerpo policlonal de conejo **anti-EpCAM** (*Abcam ab71916*; dilución 1:100); EpCAM (*epithelial cell adhesion molecule*) es una glicoproteína transmembrana que participa en procesos de adhesión celular independientes del calcio. En testículo posnatal, se expresa en células de línea germinal hasta el estadio de espermatozoides (Anderson *et al.*, 1999).

- Anticuerpo policlonal de conejo **anti-3 β HSD1** (HSD3 β 1) (*Abcam ab65156*; dilución 1:100); la enzima HSD3 β 1 (3 β -hidroxi-delta-esteroide-deshidrogenasa tipo I) participa en la síntesis de esteroides y está presente en células con actividad esteroideogénica (en testículo, solo en células de Leydig) (Ge *et al.*, 2007).

- Anticuerpo monoclonal de rata **anti-TRA98** (*Abcam ab82527*; dilución 1:200); TRA98 ha sido descrito como un antígeno nuclear específico de células germinales (Tanaka *et al.*, 1998).

Los anticuerpos secundarios empleados fueron:

- Anti-conejo conjugado a *Texas red*; dilución 1:500 (*Abcam ab6719*)
- Anti-conejo conjugado a *Alexa 647*; dilución 1:500 (*Abcam ab150067*)
- Anti-conejo conjugado a *Alexa 405*; dilución 1:500 (*Abcam ab175649*)
- Anti-rata conjugado a *Alexa 568*; dilución 1:500 (*Abcam ab175475*)
- Anti-ratón conjugado a *Alexa 647*; dilución 1:500 (*Abcam ab150115*)
- Anti-ratón conjugado a *Alexa 405*; dilución 1:500 (*Abcam ab175660*)

III.4.b. Preparación de soportes con Poli-L-lisina

Para favorecer la adhesión del material, los soportes de vidrio fueron previamente tratados con una solución de Poli-L-lisina 0,1% (Sigma P8920), del siguiente modo:

Cubreobjetos: Los cubreobjetos de 24 x 24 mm fueron cuidadosamente limpiados con etanol 80% y luego colocados en *multiwell* de 6 pocillos, donde se dejaron secando *overnight* a TA. Posteriormente, se colocaron 100 µl de solución de poli-L-lisina sin diluir sobre un trozo de *Parafilm*, y se ubicaron los cubre-objetos encima, en contacto con el líquido; se dejó incubando durante 1 hora a TA. Se llevaron nuevamente a *multiwell* 6 y se realizaron 3 lavados de 5 minutos cada uno con agua bidestilada a TA con agitación suave. Se dejaron secar durante varias horas a TA y se almacenaron a 4°C en el mismo *multiwell* sellado con *parafilm*.

Portaobjetos: Los portaobjetos fueron limpiados con etanol, y una vez secos, se les trató con una dilución 1:10 de poli-L-lisina (concentración final 0,01%) durante 10 minutos. Una vez removido el exceso de líquido, sin enjuagar, se dejaron secar a TA protegidos del polvo y se almacenaron.

III.4.c. Inmunohistoquímica sobre criosecciones testiculares

El panel de anticuerpos fue primeramente probado en ensayos de inmunohistoquímica sobre criosecciones de testículo de ratones adultos. Este abordaje nos permitió contar con la referencia espacial dentro del epitelio seminífero, y poder identificar más fácilmente los diferentes tipos celulares testiculares en base a su aspecto, reactividad al anticuerpo y posición dentro de los túbulos seminíferos.

Para ello, trozos de testículo fueron crioprotegidos por inmersión en soluciones crecientes de sacarosa del 10 al 30% en buffer PHEM (60mM PIPES, 25mM HEPES, 10mM EGTA, 2mM MgCl₂; pH 7,2-7,4), luego infiltrados en concentraciones crecientes de medio de congelación de tejidos (Jung) y decrecientes de sacarosa hasta medio de congelación puro. Los fragmentos de tejido infiltrado fueron colocados en moldes conteniendo medio de congelación puro y congelados a -20°C. Los bloques resultantes se dejaron solidificar al menos 12 horas. Luego se procedió a montarlos en un crióstato SLEE modelo MEV previamente enfriado a -20°C, y se realizaron cortes de 10 µm de espesor. Los cortes fueron recogidos sobre portaobjetos previamente tratados con poli-L-lisina y almacenados a -20 °C hasta el momento de su utilización.

Previo a los inmunoensayos, los cortes fueron hidratados en buffer PHEM por 20 minutos a TA. A continuación, se procedió a permeabilizar en buffer PHEM con 0,1% tween 20 por una hora a TA, seguido por tres lavados en buffer PHEM de 5 minutos cada uno.

Para bloquear los grupos aldehídos y cetonas libres se utilizó 1% de borohidruro de sodio en buffer PHEM por 30 minutos a TA, y se repitieron los lavados. Luego se incubó durante 30 minutos a TA en solución de bloqueo (PHEM conteniendo 5% SFB, 0,1% BSA, 50mM glicina). Los anticuerpos primarios se emplearon en las diluciones especificadas en III.4.a preparadas en solución de bloqueo, y las incubaciones se realizaron *overnight* a 4°C. El anticuerpo no unido se lavó 3 veces por 10 minutos con buffer PHEM conteniendo 0,1% Tween20 y 50mM glicina. Luego se agregó el anticuerpo secundario correspondiente según el caso, y se incubó durante 1 hora a TA en solución de bloqueo. Finalmente, se repitieron los lavados y se montó con solución *antifade* (DABCO 2% en 1:1 glicerol/PBS 0,01M).

Las imágenes se adquirieron en un microscopio confocal Olympus FV300 equipado con una cámara digital DP70, usando el programa Fluoview v. 4.3. (Plataforma de microscopía confocal del IIBCE).

III.4.d. Inmunocitoquímica sobre porta-objetos

Sobre suspensiones enteras:

Una vez teñida la suspensión celular con VDG, se mezclaron 750 µl de suspensión celular con 750 µl de paraformaldehído al 2% y se fijaron por 10 minutos a TA. Se procedió a armar los dispositivos para citocentrifugación (*cytospin*): se colocó el portaobjeto tratado previamente con poli-L-lisina sobre el soporte metálico de citocentrifugación, seguido por papel absorbente y la pieza de plástico conteniendo el embudo donde se carga la muestra, y se ajustó finalmente el soporte metálico. Se cargaron 200-400 µl de la mezcla en el *cytospin* (según la concentración celular) y se centrifugó 2 minutos a 800 rpm.

Inmediatamente después se procedió a realizar la permeabilización; para el anticuerpo dirigido contra el antígeno de membrana EpCAM no se permeabilizó, mientras que para el resto de los anticuerpos se incubó con Tween20 0,1% durante 5 minutos. A continuación de la permeabilización, se realizaron 2 lavados en PBS de 5 minutos cada uno. Se colocaron los anticuerpos primarios en las concentraciones ya especificadas, y se incubaron en cámara húmeda a 4°C *overnight*. Por tratarse de incubaciones prolongadas, las mismas se realizaron en presencia de una mezcla de inhibidores de proteasas (Sigma P2714). Al día siguiente se realizaron 3 lavados con PBS de 5 minutos cada uno. Los anticuerpos secundarios se incubaron durante una hora a TA en cámara húmeda o 30 minutos a 37°C. Se realizaron lavados como se describió anteriormente y se montó con DABCO sin DAPI.

Sobre material clasificado en flujo:

Se midió el volumen recogido del material clasificado en tubo, se mezcló con un volumen igual de PFA 2% y se procedió a concentrar el material en un área pequeña mediante citocentrifugación y realizar los inmunoensayos, como se describió en el punto anterior.

III.4.d. Inmunocitoquímica sobre cubreobjetos

Luego del *sorting* y deposición directa sobre cubreobjetos previamente tratados con poli-L-lisina, se incubó el material durante 60-90 minutos a 4°C en cámara húmeda para permitir la decantación celular sobre el sustrato. Luego se realizó la fijación con paraformaldehído (PFA) 2% en PBS, durante 10 minutos a TA. Se realizaron dos lavados de 5 minutos cada uno con PBS en cámara húmeda, y se procedió a realizar la permeabilización con Tween20 0,1% durante 5 minutos (exceptuando nuevamente el caso del anticuerpo dirigido contra la proteína de membrana Epcam, que no requiere permeabilización alguna). A continuación, se realizaron lavados como se mencionó anteriormente. Se agregaron los anticuerpos primarios y se incubaron toda la noche a 4°C en presencia de una mezcla de inhibidores de proteasas (Sigma P2714). Al día siguiente se realizaron 3 lavados con PBS de 5 minutos cada uno. Los anticuerpos secundarios se incubaron en cámara húmeda protegidos de la luz durante una hora a TA o 30 minutos a 37°C. Se repitieron los lavados. Finalmente, se colocó una gota de montante DABCO sin DAPI sobre un portaobjeto limpio, y sobre éste se montó el cubreobjeto con las células hacia abajo.

Nuevamente, las imágenes se adquirieron en el microscopio confocal Olympus FV300 de la Plataforma de Microscopía confocal del IIBCE. En paralelo, se adquirieron imágenes con contraste de interferencia diferencial (DIC) en el mismo equipo.

III.5. Análisis confirmatorios de identidad de poblaciones clasificadas por qRT-PCR.

III.5.a. Diseño de iniciadores para transcritos marcadores de tipo celular.

En primer lugar, se procedió a la elección de genes de expresión específica de diferentes tipos celulares testiculares de interés (células de Sertoli, células de Leydig y espermatogonias). Para ello se realizó una revisión bibliográfica profunda en busca de genes cuyo patrón de expresión hubiera dado específico de los distintos tipos celulares, y se procedió a diseñar juegos de iniciadores para los diferentes genes considerados. Se eligieron los siguientes genes:

- *Dazl*, como marcador de espermatogonias dentro de la población 2C. La proteína DAZL (*deleted in azoospermia like*) es un factor promotor de la meiosis en células de línea germinal (Schrans-Stassen *et al.*, 2001; Lin *et al.*, 2008).
- *Cyp17a1*, en testículo sólo expresado por células de Leydig. La enzima esteroidogénica CYP17A1 (citocromo P450 17 α -Hydroxylase/17,20-Lyase) es una enzima clave en la vía de síntesis de la testosterona (Miller y Auchus, 2011).
- *Cln11*, de expresión en células de Sertoli. La proteína CLDN11 (claudina 11) se ubica en las uniones Sertoli-Sertoli y en las áreas de contacto de las células de Sertoli con las espermatogonias (Stammler *et al.*, 2016).
- *Prm1*, como marcador de espermátidas, que fueron empleadas como población control externa. La protamina 1 (PRM1), proteína básica con alto contenido en arginina, constituye uno de los componentes de la cromatina del espermatozoide y permite un estado de compactación muy superior al de los nucleosomas con histonas (Fawcett, 1975a).

El diseño de iniciadores se realizó a través de los siguientes programas:

- *Primer3PLUS* (<http://www.primer3plus.com/cgi-bin/dev/primer3plus.cgi>)
- *Oligoanalyzer* (<https://www.idtdna.com/calc/analyzer>)
- *Primer-Blast* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>)

La fabricación de los oligonucleótidos se encargó a la empresa Macrogen (Corea). Los mismos se recibieron liofilizados, se resuspendieron en Tris 10mM pH 8 estéril a una concentración stock de 100 μ M, y se prepararon alícuotas de trabajo a una concentración de 10 μ M en agua ultrapura estéril. Las secuencias de los iniciadores diseñados y el tamaño esperado de los productos amplificados, se presentan en Anexos VII.1.

Los mismos fueron empleados primeramente sobre ARN total de testículo de ratón en ensayos de RT-PCR a tiempo final, como etapa preparatoria para los qRT-PCR sobre células clasificadas en flujo.

III.5.b. Ensayos de transcripción reversa (RT) seguida por PCR a tiempo final.

El ARN total de testículo entero de 26 dpp se empleó como molde en reacciones de transcripción reversa utilizando como iniciador un oligómero poliT con el fin de obtener ADN copia correspondiente a todos los genes expresados en cada tipo celular. Para las reacciones se partió de ARN total y se emplearon las siguientes mezclas de reacción utilizando soluciones y reactivos libres de ARNasas:

Mezclas de retrotranscripción

Tubo 1

ARN total de testículo (2 µg/µL)	0,5 µL
Oligo dT ₁₈ (0,5 µg/µL)	1 µL
Agua DMPC	9,5 µL
Volumen parcial 1	11 µL

Tubo 2

5x buffer RT	4 µL
dNTPs 2,5 mM	2 µL
Inhibidor de ARNasas (40 U/ µL)	0,25 µL
Agua DMPC	1,75 µL
enzima M-MuLV RT (200 U/ µL)	1 µL
Volumen parcial 2	9 µL

El tubo 1, conteniendo el ARN y el iniciador oligo dT, se incubó durante 5 minutos a 70°C para lograr la desnaturalización del ARN. Luego se colocó en hielo y se le agregó el contenido del tubo 2 completando un volumen final de 20 µL. Se mezcló mediante pipeteo suave y se corrió el siguiente programa en termociclador: 5 minutos a 37°C, 1 hora a 42°C y 10 minutos a 70°C. Finalmente, se guardaron alícuotas de uso (2 µl) a -80°C. Se corrió en paralelo una reacción sin enzima transcriptasa reversa como control negativo.

Posteriormente, los ADNc obtenidos mediante transcripción reversa se emplearon como molde en reacciones de PCR a tiempo final. La mezcla de reactivos empleada fue la siguiente:

Mezclas de reactivos para PCR

Agua ultrapura estéril	10,5 µL
10x Buffer Taq polimerasa	2 µL
MgCl ₂ (25 mM)	2 µL
dNTPs (10 mM)	1 µL
Iniciador <i>Forward</i> (10 µM)	1 µl
Iniciador <i>Reverse</i> (10 µM)	1 µl
Taq polimerasa	0,5 µL
ADNc	2 µL
Volumen final/tubo	20 µL

Se mezcló mediante pipeteo suave y se llevó a termociclador. El programa utilizado consistió en una desnaturalización inicial a 95°C por 5 minutos y 40 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a temperatura de anillado, y 30 segundos a 72°C, seguidos de una extensión final de 5 minutos a 72°C. Se ensayaron 3 temperaturas diferentes de anillado 55, 58 y 60°C.

Los productos de PCR se visualizaron en geles de agarosa 2% en TAE 1X, en paralelo a un marcador de peso molecular (escalera de 100 pares de bases).

III.5.c. Confirmación de identidades celulares mediante RT y PCR a tiempo real.

Para los ensayos confirmatorios de identidades mediante qRT-PCR, se empleó material clasificado en flujo proveniente de las regiones distinguibles dentro de la población 2C (“2C de alto SSC” y “2C de bajo SSC”) en tres réplicas biológicas. Se partió de un número conocido de células colectadas, dado que las clasificaciones fueron realizadas empleando el programa *CloneCyt Plus* (BD) en el modo *Counter*. Se utilizaron 3000 células en cada reacción. Se empleó el *Power SYBR Green Cells-to-Ct Kit* (Ambion-Life Technologies), que no requiere de extracción previa de ARN, siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, las células fueron lisadas y se empleó este lisado como molde para la transcripción reversa. Posteriormente, se llevaron a cabo los qPCR empleando las temperaturas de anillado visualizadas como óptimas en los PCR a tiempo final (III.5.b). Todas las reacciones se llevaron a cabo en tres réplicas biológicas en un equipo *CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System1* (BioRad, Hercules, CA).

La eficiencia de amplificación de los juegos de iniciadores diseñados fue evaluada mediante análisis de la curva estándar obtenida para diluciones seriadas del ARN total de testículo. Para los juegos de iniciadores acá presentados fue superior al 90%.

El método utilizado para la cuantificación relativa fue $2^{-\Delta\Delta C_t}$. El gen *Ppp1cc* (proteína fosfatasa 1, subunidad catalítica, isozima gama) fue elegido como gen *housekeeping* normalizador (Warrington *et al.*, 2000; Ersland *et al.*, 2012), y las espermátidas redondas fueron empleadas como población externa (gen específico utilizado: protamina 1, *Prm1*), también en triplicado.

IV.RESULTADOS

IV.1. Vybrant Dye Cycle Green aplicado a suspensiones celulares de testículo de ratón: clasificación de poblaciones celulares C y 4C.

Empleando el método exclusivamente mecánico descrito en III.2.a, se obtuvieron suspensiones celulares testiculares de buena calidad presentando una viabilidad global >90% y un 8% de multinucleados, según pudo determinarse por exclusión de colorante y conteos al microscopio, respectivamente.

Tales suspensiones fueron expuestas a VDG y analizadas por CMF según se detalla en *Materiales y métodos*. Sobre los perfiles citométricos, particularmente en los *dot plots*, pudo comprobarse la existencia de un importante número de poblaciones celulares diferenciables entre sí. Cabe destacar que no todos los fluorocromos de unión al ADN rinden este tipo de perfiles. A modo de ejemplo, en la figura IV.1 se comparan los perfiles obtenidos a partir del análisis de suspensiones celulares de testículo de ratón adulto expuestas a Ioduro de Propidio (IP) y a VDG.

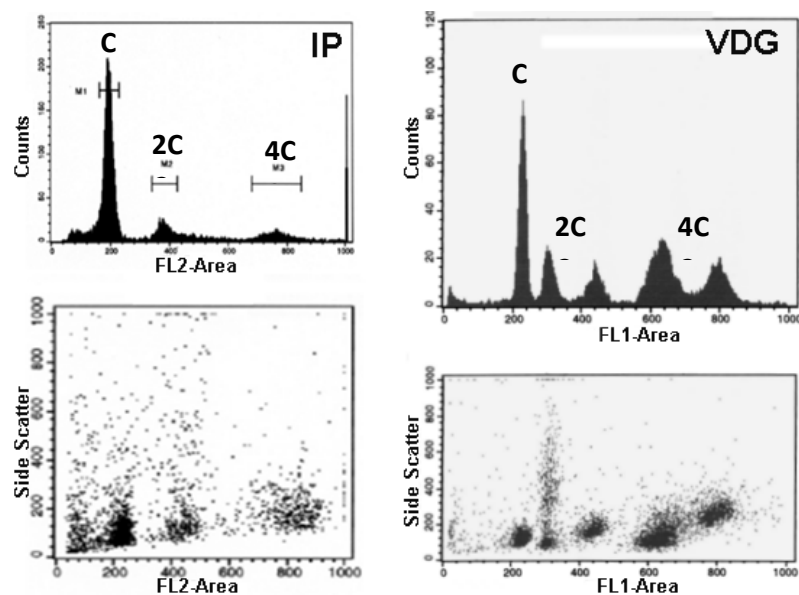


Fig. IV.1. Comparación de perfiles citométricos obtenidos a partir de suspensiones celulares de testículo de ratón adulto expuestas a IP (izquierda) o VDG (derecha).

De acuerdo a la intensidad de fluorescencia, el IP permite distinguir 3 poblaciones celulares en base a su contenido de ADN. Las mismas corresponden a las poblaciones 4C, 2C, C. No aparecen diferencias importantes cuando se considera el parámetro desviación lateral de la luz (SSC, *side scatter*, que corresponde a la complejidad celular) bajo esta tinción.

A diferencia del IP, la intensidad de fluorescencia del VDG permite diferenciar cinco grandes poblaciones dentro de la heterogénea mezcla de células testiculares de ratón y

considerando los mismos parámetros, intensidad de fluorescencia [FL1 y FL2-area, reflejando esta última el contenido de ADN]), y SSC. Adicionalmente, la consideración del parámetro SSC representativo del nivel de complejidad celular, permite diferenciar una sexta población de elevada complejidad dentro de las células 2C (alto SSC-H).

La identificación en los *dot plots* de un mayor número de poblaciones discretas cuando se emplea un fluorocromo como el VDG sobre suspensiones de células testiculares, abre la posibilidad de aislar dichas poblaciones mediante clasificación en flujo, para luego intentar determinar su identidad y el grado de pureza obtenido. Con este objetivo fue que se determinaron regiones de clasificación en base a diferencias en contenido de ADN, tamaño y complejidad celular.

En la figura IV.2 se muestra un ejemplo de perfiles citométricos obtenidos con VDG donde se consideraron los parámetros contenido de ADN (FL1-A) y desviación frontal de la luz (FSC, *forward scatter*), representativa del tamaño celular, en un individuo de 21dpp. Se marcaron sobre los *dot plots* dos regiones de clasificación (R1 y R2) y el material clasificado fue luego analizado al microscopio.

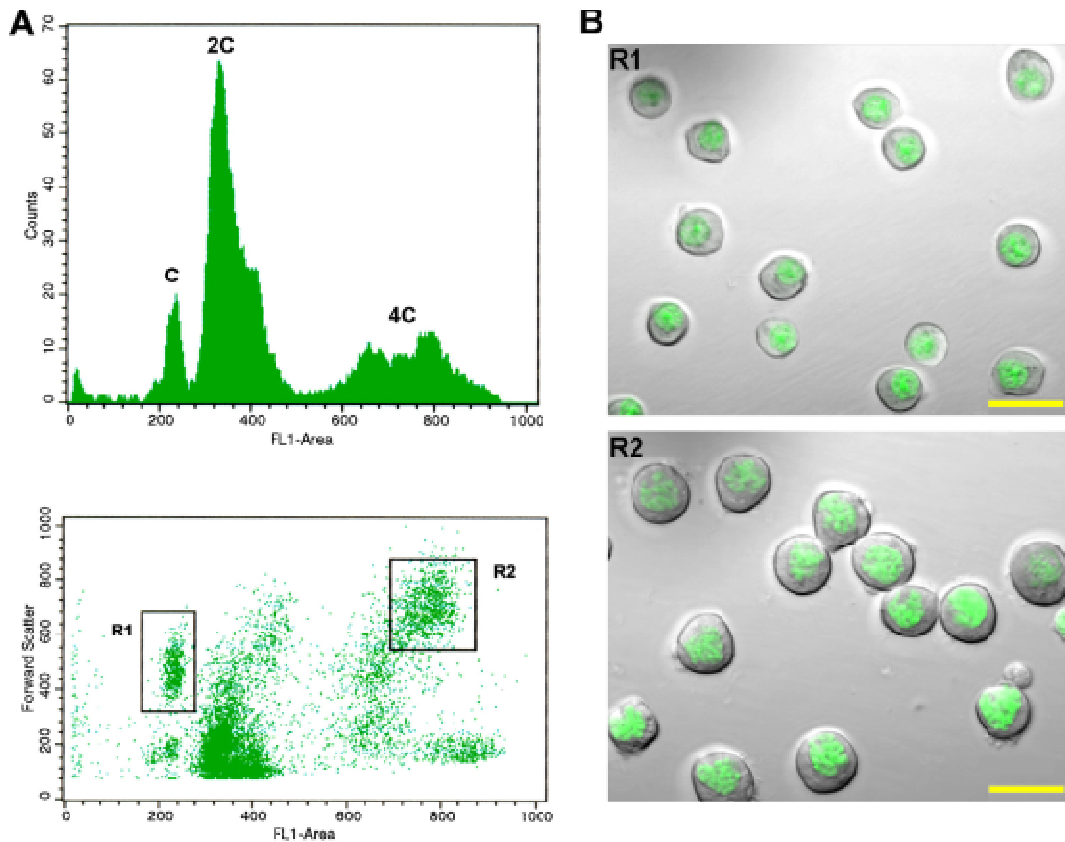


Fig IV.2. A) Análisis por citometría de flujo de suspensión celular testicular de ratón de 21 dpp teñida con VDG. Gráfico de puntos indicando dispersión frontal de la luz (forward scatter, FSC-H) vs. intensidad de fluorescencia verde del VDG (FL1-Area) y su correspondiente histograma. Los picos corresponden a las poblaciones celulares que difieren en su contenido de ADN (C, 2C y 4C). Las regiones de sorting elegidas para las poblaciones C y 4C se muestran como R1 y R2 respectivamente. B) Análisis de células clasificadas provenientes de las regiones indicadas (C región de alto FSC-H [R1] y 4C región derecha de alto FSC-H [R2]). Las células clasificadas fueron analizadas mediante microscopía laser confocal (fluorescencia del VDG) y contraste de interferencia diferencial (DIC). Nótese la homogeneidad e integridad del material clasificado. Las barras corresponden a 20 μm .

El análisis citológico de estas fracciones permitió establecer que la población R1 correspondía a espermátidas redondas (ER) dado su contenido de ADN, tamaño y aspecto (nucleolo característico, aspecto de la cromatina); mientras que la fracción R2 correspondería a espermátocitos primarios en etapas medias a avanzadas (P/D, paquiteno/diploteno, mayormente paquiteno) dado su contenido de ADN, tamaño celular/nuclear y aspecto de la cromatina (Rodríguez-Casuriaga *et al.*, 2014).

Como puede observarse, las células *post-sorting* preservan su citoplasma y exhiben muy buena integridad y aspecto, lo cual resulta crítico cuando el método se emplea con fines preparativos (por ejemplo, extracciones posteriores de ARN para estudios de expresión génica). Por otra parte, es notoria la homogeneidad de las fracciones purificadas, lo cual

sumado a su excelente preservación, torna a éste un material ideal para estudios comparativos a nivel molecular de las condiciones meiótica (R2) y posmeiótica (R1).

IV.2. Vybrant Dye Cycle Green y su poder de discriminación dentro de la población 4C de testículo de ratón.

Empleando el método de disgregación exclusivamente mecánica descrito en III.2.A seguido por exposición al VDG nos abocamos a intentar realizar clasificaciones más refinadas.

En trabajos previos del grupo de Biología Molecular de la Reproducción del IIBCE en colaboración con el SECIF, se había logrado la clasificación de subestadios de primera profase meiótica empleando como modelo biológico al cobayo y exposición prolongada al IP (Rodríguez-Casuriaga *et al.*, 2011). Sin embargo, como hemos mencionado, el cobayo constituye una excepción en el sentido de que presenta una profase meiótica temprana (L/Z) muy prolongada. En la mayoría de los mamíferos, en cambio, la profase temprana es de muy corta duración, por lo cual la representación de espermatoцитos tempranos es significativamente menor. En particular en el ratón, los estadios de L y Z en conjunto duran aproximadamente 1,5 días, unas 5 veces menos que en cobayo (Rodríguez-Casuriaga *et al.*, 2011). A consecuencia de ello, no había sido posible reproducir esta técnica de purificación a partir de testículo de ratón. Además del menor poder discriminatorio del IP y su incapacidad de discriminar subpoblaciones en el ratón, debido a que es un colorante no vital, como era de esperar, comprobamos que las células de cobayo purificadas mediante este colorante no presentaban buena integridad (membrana dañada).

La incorporación del fluorocromo vital VDG y su aparente mayor capacidad de discriminar subtipos celulares, abría la posibilidad de purificar subestadios de primera profase meiótica aún en situación de baja representación celular. Además, dado que como hemos mencionado, el material obtenido era de muy alta calidad (ver Figura IV.2), decidimos probarlo como medio de purificación de subestadios de profase meiótica en el ratón. Los resultados obtenidos se muestran en la figura IV.3. El VDG efectivamente permitió la purificación de subestadios meióticos en alta pureza a partir de material de ratón, a pesar de su escaso porcentaje dentro de la suspensión testicular. En estos ensayos se empleó un anticuerpo dirigido contra un componente de elemento lateral de complejo sinaptonémico (SYCP3) sobre material clasificado proveniente de las regiones R3 y R4 indicadas en la figura IV.3. Esta inmunomarcación permite discriminar etapas meióticas tempranas de las medias/avanzadas ya que estas últimas presentan CS totalmente ensamblados de un extremo cromosómico al otro (marcación filamentosa más gruesa), mientras que en las tempranas aún se aprecia la presencia de ejes simples (marcación más delgada).

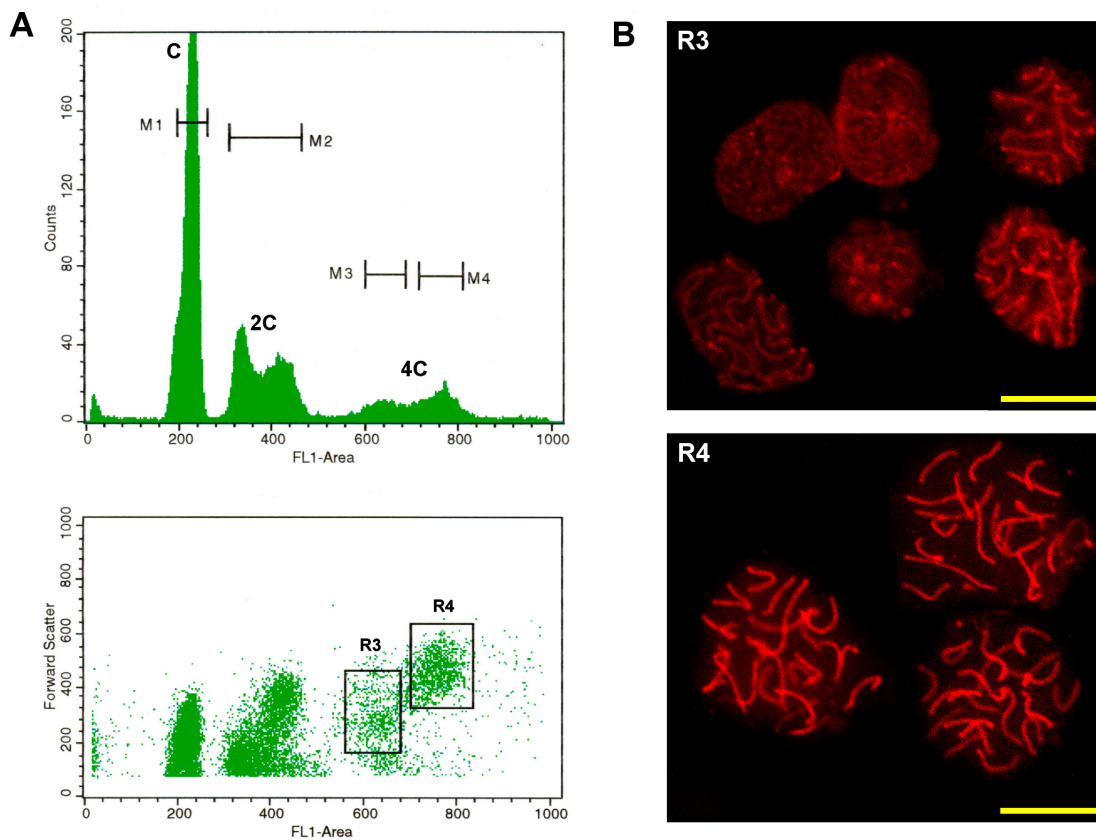


Figura IV.3. Perfiles de citometría de flujo obtenidos del análisis de la suspensión celular testicular de un ratón de 25 dpp. **A)** Gráfico de puntos dispersión frontal (FSC-H) vs. Intensidad de fluorescencia verde del VDG (FL1-A) y su correspondiente histograma. En el histograma puede observarse mayor número de picos en comparación con los perfiles obtenidos con IP, denotando que el VDG permite diferenciar células con igual contenido de ADN. Se indican dos regiones de sorting dentro de la población 4C (R3 y R4). **B)** Análisis de células clasificadas a partir de las regiones R3 y R4. Microscopía laser confocal e inmunodetección usando un anticuerpo contra el elemento lateral del complejo sinaptonémico SYCP3 (synaptonemal complex protein 3, componente de elemento lateral de CS). R3 corresponde a espermatocitos tempranos (leptoteno, cigoteno), que presentan ejes simples solos o combinados con tramos cortos del complejo sinaptonémico; R4 corresponde a espermatocitos medios a avanzados (paquiteno, diploteno) con los complejos sinaptonémicos completamente ensamblados. Las barras corresponden a 10 μ m.

Los resultados obtenidos fueron reportados (Rodríguez-Casuriaga *et al.*, 2014) y representaron un logro importante, ya que permitirían realizar clasificaciones preparativas de estadios tempranos de profase meiótica para estudios comparativos al nivel molecular en ratón, modelo mamífero por excelencia. Fue así que posteriormente, en el marco de otro proyecto financiado del grupo, a partir fracciones purificadas del mismo modo acá descrito para las regiones R1-R4 (Figs. IV.2-3), pudieron obtenerse ARNs totales de buena calidad que fueron empleados para estudios transcriptómicos, con resultados altamente satisfactorios (Da Cruz *et al.*, 2016).

IV.3. Diferencias en enriquecimiento relativo de poblaciones celulares testiculares de interés para diferentes edades posparto.

En la figura IV.4 se presentan algunos perfiles citométricos resultantes del análisis de suspensiones de células testiculares de ratones de algunas edades representativas, expuestas al fluorocromo vital VDG. En estos ejemplos puede apreciarse la presencia/ausencia y abundancia/escasez de las diferentes poblaciones celulares de testículo, dependiendo de la etapa de desarrollo posnatal en el momento del procesamiento y análisis del material.

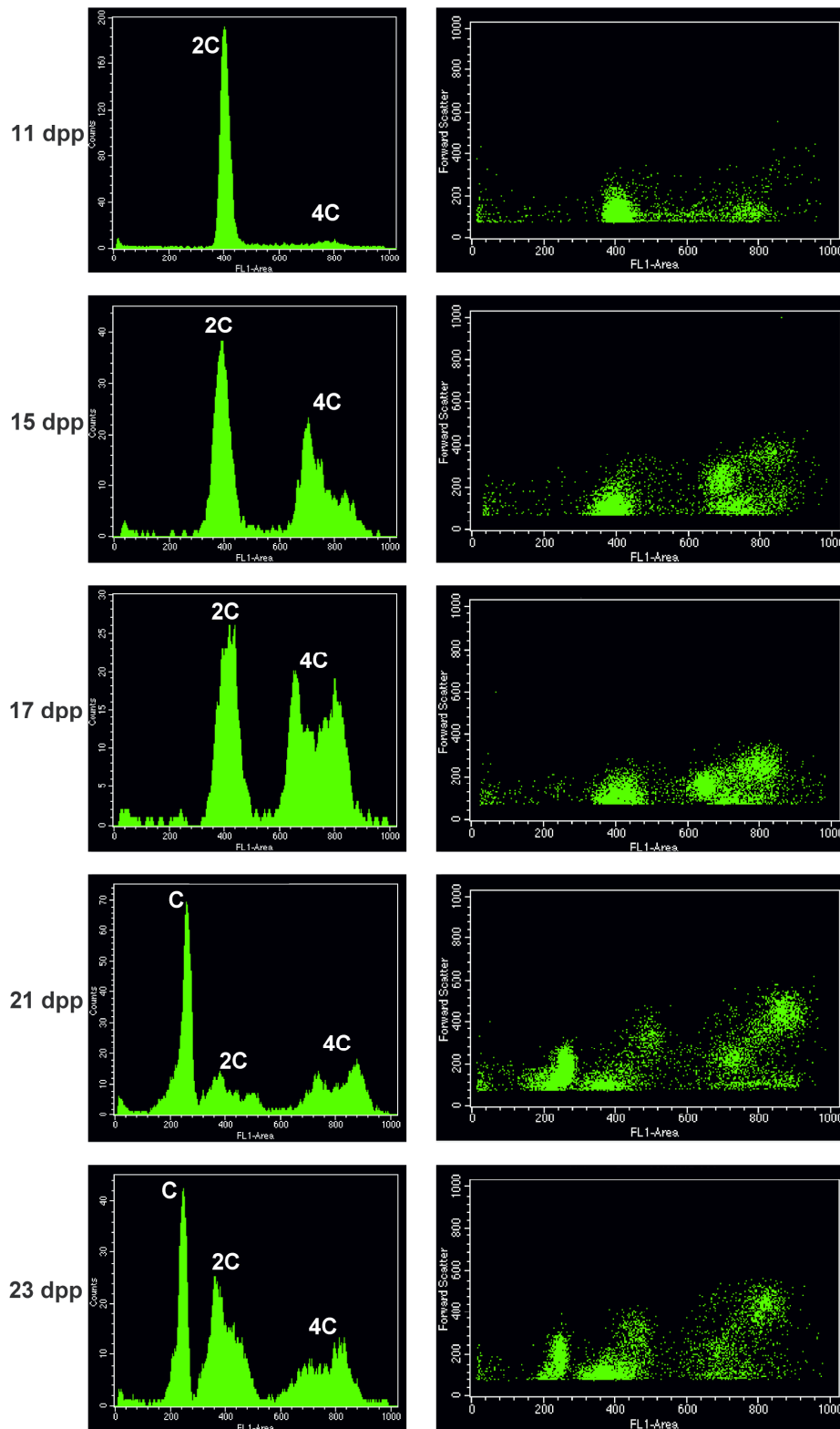


Fig. IV.4 - Análisis por citometría de flujo de suspensiones celulares testiculares de ratones de 11, 15, 17, 21 y 23 dpp expuestas al fluorocromo VDG. Se presentan los datos en gráficos de puntos indicando dispersión frontal de la luz (FSC-H) vs. intensidad de fluorescencia del VDG (FL1-Area) y

sus correspondientes histogramas. Los picos corresponden a las poblaciones celulares que difieren en su contenido de ADN (C, 2C y 4C).

En CMF, para obtener resultados positivos es necesario optimizar las condiciones de clasificación en flujo. Por ejemplo, es recomendable evitar la clasificación de “eventos raros”, entendiéndose por raros los de muy baja frecuencia en la muestra ($\leq 5\%$). Cuanto más abundante sea la población objetivo dentro de la muestra (en nuestro caso, dentro de la suspensión celular testicular), mayores probabilidades de clasificar y recuperar con éxito una mayor cantidad de material en tiempos menores. Por ejemplo, si la población objetivo para el *sorting* es la población de espermátidas redondas, se tendrá que elegir ratones de al menos 20 dpp, pero si se elijen especímenes de 23-27 dpp el contenido de estas células será 2-2,5 veces mayor y se estará optimizando su clasificación (Tabla IV.1 y Figura IV.5).

Tabla IV.1. Abundancia relativa durante el desarrollo posnatal del ratón de las poblaciones R1 y R2 mostradas en la figura IV.2: espermatoцитos primarios en estadios de paquiteno/diploteno (P/D, R2), y espermátidas redondas (ER, R1).

Edad (dpp)	P/D (%)*	ER (%)*
15	10,80 \pm 4,15	0,38 \pm 0,08
17	17,20 \pm 4,89	0,99 \pm 0,07
20	13,97 \pm 0,88	10,84 \pm 2,83
23	12,72 \pm 2,84	27,06 \pm 5,55
25**	7,29 \pm 1,88	20,98 \pm 9,83
27-29	4,06 \pm 1,51	24,05 \pm 4,57

*Los porcentajes fueron determinados por análisis citométrico en flujo en relación al gate combinado de exclusión de dobletes y debris.

**Las disminuciones en los porcentajes a partir de esta edad están dadas por la aparición de las espermátidas en elongación, y posteriormente de los espermatozoides.

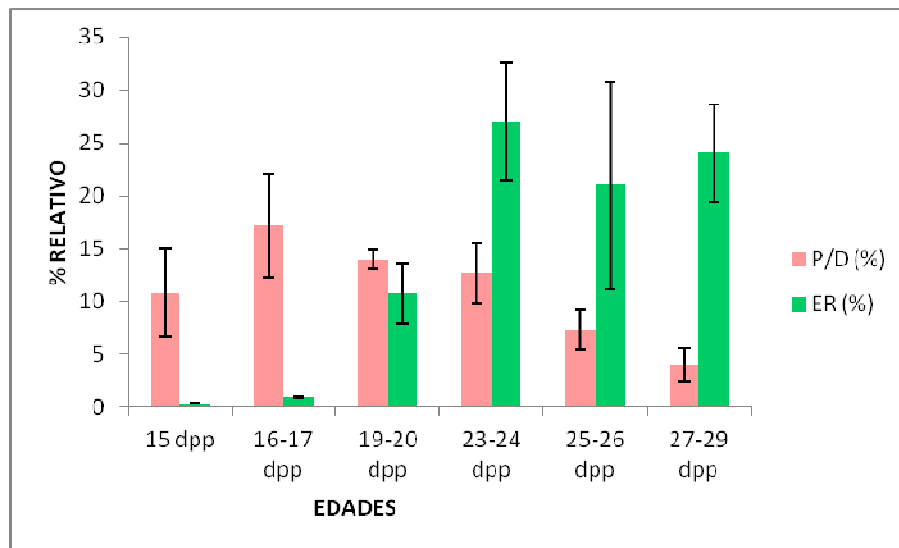


Figura IV.5 – Comparación de contenido de espermatocitos paquiténicos/diploténicos (P/D) y de espermátidas redondas (ER) en suspensiones celulares de testículo de ratones juveniles con diferente grado de desarrollo. En cada caso está indicado el desvío estándar obtenido. Las disminuciones en los porcentajes a partir de los 25 dpp están dadas por la aparición de las espermátidas en elongación, y posteriormente de los espermatozoides.

Otra observación interesante de la Figura IV.4 corresponde a la población 4C. A los 15 dpp el pico correspondiente ha aumentado notoriamente de tamaño debido al importante incremento en el número de células en profase meiótica. Además, la aparición de los espermatocitos en paquiteno se hace evidente por el surgimiento del sub-pico derecho, y esta población se evidencia también en el *dot plot* correspondiente. Con el avance de la onda espermatogénica, a los 17 dpp, observamos que ambos sub-picos poseen ya aproximadamente el mismo tamaño, lo cual también se refleja en el incremento en la densidad de la nube derecha en la población 4C del *dot plot*.

Sin embargo, el aspecto cuantitativo no es lo único que debe considerarse en algunos casos. Por ejemplo, si el objetivo es obtener una población de espermatocitos en profase media, según los datos presentados en la tabla IV.1 a los 17-20 días tendremos en el entorno de un 14-17% de las células de la suspensión, por lo cual podrían emplearse animales en todo este rango de edades. La elección de especímenes de 20 días me aseguraría disponer de más material de trabajo, ya que sus gónadas serán de mayor tamaño que las de ratones de 17 dpp. Sin embargo, en este caso sería aconsejable optar por especímenes de poco menos de 20 días de edad (17-18 dpp). El motivo radica en que el inicio de la espermiogénesis (y por ende, la aparición de las primeras espermátidas redondas) se da en ratón usualmente a los 20 dpp, por lo cual el empleo de individuos de 17 dpp ayudaría a evitar la contaminación de la fracción 4C alta derecha con multinucleados

formados a partir de espermátidas redondas, que suelen no ser nulos (Meistrich, 1977), y son indistinguibles por el citómetro de una verdadera célula 4C.

Con el fin de determinar los rangos de edades apropiadas para optimizar las condiciones de purificación en flujo, e incluyendo a todas las poblaciones celulares, se analizaron por CMF suspensiones celulares de ratones de diferentes edades entre 10 y 29 dpp teñidas con VDG y se determinaron los porcentajes relativos de las células con contenido C, 2C y 4C (Figura IV.6).

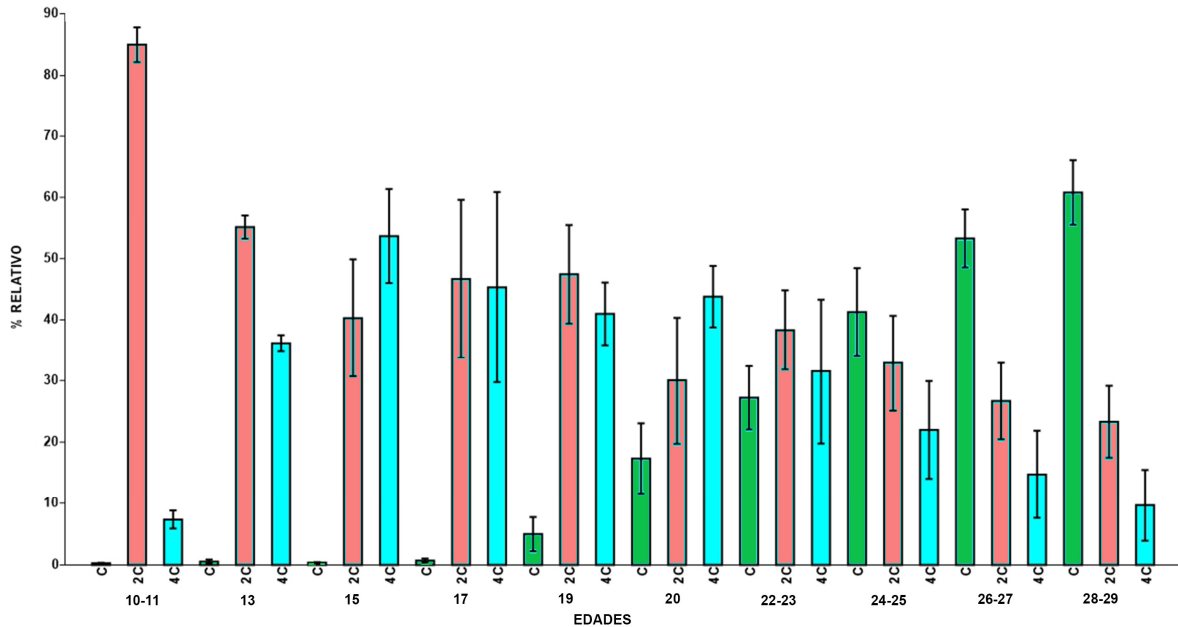


Figura IV.6 – Abundancia relativa de las poblaciones C, 2C y 4C durante el desarrollo posnatal de testículo de ratón. Los porcentajes representados corresponden a porcentajes del gate combinado (exclusión de dobles y exclusión de debris). En cada caso se indica el desvío estándar obtenido. Se puede observar claramente la aparición de una población 4C significativa a los 10-11 dpp, indicativa de la entrada en meiosis, así como la aparición de la población C a los 19 dpp, que evidencia el inicio de la espermiogénesis.

En base a los resultados obtenidos, y considerando otros aspectos relevantes como masa testicular y eventual contaminación con multinucleados, se determinaron los rangos de edades óptimas para purificar diversos estadios:

1. Para la clasificación de estadios tempranos de primera profase meiótica específicamente (leptoteno-cigoteno, LZ) la edad óptima sería 13 dpp, ya que el porcentaje relativo dentro de la suspensión es muy elevado y aún hay pocas células en paquiteno (P).
2. Para la distinción simultánea de estadios tempranos (LZ) y medios (P) de profase meiótica, en general, la edad óptima es 17-18 dpp, ya que presenta un

enriquecimiento natural importante en estos estadios, y aún no han aparecido las espermátidas redondas que tienden a formar multinucleados.

3. La purificación de células posmeióticas, en general, está enfocada a las etapas iniciales (espermátidas redondas) por ser aún transcripcionalmente activas, y la edad óptima para obtenerlas sería 21-25 dpp.
4. Para separar células en profase I que incluyan los estadios meióticos más tardíos (paquiteno tardío/diploteno, P/D) en simultáneo a espermátidas redondas, individuos de 21-25 dpp serían los de elección.
5. Para la clasificación de la población 2C total de células testiculares el rango de edades aconsejable sería 19-22 dpp. El empleo de individuos mayores disminuye el rendimiento debido a que la presencia de un elevado número de células haploides en edades posteriores, dificulta la distinción clara de las poblaciones de interés en los perfiles citométricos, y favorece la aparición de dinucleados de espermátidas redondas.

Lo planteado en los puntos anteriores puede variar de acuerdo a las necesidades y objetivos de la investigación. Por ejemplo, la elección de los especímenes adecuados para la purificación de estadios medios/avanzados de profase meiótica dependerá del subestadio de interés: las edades propuestas en el punto 2 serían adecuadas para la obtención de paquiteno medio, mientras que para los más tardíos se requieren individuos mayores (punto 4), con las ventajas y desventajas correspondientes en cada caso que se discutirán más adelante.

Del mismo modo, lo propuesto en el punto 5 puede modificarse de acuerdo a la investigación. Por ejemplo, si se desea dejar fuera del material clasificado (de contenido de ADN 2C) a los espermatocitos II (en caso de que la población 2C fuera a ser empleada como una referencia premeiótica en posteriores estudios moleculares, por ejemplo), se debería partir de especímenes de no más de 17 dpp. Cabe agregar que esta población sería igualmente heterogénea, ya que no solamente contiene células de línea germinal en etapas previas a la meiosis (espermatogonias), sino que también incluye células somáticas de testículo (Leydig y Sertoli, entre otras). Las investigaciones que requieran mayor homogeneidad en el material clasificado deben contar con un mayor refinamiento previo de la discriminación de subtipos celulares dentro de esta población.

IV.4. Vybrant Dye Cycle Green y la distinción de subpoblaciones celulares dentro de la población 2C.

Si bien dentro de las poblaciones de células testiculares con contenido de ADN C y 4C las identidades de las poblaciones distinguibles estaban más claras, no ocurría lo mismo con la población 2C. Esta diferencia se debe a la inexistencia de estudios citométricos anteriores en relación a esta población, así como a la composición altamente heterogénea de la misma.

La distribución de la población 2C de células testiculares en los gráficos citométricos bajo tinción con VDG resultó sumamente llamativa, especialmente al considerar el parámetro dispersión lateral de la luz (*side scatter, SSC-H*) (Figura IV.7). A partir de los perfiles citométricos de especímenes de diferentes edades se marcaron dentro de la población 2C regiones de clasificación basadas en este último parámetro: una población 2C con alta dispersión lateral ("2C alto SSC"), y otra población celular 2C con baja dispersión lateral ("2C bajo SSC"). Como puede apreciarse en la figura IV.7, es notoria la diferencia obtenida en SSC-H para una población con respecto a la otra (R5 con respecto a R6), lo cual estaría indicando grandes diferencias en la complejidad interna o granularidad de las células provenientes de estas dos regiones. Eventos provenientes de ambas regiones fueron clasificados para su posterior estudio.

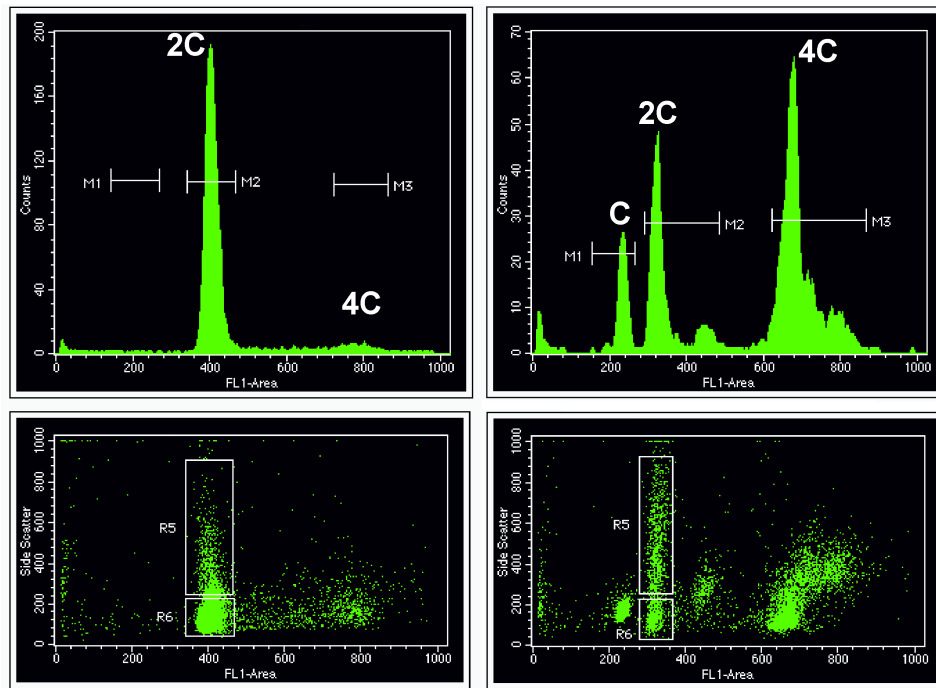


Figura IV.7 - Análisis mediante citometría de flujo de suspensiones celulares testiculares de ratones juveniles de 11 dpp (izquierda) y 23 dpp (derecha) teñidas con VDG. Se presentan gráficos de puntos indicando la dispersión lateral (SSC-H) vs intensidad de fluorescencia del VDG (FL1-Area) y sus correspondientes histogramas. En estos últimos se pueden distinguir picos que corresponden a las poblaciones celulares presentes que difieren en su contenido de ADN. R5 y R6 corresponden a las regiones de sorting elegidas en los dot plots dentro de la población 2C para su posterior caracterización.

Una vez clasificadas las fracciones indicadas, se procedió a comprobar visualmente la diferencia en complejidad interna observada en los perfiles citométricos. Para ello las células clasificadas fueron analizadas mediante microscopía de contraste por interferencia diferencial (DIC), ideal para poner en evidencia diferencias en la granularidad o complejidad interna celular. Los resultados de estos análisis se ejemplifican en la figura IV.8. La población proveniente de la región R5 - de alta dispersión lateral - presentó elevada homogeneidad al microscopio en cuanto a su aspecto, tamaño y complejidad interna. En relación a este último punto, se trata de células con un gran citoplasma en el que resulta muy evidente la presencia de numerosos gránulos que explican su posición en los gráficos. Por otra parte, la población celular 2C de baja dispersión lateral (región R6) mostró menor tamaño celular que la anterior, citoplasmas notablemente más pequeños y poco granulosos.

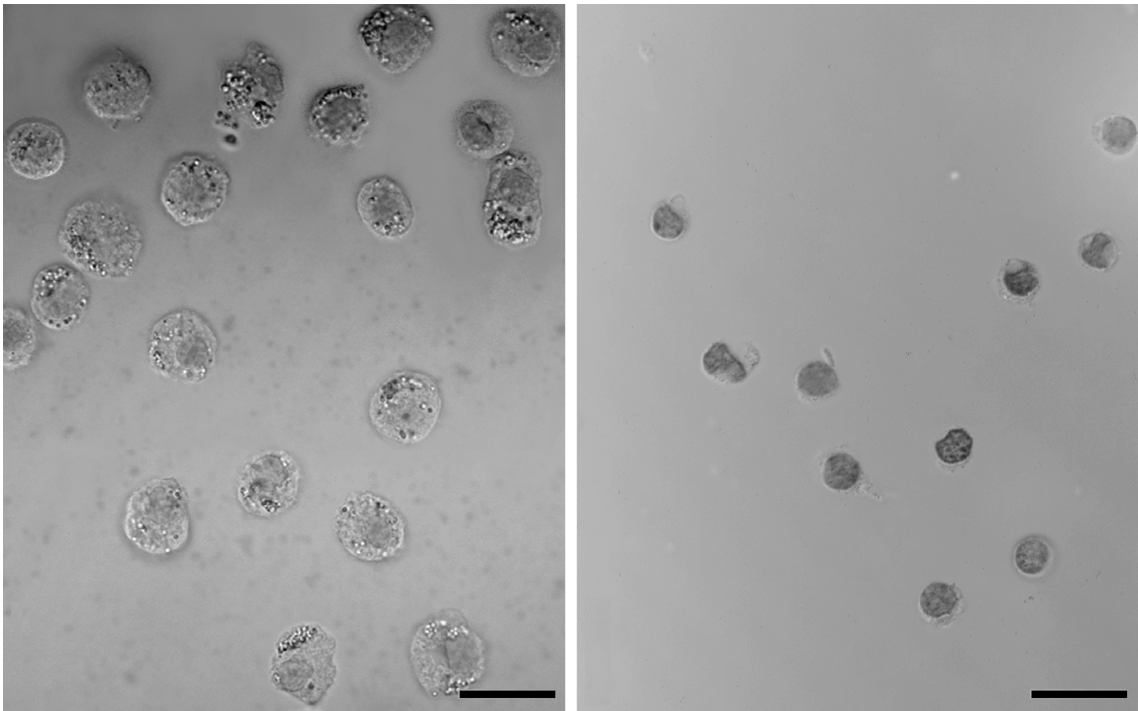


Figura IV.8 - Análisis mediante microscopía de contraste por interferencia diferencial de células clasificadas en flujo provenientes de las regiones R5 y R6 indicadas en la figura IV.7. El elevado contenido de gránulos citoplasmáticos de la fracción R5 (izquierda) resulta evidente, lo cual explica la despegada complejidad interna visualizada para esta población en los perfiles citométricos. Comparativamente, la fracción R6 (derecha) está conformada por células más pequeñas y carentes de estructuras internas evidentes que provoquen una gran dispersión lateral de la luz, lo cual concuerda con la posición de esta población en los gráficos. Las barras corresponden a 20 μm .

Adicionalmente, se analizó el aspecto de los núcleos de las células provenientes de R5 y R6. Dado que las células estaban teñidas con VDG, este análisis pudo realizarse mediante microscopía laser confocal. En la figura IV.9 se ejemplifican los resultados obtenidos de estos análisis. Como puede observarse, no se registraron diferencias en relación al tamaño nuclear entre ambas fracciones. Sin embargo, pueden apreciarse diferencias en cuanto a la forma de los núcleos que en la fracción de bajo SSC (R6) son en su mayoría redondeados, mientras que los núcleos provenientes de R5 son en su mayoría más irregulares.

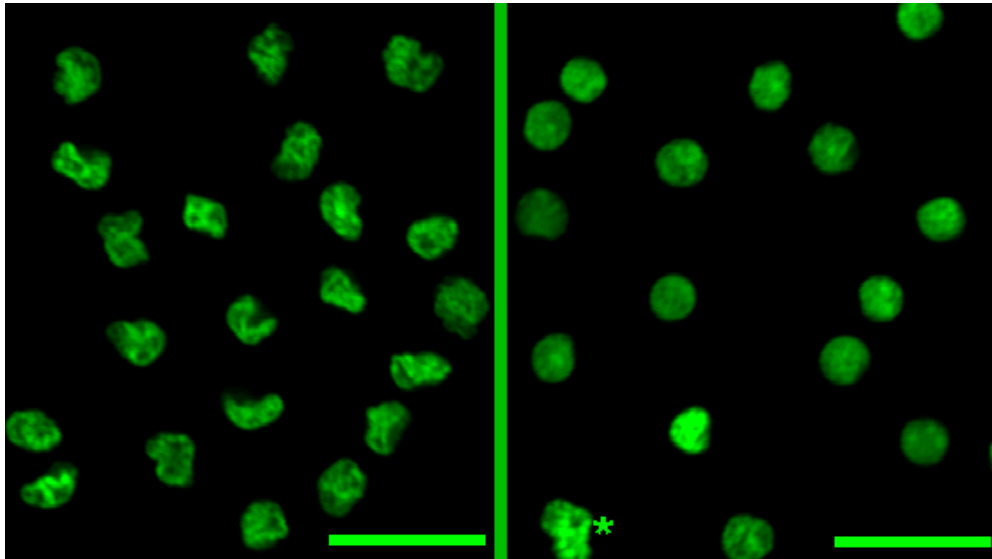


Figura IV.9 – Análisis al microscopio laser confocal de células clasificadas en flujo provenientes de las regiones R5 (izquierda) y R6 (derecha). Pueden apreciarse los núcleos fluorescentes bajo tinción con VDG. Si bien no se observan diferencias notorias en relación al tamaño nuclear entre las dos fracciones, resulta evidente la forma más irregular de los núcleos en la fracción R5. La mayoría de los núcleos provenientes de R6 son redondeados, salvo alguna excepción indicada en este ejemplo con un asterisco. Las barras representan 20 μm .

Los resultados obtenidos hasta este punto permitieron afirmar que se estaban pudiendo diferenciar al menos 2 tipos celulares dentro de la población 2C de células testiculares, simplemente en base a sus diferencias en un parámetro básico como lo es la dispersión lateral o SSC-H, sin necesidad de empleo de marcas específicas (por ej. anticuerpos conjugados).

IV.5. Determinación de identidad de subpoblaciones dentro de población 2C.

Con el fin de determinar la identidad de las dos subpoblaciones distinguibles dentro de la población 2C en base a su complejidad interna, se procedió a ensayar anticuerpos comerciales específicos para diversos tipos celulares de interés.

Particularmente interesaba localizar dentro de los perfiles citométricos a las espermatogonias, representantes de la fase premeiótica de la línea germinal masculina, así como a las células de Sertoli y de Leydig por ser células somáticas de gran importancia para la producción de los gametos masculinos.

En primer lugar, el funcionamiento y especificidad de los diferentes anticuerpos adquiridos se evaluó mediante ensayos de inmunohistoquímica sobre criosecciones de testículo (ver ejemplo en Anexos VII.2). Esto constituía un paso importante, dado que hemos comprobado que para varios anticuerpos reportados en la literatura y disponibles comercialmente, el patrón de expresión reportado no es exacto (por ejemplo, los reportan

como específicos de una determinada etapa, pero hemos comprobado que también dan señal, aunque sea minoritaria, en otros tipos celulares del testículo).

A continuación, se procedió a la realización de ensayos inmunocitoquímicos. Los primeros ensayos fueron realizados sobre la población 2C clasificada entera (alto + bajo SSC-H) para poner a punto las condiciones de incubación y tener una primera aproximación a la determinación de identidades. De los anticuerpos ensayados, los que dieron mejores resultados fueron anti-vimentina (Sertoli, Leydig), anti-HSD3 β 1 (Leydig), anti-EpCAM (línea germinal). La visualización del resultado de las inmunolocalizaciones en paralelo a la puesta en evidencia de la granularidad por microscopía DIC, permitió avanzar en el tema de las identidades celulares. Las figuras IV.10 y IV.11 ejemplifican los resultados obtenidos.

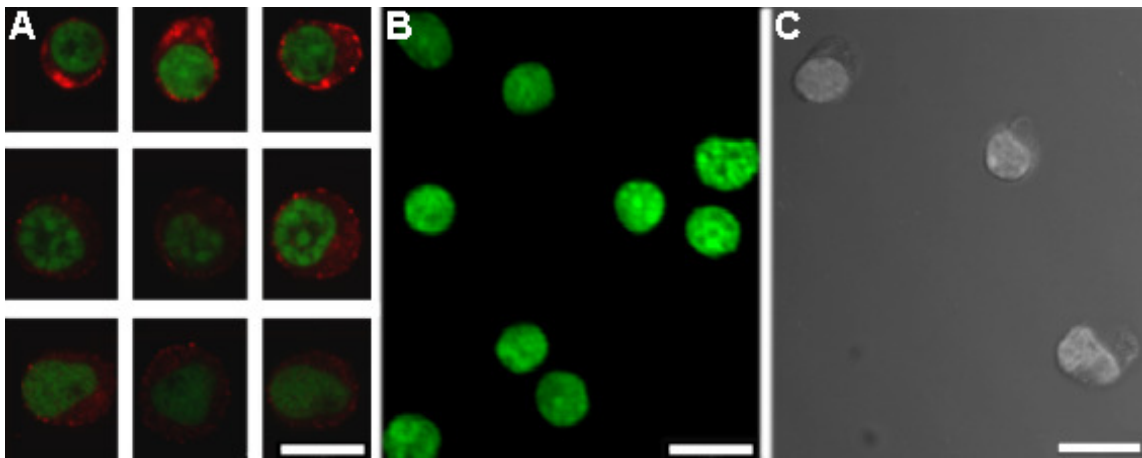


Figura IV.10 – A) Aspecto de células 2C que resultaron positivas para el anticuerpo anti-EpCAM. En rojo se observa la señal del anticuerpo. Los núcleos aparecen teñidos con VDG. **B y C)** A efectos comparativos, se presentan los resultados obtenidos anteriormente (Figuras IV.8 inferior y IV.9 derecha) en relación al aspecto celular y de la cromatina para la población 2C de bajo SSC-H (región R6 de figura IV.7). Obsérvense las similitudes en los tamaños y formas celulares, así como en el aspecto de la cromatina. Las barras representan 10 μ m.

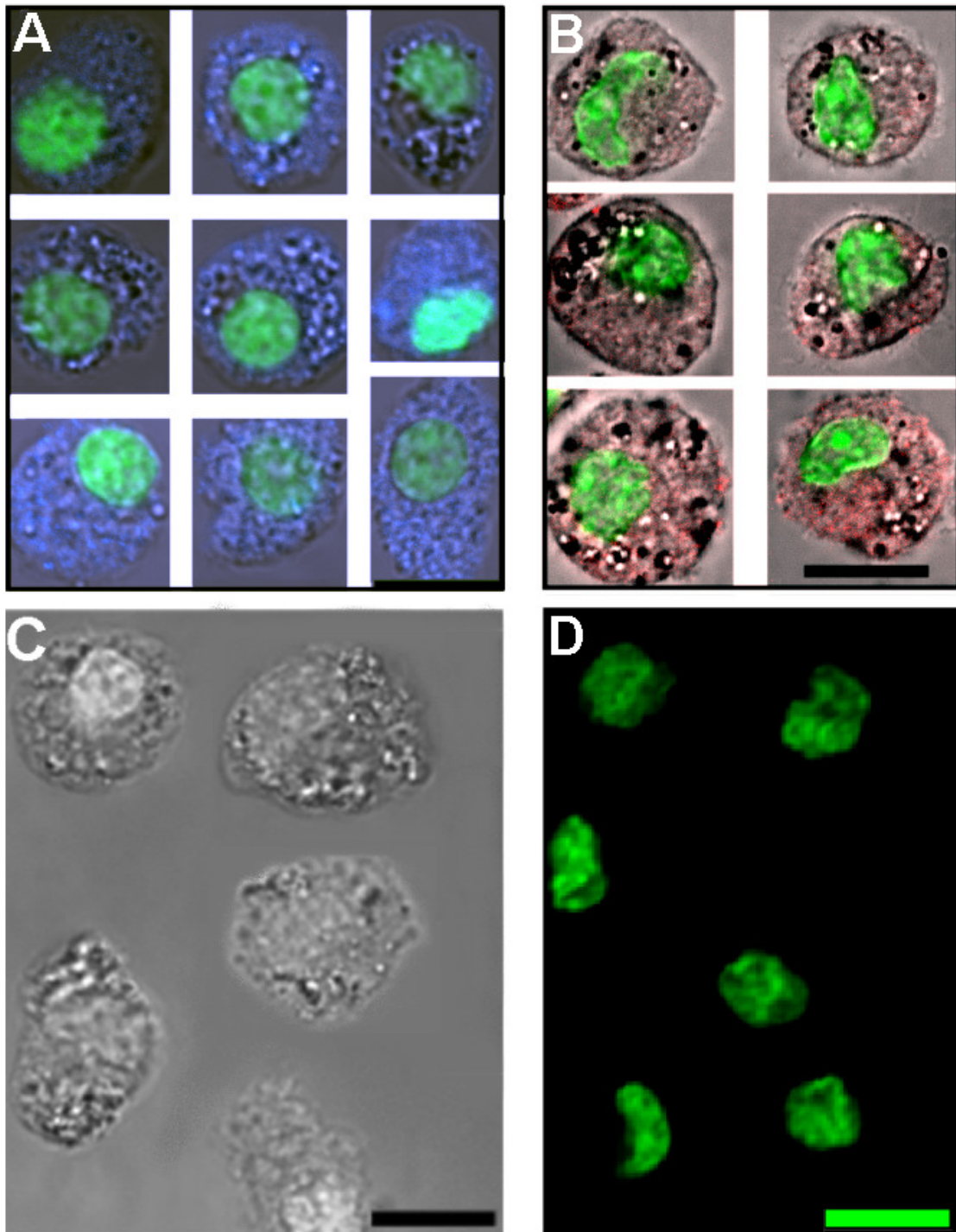


Figura IV.11 – A y B) Aspecto de células 2C que resultaron positivas para el anticuerpo anti-vimentina, en azul (A) y anti-HSD3β1, en rojo (B). **C y D)** A efectos comparativos, se presentan los resultados obtenidos anteriormente para la población 2C de alto SSC-H (Figuras IV.8 superior y IV.9 izquierda), que corresponden a la región R5 de figura IV.7, de alto SSC-H. Resulta evidente la similitud en las células registradas en ambos ensayos, en especial en relación a su granularidad citoplásmica. Las barras representan 10 μm en todos los casos.

Los resultados obtenidos en esta primera aproximación sugieren que las espermatogonias estarían más probablemente en la fracción de baja complejidad R6 (Figura IV.10), lo cual concuerda con su normalmente baja granularidad. Esto se deduce porque las únicas células de línea germinal presentes en la fracción 2C clasificada eran espermatogonias (por la edad de los animales utilizados, no había aún espermatocitos II).

Por otra parte, en base a estos resultados primarios las células de elevada granularidad de la región R5 corresponderían a las células somáticas de testículo conocidas por ser positivas para vimentina: células de Sertoli y/o Leydig (Rodríguez *et al.*, 2004) (Figura IV.11.A). La conexión entre las células de elevada granularidad y las células intersticiales de Leydig fue adicionalmente establecida mediante inmunolocalizaciones empleando un anticuerpo específico para Leydig (anti-HSD3 β 1) (Figura IV.11.B).

Sin embargo, dado que estas comparaciones se realizaron sobre la población 2C entera, era necesario repetir los ensayos sobre las fracciones R5 y R6 clasificadas separadamente. Para ello se clasificaron según lo descrito anteriormente en sección Materiales y Métodos, y se realizaron los ensayos inmunocitoquímicos correspondientes. Los resultados se ejemplifican en las figuras IV.12 y IV.13.

Los resultados obtenidos con el anticuerpo anti-EpCAM sobre la fracción 2C de bajo SSC-H indicaron la presencia de espermatogonias en esta fracción (Figura IV.12). Sin embargo, no se obtuvo un marcado masivo de las células clasificadas provenientes de esta región (*gate* R6). Cuando se observó bajo microscopía DIC se evidenció que muchas de estas células habían perdido al menos parte de su citoplasma, lo cual explicaría la ausencia de marca masiva por parte de este anticuerpo dirigido contra un antígeno de superficie. Cabe destacar que las inmunolocalizaciones que involucraron a este anticuerpo se realizaron en total ausencia de tratamiento permeabilizante. A pesar de ello, obtuvimos el mismo resultado en todos los ensayos realizados sobre esta fracción con este anticuerpo. Adicionalmente, podría ocurrir que los distintos tipos de espermatogonias presentaran niveles diferentes de marcación con EpCAM (no estudiado). Por otra parte, es probable que en la fracción de bajo SSC-H se estén clasificando, además de las espermatogonias, otros tipos celulares del testículo que sean negativos a la marcación con EpCAM por tratarse de células somáticas (ej. células mioideas, fibroblastos, etc.), pero que no correspondan a células de Sertoli y Leydig, que son de alta complejidad. Es importante destacar que en la fracción conteniendo las células purificadas de alto SSC-H (R5), no se detectaron señales positivas a la marcación con EpCAM (no mostrado).

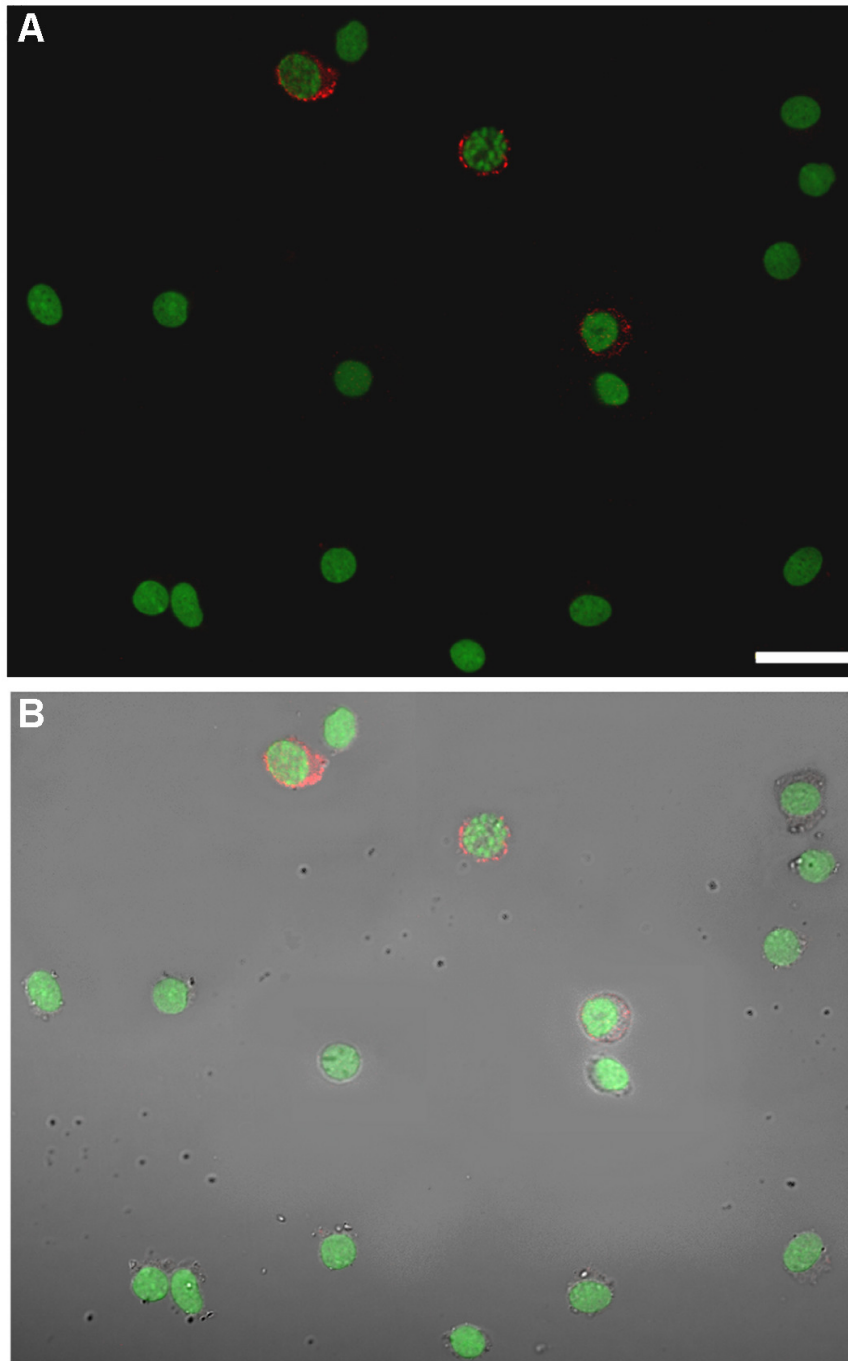


Figura IV.12 – Ensayos inmunocitoquímicos sobre la fracción celular de contenido de ADN 2C y baja complejidad interna o SSC-H clasificada mediante CMF a partir del anteriormente mostrado gate R6 (figura IV.7). **A)** Resultado obtenido al ensayar sobre esta fracción el anticuerpo de superficie anti-EpCAM. Puede observarse la inmunomarcación de una minoría de células en el campo. **B)** La observación del mismo campo bajo DIC revela que al menos buena parte de las células no positivas para EpCAM lucen menos íntegras, careciendo de al menos parte de su citoplasma. La barra corresponde a 20 μm

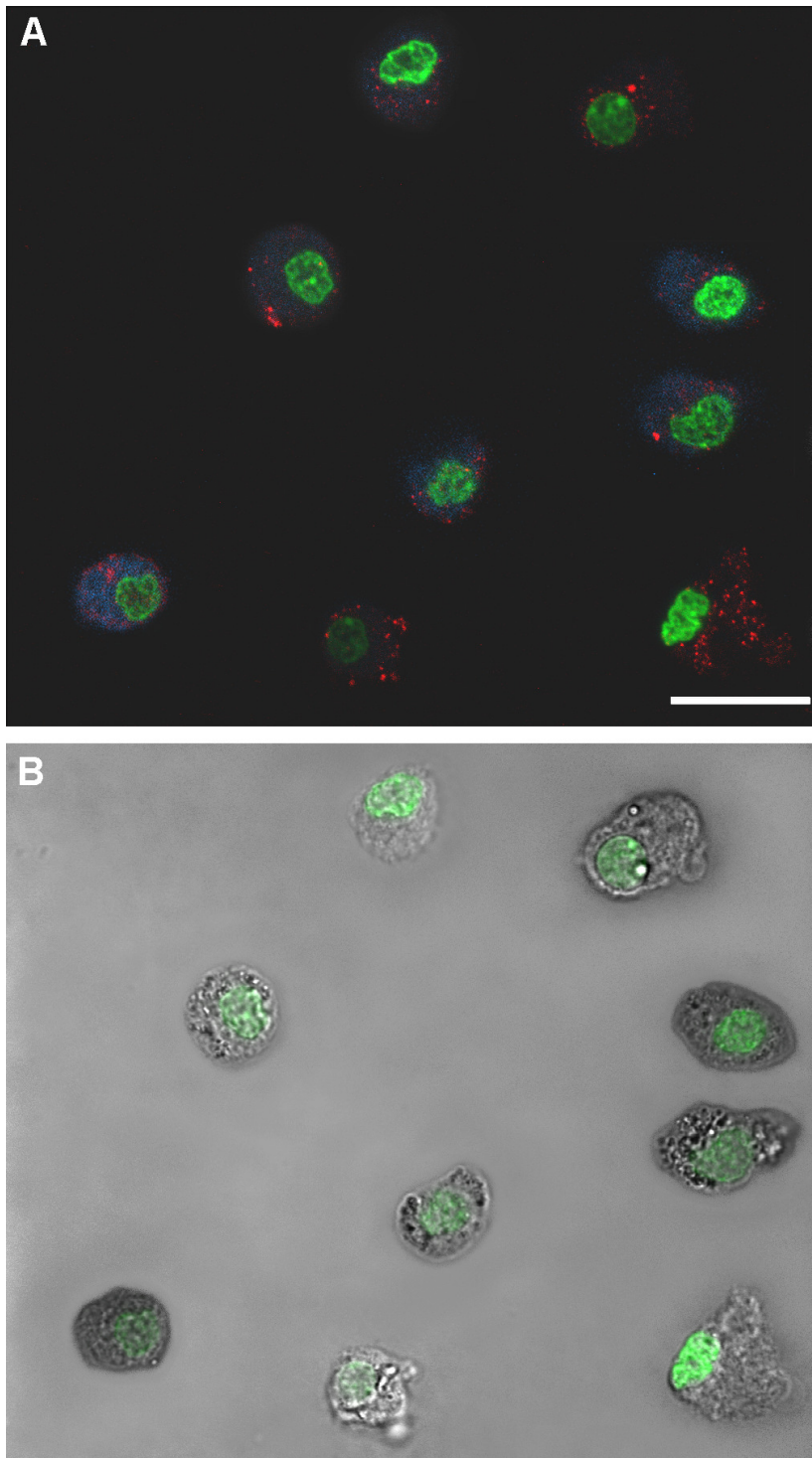


Figura IV.13 – Ensayos inmunocitoquímicos sobre la fracción celular 2C de alta complejidad interna o SSC-H clasificada en flujo a partir del gate R5 mostrado en la figura IV.7. **A)** Resultado obtenido al ensayar sobre esta fracción los anticuerpos anti-vimentina (rojo) y anti-HSD3 β 1 (azul). Puede observarse la inmunomarcación de vimentina en todas las células del campo, mientras que HSD3 β 1 se detecta sólo en algunas de ellas. **B)** La observación del mismo campo bajo DIC confirma la elevada granularidad de esta fracción. La barra corresponde a 20 μ m.

Los resultados obtenidos con los anticuerpos anti-vimentina y anti-HSD3 β 1 sobre la fracción 2C de alto SSC-H evidenciaron la presencia de células somáticas testiculares en esta fracción (Figura IV.13). En esta figura puede observarse que las células con marca para HSD3 β 1 poseen citoplasmas más redondeados que aquellas negativas para esta proteína (marcadas solo en rojo en la figura). Los citoplasmas de estas últimas tienen aspecto más irregular y coinciden con lo esperado para las células de Sertoli con sus profusas prolongaciones que, al quedar en suspensión, podrían retraerse parcialmente.

Por otra parte, el análisis de numerosos perfiles de ratones juveniles de diversas edades nos condujo a la detección de una tercera población de contenido de ADN 2C, ubicada a la derecha de las regiones R5 y R6 en los gráficos de puntos SSC-H vs FL1-Area, a la cual llamados población "2C derecha". Pudimos comprobar que la presencia/ausencia de dicha población era dependiente de la edad del espécimen estudiado, estando sólo presente en los individuos de 19 dpp en adelante. Por ejemplo, en la figura IV.14 se muestran los perfiles resultantes de analizar en flujo suspensiones celulares testiculares de ratones juveniles de 11 y 23 dpp teñidas con VDG. En el perfil del ratón de 23 dpp se observa la presencia de la población "2C derecha", que sin embargo está ausente en el ratón más inmaduro.

Tal dependencia del grado de desarrollo o avance de la espermatogénesis, inducía a pensar que esta tercera población estaba compuesta por estadios espermatogénicos ausentes en los ratones más inmaduros, o aún muy poco abundantes como para definir una población en los perfiles. Con el fin de corroborarlo, se clasificaron en flujo eventos provenientes de la región "2C derecha" (señalada con flecha en la figura IV.14) para su posterior caracterización. Se realizaron ensayos inmunocitoquímicos sobre esta población empleando un anticuerpo dirigido contra TRA98, antígeno nuclear específico de células germinales. Los resultados obtenidos se ejemplifican en la figura IV.15, donde la fluorescencia verde de los núcleos corresponde al VDG y la roja a la inmunomarcación. Puede comprobarse que esta población contiene mayormente dinucleados de espermátidas redondas y células germinales con aspecto de espermátocitos que, dado su contenido de ADN (2C), únicamente pueden ser espermátocitos secundarios (el color amarillo corresponde a colocación del VDG y el anticuerpo); también se encontraron minoritariamente algunas células somáticas de elevada granularidad citoplásmica (negativas a la tinción con el anticuerpo). Este resultado explica en gran parte el motivo de la ausencia de esta población en los especímenes de <19 dpp, que generalmente aún no poseen espermátocitos II ni espermátidas redondas.

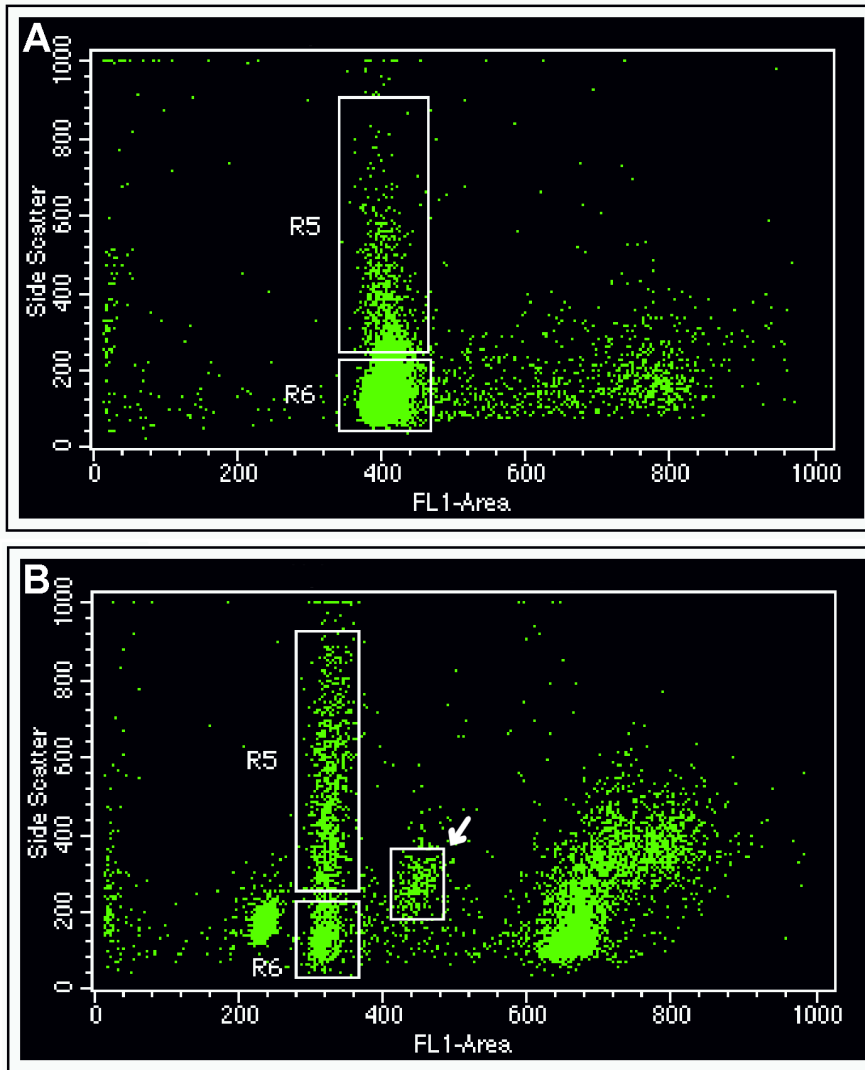


Figura IV.14 – Comparación de perfiles citométricos resultantes del análisis de suspensiones celulares testiculares de ratones juveniles de 11 dpp (A) y 23 dpp (B) teñidas con VDG. Se presentan gráficos de puntos indicando la dispersión lateral (SSC-H) vs intensidad de fluorescencia del VDG (FL1-Area). En el perfil del ratón de 23 dpp se observa la presencia de una población (flecha) ubicada a la derecha de las regiones R5 y R6 (“2C derecha”), que está ausente en el ratón más inmaduro.

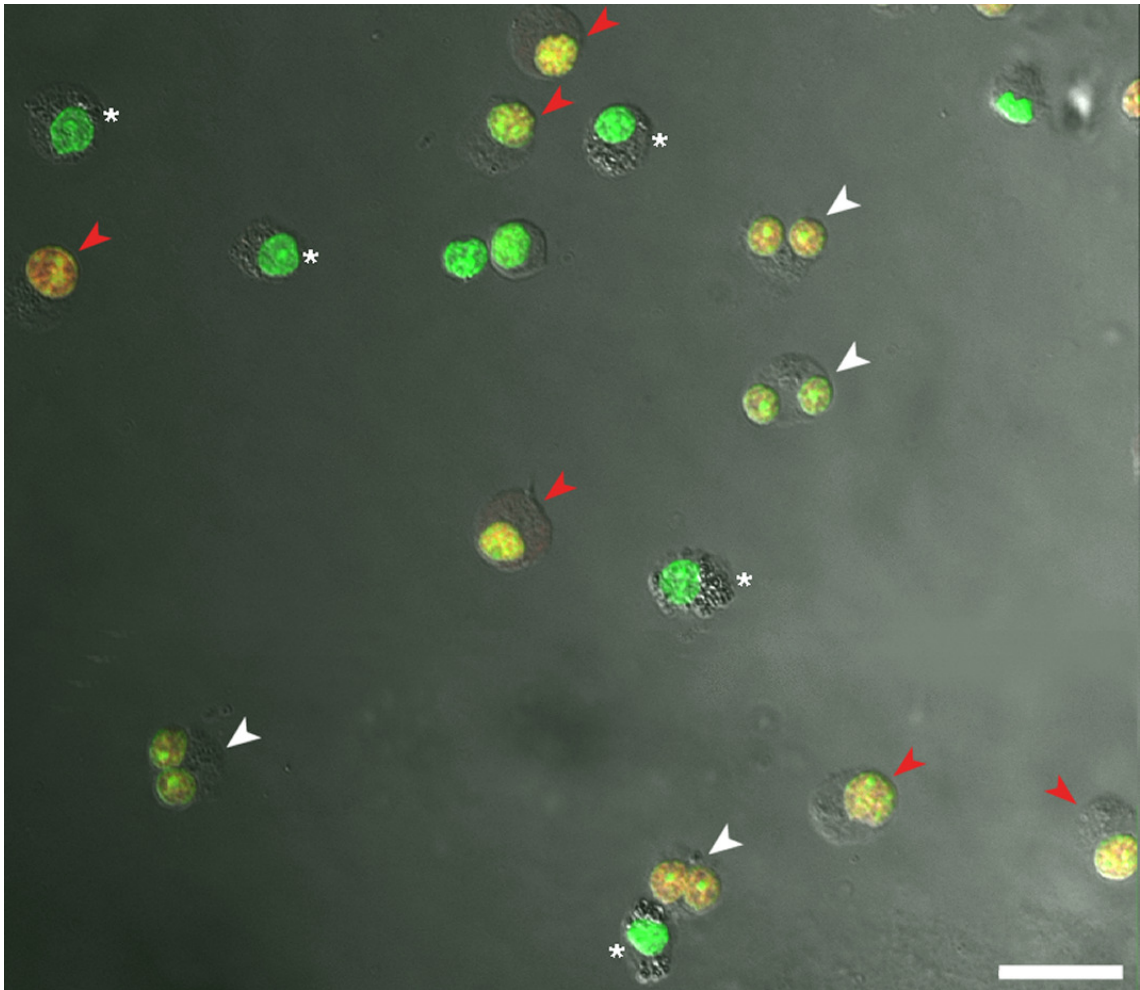


Figura IV.15 – Ensayos inmunocitoquímicos sobre la población 2C derecha clasificada en flujo. Se empleó un anticuerpo dirigido contra el antígeno nuclear específico de células germinales TRA98. La fluorescencia verde de los núcleos corresponde al VDG y la roja a la inmunolocalización. Puede observarse que esta población contiene mayormente dinucleados de espermatidas redondas (flechas blancas); células germinales con aspecto de espermatocitos que, dado su contenido de ADN, corresponderían a espermatocitos secundarios (flechas rojas); y algunas células somáticas de elevada granularidad citoplásmica (asteriscos). La barra corresponde a 20 μm .

IV.6. Ensayos confirmatorios de identidades mediante qRT-PCR.

Con el fin de validar los datos obtenidos en los ensayos inmunocitoquímicos sobre las fracciones 2C de alto y bajo SSC-H, se seleccionaron genes representativos de los tipos celulares identificados para realizar la confirmación de identidades mediante qRT-PCR en triplicados biológicos. Como se mencionó en la sección *Materiales y métodos*, los genes elegidos fueron *Dazl* para espermatogonias, *Cyp17a1* para Leydig, y *Cldn11* para células de Sertoli. *Ppp1cc* (proteína fosfatasa 1, subunidad catalítica, isozima gama) fue elegido como gen *housekeeping* normalizador (Warrington *et al.*, 2000; Erslund *et al.*, 2012), y las espermátidas redondas fueron empleadas como población externa (gen específico utilizado: protamina 1, *Prm1*), también en triplicado.

La eficiencia de amplificación de los juegos de iniciadores diseñados fue evaluada mediante el análisis de la curva estándar obtenida para diluciones seriadas del ARN total de testículo, y fue superior al 90% para los genes mencionados. El método utilizado para la cuantificación relativa fue $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Como se mencionó anteriormente, *Cyp17a1* es un gen que, a nivel testicular, se expresa exclusivamente en las células de Leydig (Ge *et al.*, 2005), mientras que *Dazl* codifica para un factor promotor de la meiosis en células de línea germinal (Schrans-Stassen *et al.*, 2001; Lin *et al.*, 2008). Para los genes *Cyp17a1* y *Dazl* se obtuvieron diferencias significativas en los niveles de expresión entre las poblaciones de alto y bajo SSC-H ($p=0.0169$ y $p=0.0485$ respectivamente). Los resultados obtenidos se muestran en la figura IV.16. Como puede observarse, la población de elevada complejidad interna presentó altos niveles de expresión de *Cyp17a1*, mientras que en la población de bajo SSC-H no se detectó expresión de este gen. Por otra parte, el gen *Dazl* mostró niveles de expresión significativamente mayores en la población de bajo SSC-H en comparación con la de alto SSC-H.

En consecuencia, los resultados obtenidos permiten confirmar la presencia de células de Leydig en la población de alto SSC-H, y de espermatogonias en la de bajo SSC-H.

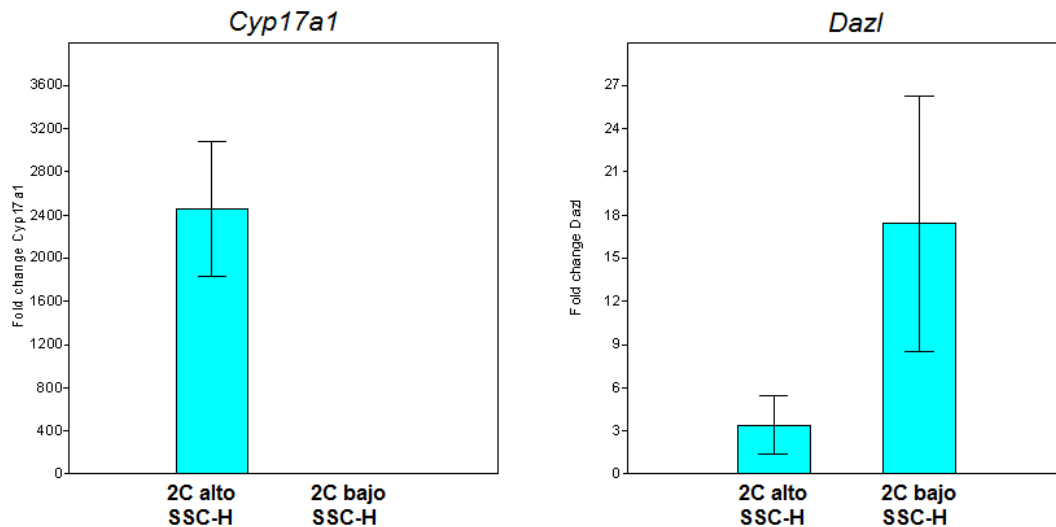


Figura IV.16 – Representación gráfica de los resultados obtenidos en ensayos comparativos de qRT-PCRs partiendo de las poblaciones 2C de elevada (A) y baja (B) complejidad interna, y empleando los iniciadores para *Cyp17a1* (izquierda) y para *Dazl* (derecha). Para la población de alto SSC-H se evidenciaron altos niveles de expresión de *Cyp17a1*, mientras que en la población de bajo SSC-H no se detectó expresión de este gen. Por otra parte, el gen *Dazl* mostró niveles de expresión significativamente mayores en la población de bajo SSC-H en comparación con la de alto SSC-H.

En relación a los ensayos empleando los iniciadores para *Cldn11*, no pudo detectarse transcritto en ninguna de las dos poblaciones. La presencia de las células de Sertoli en la población de alto SSC-H, puesta en evidencia en los ensayos inmunocitoquímicos, no pudo confirmarse mediante detección de este transcritto específico (Stammler *et al.*, 2016) cuyos niveles de expresión serían bajos, al menos en ciertas etapas del desarrollo posnatal, como se discutirá más adelante.

IV.7. Optimización de protocolo de preparación de suspensiones celulares.

Los estudios de inmunocitoquímica con el anticuerpo EpCAM pusieron en evidencia que buena parte de las espermatogonias resultaba con el citoplasma dañado en los protocolos de purificación celular (ver Figura IV.12), en tanto los demás tipos celulares lucían con muy buena integridad. Concluimos entonces que debido a su ubicación cerca de la lámina basal de los túbulos seminíferos, las espermatogonias serían más difíciles de liberar y poner en suspensión, lo que podría provocar la rotura de parte de sus citoplasmas al liberarse. Con el fin de optimizar las condiciones para estudiar la población de células testiculares con contenido de ADN 2C, se realizaron una serie de ensayos modificando la

preparación de las suspensiones celulares en busca de una mejor representación e integridad de las espermatogonias en la suspensión final.

Con este objetivo se incorporó al protocolo una breve incubación con la enzima disgregadora colagenasa, previo al procesamiento en Medimachine, como se describe en la sección III.2.b de Materiales y Métodos. Cabe destacar que, en comparación con los clásicos protocolos de disgregación enzimática de testículo, el tratamiento enzimático introducido fue sumamente moderado tanto en concentración como en tiempo de exposición a la enzima.

En la tabla IV.2 y figura IV.16 se presentan los resultados obtenidos con el protocolo combinado enzimático-mecánico en comparación con el método exclusivamente mecánico descrito de III.2.a. Como puede apreciarse la modificación introducida condujo a una moderadamente mayor representación de las células 2C en la suspensión, por lo cual la colagenasa en las condiciones aplicadas podría estar ayudando a la liberación de las células 2C más basales dentro del epitelio seminífero. Sin embargo, esta observación sólo sería una tendencia dado que las diferencias registradas no fueron estadísticamente significativas ($p=0,08$).

El dato más interesante que surge de esta comparación es que el leve tratamiento enzimático previo a la disgregación mecánica favoreció la reproducibilidad de un experimento a otro, habiéndose obtenido desvíos estándar mucho menores en comparación con la condición exclusivamente mecánica (ver desvíos estándar en tabla IV.2). Esta observación resultó muy útil para el grupo de trabajo, ya que la elevada reproducibilidad es una de las fortalezas buscadas en los métodos preparativos de suspensiones celulares de testículo.

Con respecto al análisis cualitativo (mejorar la integridad celular de las espermatogonias), nos proponemos realizar en breve los ensayos mediante el anticuerpo EpCAM a partir del nuevo protocolo en presencia de colagenasa, de modo de ver si se observa una mayor proporción de células teñidas con este anticuerpo. Desafortunadamente, estos nuevos estudios no se pudieron completar debido a la imposibilidad de continuar las clasificaciones en flujo ya que el *sorter FACSVantage* quedó fuera de servicio. Sin embargo, un nuevo equipo quedará instalado en el IIBCE en los próximos meses, lo que nos permitirá avanzar en estos estudios.

Tabla IV.2 - Porcentajes relativos de la población de células testiculares de contenido de ADN 2C de ratón, en suspensiones celulares preparadas con método exclusivamente mecánico (2C sin colagenasa) y mediante método combinado (2C con colagenasa).

	2C sin colagenasa*	2C con colagenasa*
% del gate	59,7 ± 13,0	77,2 ± 0,8
% del total	35,6 ± 8,9	56,6 ± 0,2

*Los datos presentados corresponden a suspensiones de células testiculares de ratones juveniles de 14 dpp, donde una parte del material se preparó por el método mecánico y otra parte por el método combinado a los efectos de poder comparar con menor incidencia de la variabilidad biológica individual las metodologías empleadas.

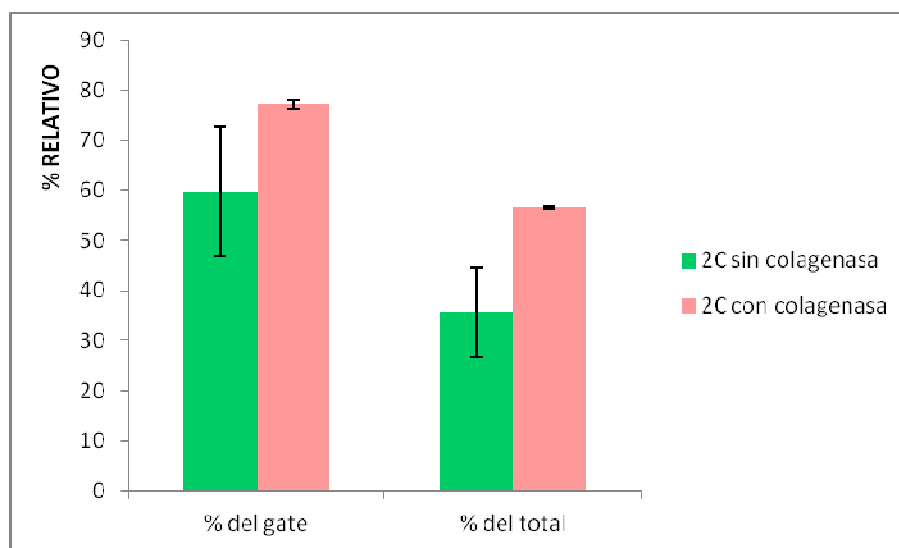


Figura IV.16 – Comparación de liberación de células 2C de epitelio seminífero en presencia (rosa) y ausencia (verde) de tratamiento con colagenasa. Se presentan los resultados obtenidos en relación al total de células de la suspensión y en relación al gate combinado resultante de la exclusión de dobletes y restos celulares. Obsérvese la diferencia en los desvíos estándar obtenidos para las condiciones comparadas, indicativa de la superior reproducibilidad del método combinado enzimático-mecánico.

V. DISCUSIÓN Y PERSPECTIVAS

V.1. Vybrant Dye Cycle Green aplicado a suspensiones celulares de testículo de ratón.

Cuando se emplean fluorocromos de unión al ADN para visualizar diferentes poblaciones celulares mediante CMF, debe tomarse en cuenta que los eventos visualizados en los perfiles citométricos pueden corresponder a células enteras, células dañadas o simplemente a núcleos desnudos. La elección del fluorocromo resulta de este modo fundamental si se desea obtener células enteras, ya que sólo los fluorocromos vitales son capaces de penetrar las membranas plasmáticas de células intactas.

La caracterización de la utilidad del fluorocromo vital VDG para análisis de suspensiones celulares testiculares fue el objetivo primordial del presente trabajo. Tres de las características que buscábamos en un nuevo fluorocromo a incorporar a los proyectos del equipo de investigación eran las siguientes: a) que fuera vital, asegurando la tinción de las células mejor preservadas luego de la disgregación del tejido; b) que permitiese discriminar diferentes poblaciones celulares dentro de la heterogénea mezcla de células testiculares, ayudando a sortear la dificultad que representa dicha heterogeneidad para estudios moleculares posteriores; c) que fuera excitable con un laser preferentemente no *uv*.

Acerca del primer punto, el objetivo de obtener las células mejor preservadas era esencial para nosotros, ya que el principal interés de nuestro grupo es realizar aportes al conocimiento molecular de la espermatogénesis, en particular de la meiosis, por lo cual es necesaria una elevada calidad del material de partida para obtener datos representativos y llegar a conclusiones acertadas sobre lo que ocurre *in vivo*. En tal sentido, el uso de colorantes no vitales como por ejemplo el IP, requiere que las células presenten al menos un pequeño daño en su membrana, lo cual seguramente redunde en una peor calidad de preservación de moléculas de corta duración (ej. ARN).

La posibilidad de discriminar la mayor cantidad de poblaciones diferentes nos permitiría obtener poblaciones aisladas representativas de diferentes tipos celulares y/o estadios espermatogénicos para su posterior caracterización molecular. Todo conjunto de eventos que defina en los gráficos de puntos citométricos una población, es pasible de clasificación. Una vez establecida su identidad, podrá procederse a clasificaciones de carácter preparativo, ayudando de este modo a superar el gran problema de la heterogeneidad testicular, la mayor dificultad natural para el estudio de la espermatogénesis. Cabe recordar que sólo algunos estadios espermatogénicos (principalmente espermátocitos P y espermátidas redondas) pueden obtenerse mediante los métodos clásicos de elutriación y Staptut, por lo cual la CMF ha representado para el área una herramienta sumamente poderosa que nuestro grupo busca potenciar.

Con respecto al último punto, la preferencia de un fluorocromo excitable a mayores longitudes de onda se debe a 2 motivos principales: por ser de menor energía provocan

menos daños a nivel celular (nuevamente, esto nos parece fundamental dada la sensibilidad de las técnicas moleculares a ser aplicadas *downstream* y las conclusiones a las que se arribará), y además porque un laser *uv* no siempre está disponible en los *sorters* a diferencia de un laser azul, por ejemplo, que suele ser el laser que viene en la configuración básica de todos los *sorters*. En consecuencia, el desarrollar un protocolo de *sorting* que empleara un laser azul permitiría que nuestros desarrollos fueran aplicables en un mayor número de laboratorios.

El VDG cumple con estas tres características, ya que es un fluorocromo vital de unión exclusiva al ADN, excitable con laser azul que mostró un potencial discriminatorio interesante sobre material proveniente de testículo:

- En los perfiles citométricos pueden apreciarse varias poblaciones celulares bien definidas que pueden ser objeto de clasificación, incluyendo poblaciones celulares escasas y de altísimo interés, como se discutirá más adelante.
- La homogeneidad de las fracciones clasificadas en primera instancia, a partir de las regiones correspondientes a espermátidas redondas y espermatoцитos primarios en profase media a avanzada (P/D), fue muy buena.
- La calidad *post-sorting* del material clasificado mencionado en el punto anterior fue altamente satisfactoria pudiendo apreciarse la presencia de citoplasmas intactos, de fundamental importancia para estudios transcriptómicos *downstream*, por ejemplo.

Todo lo antedicho, posicionaba al VDG en estos primeros estudios como un fluorocromo prometedor para estudios analíticos y preparativos relacionados con la espermatogénesis.

La composición del epitelio seminífero varía cuali y cuantitativamente durante el establecimiento de la primera onda espermatogénica. Cuando el objetivo es purificar un estadio espermatogénico en particular, deben tomarse en cuenta las características de los especímenes biológicos de partida en busca de optimizar el proceso para obtener el material purificado requerido en cantidad suficiente y empleando el menor número de animales posible.

En especímenes juveniles la primera onda espermatogénica aún no está completa, y la identidad del estadio más avanzado presente en su epitelio seminífero depende de cuán inmaduro sea el individuo. En consecuencia, individuos juveniles están naturalmente enriquecidos en estadios más tempranos y a diferentes edades presentarán diferentes porcentajes relativos de los diversos estadios de interés. Otro factor a considerar es que cuanto más inmaduro es un individuo, menor es el tamaño de sus gónadas, y se requerirá de un mayor número de ejemplares para obtener suficiente material de partida.

En el caso del ratón, se ha descrito que el inicio de la meiosis es a los 10 días posparto (dpp), y de la espermiogénesis a los 20 dpp, alcanzándose a detectar los primeros espermatozoides a los 27 dpp (Malkov *et al.*, 1998). Vale destacar que son comunes las variaciones individuales, ya que existen factores que inciden como ser el tamaño de la camada: a mayor número de crías, aumenta la posibilidad de que ocurra un retraso leve en el proceso.

Dado que durante el establecimiento de la primera onda espermatogénica el enriquecimiento relativo en los diversos estadios va variando, era de interés visualizar el desarrollo posnatal de testículo de ratón bajo esta tinción e identificar los rangos de edades óptimos para la clasificación en flujo de diversos estadios de interés. Los análisis en flujo de suspensiones celulares testiculares de ratones juveniles permitieron determinar los porcentajes relativos de las poblaciones C, 2C y 4C y el momento del desarrollo posnatal óptimo para maximizar la presencia de células de interés y minimizar eventuales elementos contaminantes. Esta determinación resulta de vital importancia por dos motivos principales:

- Para evitar clasificaciones en flujo en las cuales la población de interés caiga en la categoría de “evento raro” debido a su escasa presencia en la suspensión ($\leq 5\%$).
- Para evitar o al menos minimizar las posibilidades de contaminación del material clasificado con otros eventos no deseados. Cabe recordar que aún pequeñas contaminaciones pueden conducir a conclusiones erróneas, cuando el material clasificado es posteriormente empleado en estudios moleculares de elevada sensibilidad.

V.2. Vybrant Dye Cycle Green y su poder de discriminación dentro de la población 4C de testículo de ratón.

Como se mencionó en el capítulo introductorio, en trabajos anteriores del equipo de investigación realizados en cobayo (*Cavia porcellus*) se había logrado identificar en los perfiles citométricos bajo tinción con IP poblaciones celulares correspondientes a diferentes estadios de primera profase meiótica: espermatoцитos primarios en etapas tempranas (L/Z) y espermatoцитos primarios en etapas medias/avanzadas (P/D). Sin embargo, a pesar de los intentos realizados, tal discriminación no había podido reproducirse en otros modelos biológicos como rata y ratón empleando el mismo protocolo. Tal diferencia fue atribuída a los inusualmente prolongados estadios de L/Z en cobayo, que en rata y ratón son extremadamente breves y en consecuencia pobremente representados a nivel del epitelio seminífero en comparación con el cobayo (Rodríguez Casuriaga *et al.*, 2011).

Sin embargo, dado que el equipo de investigación tenía mucho interés en iniciar estudios transcriptómicos en ratón, modelo mamífero por excelencia, se insistió en lograr tal

discriminación empleando otros fluorocromos, como el VDG (además del interés en que dicho colorante a utilizar fuera vital, por los motivos expuestos más arriba).

Dentro de nuestros objetivos, era de especial importancia poder efectuar estudios en células en profase meiótica temprana ya que, como mencionáramos en la Introducción, es en esta etapa cuando los cromosomas homólogos se reconocen, alinean y comienza el ensamblaje de los CS, estructura fundamental para los intercambios de material genético de origen materno y paterno que ocurrirán en P, y para que el proceso de meiosis ocurra sin errores. Como hemos mencionado además, la alteración de estos procesos se relaciona en muchos casos con infertilidad y otras patologías como cáncer testicular, por lo cual su conocimiento al nivel molecular presenta también interés biomédico (Hann *et al.*, 2011; Tvrda *et al.*, 2015).

Tal como fue presentado en la sección IV.2 de Resultados, la preparación de suspensiones celulares de testículo y su posterior exposición a VDG condujeron a análisis citométricos en flujo en los cuales podían observarse dos poblaciones celulares bien definidas dentro de la población de células de contenido de ADN 4C, de modo similar a lo que se había observado en cobayo. Cuando dichas poblaciones fueron clasificadas para su posterior caracterización, pudo comprobarse que efectivamente correspondían a diferentes subestadios meióticos, obteniendo por un lado los espermatoцитos I tempranos L/Z y por otro los medios a avanzados P/D. La pureza de cada una de las fracciones fue superior al 98%, de acuerdo con las observaciones microscópicas de los preparados inmunoteñidos con el anticuerpo contra elemento lateral de CS.

En resumen, se pudo visualizar en los perfiles citométricos del ratón dos poblaciones celulares separadas y bien definidas correspondientes a subetapas de primera profase meiótica, bajo una tinción vital que nos aseguraba una buena calidad del material clasificado para estudios posteriores. Esto representa un avance altamente significativo con respecto a los métodos de purificación de poblaciones de células meióticas preexistentes.

V.3. Utilidad del parámetro SSC-H para ubicación inequívoca de la población 2C de células testiculares.

En términos de análisis citométrico en flujo, la dispersión lateral de la luz es sinónimo de complejidad interna o granularidad. Uno de los resultados más llamativos de esta tesis fue el relacionado con la puesta en evidencia de una subpoblación de células testiculares de muy alta complejidad (SSC-H).

Cabe destacar la ausencia de reportes previos de esta característica en células provenientes de testículo analizadas por CMF, y resaltar su utilidad para la ubicación

inequívoca de la población 2C de células testiculares en los perfiles citométricos. A modo de ejemplo, nuestro equipo de investigación ha incorporado este conocimiento a su conjunto de herramientas a la hora de enfrentarse a perfiles resultantes del análisis en flujo de material testicular.

En los casos en que existen dudas sobre las identidades de las poblaciones celulares dentro de los gráficos de puntos, la observación del grado de dispersión lateral o SSC-H indica la ubicación de la población 2C y permite asignar el resto de las identidades en relación a esta población. No es infrecuente que el grado esperado de avance de la espermatogénesis en juveniles no se corresponda con el realmente encontrado a nivel del epitelio seminífero, por lo cual el disponer de un parámetro adicional para ubicar a las diferentes poblaciones en los perfiles citométricos cuando éstos difieren de lo esperado, resulta de gran utilidad.

Adicionalmente, la clasificación en flujo de esta población 2C de elevado SSC-H y su posterior análisis microscópico bajo contraste DIC, constituye un modo adicional de chequear el nivel de pureza real alcanzado en clasificadores nuevos o desconocidos, o que han pasado por una reparación o service reciente.

Por todo lo antedicho, consideramos que la incorporación de esta información también será de utilidad a otros grupos de investigación en el área.

V.4. SSC-H como parámetro discriminador de células somáticas y células de línea germinal en la población 2C.

De las presentes en suspensiones de células testiculares, la población 2C es la más heterogénea, ya que no solamente contiene diferentes estadios de células germinales - espermatogonias y espermatoцитos secundarios – sino también células somáticas de testículo.

De las células somáticas testiculares, se destacan por sus funciones vinculadas a la formación de gametos masculinos las células de Sertoli a nivel del epitelio seminífero, y las de Leydig a nivel intersticial. La determinación de la ubicación en los gráficos de puntos de estos tipos celulares dentro de la población 2C en base a su granularidad o complejidad, abre la posibilidad de clasificarlos sin necesidad de emplear marcas específicas.

El no requerimiento de marcas específicas como anticuerpos, resulta sumamente ventajoso por varios motivos:

- permite un abordaje mucho más directo, acortando los tiempos y procedimientos previos al *sorting*;
- resulta más económico, prescindiendo de la necesidad de adquirir anticuerpos;

- no siempre existen anticuerpos de superficie disponibles para el tipo celular de interés, por lo cual no depender de ello es una ventaja no menor.
- es altamente preferible para posteriores estudios *in vivo*, ya que en los casos de empleo de marcas específicas, las mismas permanecerán unidas al material clasificado, pudiendo resultar contraproducente en el organismo vivo que recibe el material clasificado.

En resumen, el parámetro SSC-H es suficiente para obtener separadamente por un lado estas células somáticas, y por otro una fracción conteniendo células germinales de contenido de ADN 2C.

De las células somáticas pudo confirmarse la presencia de las Leydig en la fracción de alto SSC-H, mediante detección de transcritos para un gen de expresión específica de este tipo celular en testículo (*Cyp17a1*). Sin embargo, no se pudo confirmar la presencia de las células de Sertoli en la fracción de elevada complejidad. Probablemente este resultado se deba a que los niveles de expresión del gen elegido (*Cldn11*) son relativamente bajos (datos de transcriptómica del grupo apoyan esta hipótesis), dificultando su detección en los qPCR. No obstante, el aspecto de dichas células (tamaño, aspecto nuclear, irregularidad del citoplasma), sumado al hecho de que son reactivas para el anticuerpo anti-vimentina pero negativas para uno específico de células de Leydig, nos permite tener un nivel de certeza razonable de que se trata de las células de Sertoli). Si bien también las células mioideas peritubulares contienen esta proteína en sus filamentos intermedios, su menor tamaño, forma fusiforme y escasa granularidad no coinciden con lo observado para la fracción de alto SSC-H. Por otra parte, tanto para las células de Sertoli como para las de Leydig, la elevada granularidad podría explicarse por su contenido de vacuolas citoplasmáticas y gotas lipídicas, respectivamente (Chamindrani *et al.*, 2001). Resulta interesante que la totalidad de las células de alta complejidad se purificaron en la fracción de alto SSC-H, no identificándose células de este tipo en la fracción de baja dispersión lateral.

Dentro de las células germinales 2C, las espermatogonias son numéricamente mayoritarias dada la brevedad de la meiosis II. Además, los espermatocitos II fueron ubicados dentro de la población 2C derecha (ver figura IV.15), por lo cual la población 2C izquierda de bajo SSC-H correspondería mayormente a espermatogonias. Este resultado pudo también ser confirmado mediante qPCR, empleando el juego de iniciadores para *Dazl*.

Otro hallazgo interesante es que en los individuos de mayor edad, que ya han iniciado la espermiogénesis, pudimos identificar los dinucleados de espermátidas (contaminante de la población 2C) en la población 2C derecha, no observándose dinucleados en las fracciones de alto y bajo SSC-H. Ello nos permite saber que dichas

fracciones se encuentran libres de contaminación, constituyendo un dato relevante a la hora de efectuar estudios de expresión génica y atribuir transcritos a los distintos tipos celulares.

Este es el primer estudio en el cual se evaluó la complejidad celular como parámetro para purificar subpoblaciones dentro de la población 2C, y representa un avance significativo en este sentido. Por ejemplo, en un primer proyecto de transcriptómica de la espermatogénesis la población 2C entera clasificada mediante CMF fue empleada como referencia premeiótica. De haber contado con el conocimiento generado en esta tesis, la población 2C de elevada complejidad interna (correspondiente a células somáticas) podría haberse excluido del *gate* seleccionado para la purificación, y se hubiese contado con una referencia premeiótica más exacta.

Del mismo modo, si el interés estuviese centrado en la purificación de las células somáticas referidas para posteriores estudios moleculares, es posible marcar una ventana de clasificación que excluya a las células germinales.

En conclusión, en este estudio se ha podido demostrar la gran utilidad de un parámetro citométrico básico como lo es el SSC-H, no sólo en la interpretación de los análisis de suspensiones celulares de testículo, sino también para obtener poblaciones más puras a partir de la heterogénea mezcla inicial.

V.5. Aportes metodológicos en relación a la preparación de suspensiones celulares de testículo.

Al finalizar el desarrollo experimental de esta tesis se realizaron algunos aportes relevantes en relación al protocolo de preparación de suspensiones celulares de testículo y su posterior tinción con VDG:

- Se determinó que la incorporación de un breve tratamiento con la enzima disgregadora colagenasa a baja concentración previo a la disgregación mecánica otorga al protocolo una mayor reproducibilidad. La diferencia en los valores de desvío estándar observada en ausencia y presencia de colagenasa fueron llamativas.
- En estas disgregaciones combinadas enzimático-mecánicas se observó también una tendencia al aumento en el porcentaje relativo de la población de células 2C, si bien las diferencias con las disgregaciones exclusivamente mecánicas no alcanzaron niveles de significancia estadística. Esta tendencia puede interpretarse como una mejor liberación de las células contenidas en el compartimento basal del epitelio seminífero (probablemente espermatogonias) debido a la acción enzimática.

- Se optimizaron las condiciones de incubación con el fluorocromo VDG, incorporando agitación moderada y continua de los tubos de muestra a una temperatura levemente menor que la sugerida por el fabricante (35°C en lugar de 37°C), seguida por su posterior mantenimiento a TA controlada (25°C) y protegido de la luz hasta el momento del análisis. La incorporación de agitación continua durante la incubación asegura el contacto de todas las células de la suspensión con el fluorocromo, fundamental para los posteriores análisis.

Al momento de desarrollo de estas mejoras, los análisis de perfiles de juveniles de diferentes edades realizados durante esta tesis ya se encontraban muy avanzados. Además, posteriormente el analizador y clasificador FACSVantage del IIBCE quedó fuera de servicio, por lo cual no fue posible repetir los análisis y clasificaciones partiendo de material preparado con este protocolo. Sin embargo, estas optimizaciones han sido incorporadas por el grupo de investigación y serán empleadas sobre material testicular, apenas se instale el nuevo clasificador en el SECIF. Estamos convencidos que estas optimizaciones serán de gran utilidad en el futuro, en particular para la clasificación de espermatogonias. Probablemente, algunas de las optimizaciones logradas puedan extenderse a otro tipo de material.

V.6. Desarrollos originados y potenciales aplicaciones a futuro, a partir de los resultados de este trabajo.

El fluorocromo vital VDG, específico de ADN, ha evidenciado un gran poder discriminatorio de distintos estadios meióticos y de células somáticas presentes en suspensiones celulares de testículo de ratón. Cabe destacar que esto fue realizado sin la marcación adicional con anticuerpos y requiere únicamente para su análisis de un laser 488nm, detección de fluorescencia en verde (FL1), SSC-H y FSC-H, items que son básicos en la configuración de cualquier citómetro, lo cual convierte a esta técnica en altamente reproducible. Como se mencionó anteriormente, el hallazgo de una población celular de elevado SSC-H dentro de la población 2C fue de los más llamativos de esta tesis. El parámetro de dispersión lateral (SSC-H) aporta de esta manera muy valiosa información que permite, entre otras, la ubicación inequívoca de la población 2C de células testiculares. A su vez la combinación de VDG con SSC-H permite clasificar células somáticas 2C de espermatogonias. También se demostró, por primera vez, la detección de estadios L/Z en ratón con el uso de esta técnica, lo cuál permitió un primer estudio de transcriptómica de esta fracción celular en ratón. Otra ventaja del método desarrollado por el equipo de trabajo

es que se evita el uso de ADNasa y tripsina, que favorecen la degradación de macromoléculas (Rodríguez-Casuriaga *et al.*, 2013).

La información generada durante el desarrollo de la presente tesis resultó de enorme utilidad para su aplicación a proyectos del grupo de investigación:

- En el marco de un proyecto financiado por ANII de transcriptómica de la espermatogénesis en ratón, las clasificaciones de las poblaciones profase meiótica temprana (L/Z), media/avanzada (P/D) y posmeiosis (ER) fueron realizadas bajo tinción con VDG del modo descrito en esta tesis. Este proyecto estuvo centrado en las fluctuaciones del transcriptoma codificante de proteínas a lo largo de la espermatogénesis, y condujo al primer estudio publicado de este tipo en incluir una población de alta pureza L/Z (Da Cruz *et al.*, 2016).

- Más recientemente, en el marco de un segundo proyecto de transcriptómica del grupo también financiado por ANII, hemos vuelto a aplicar los criterios de marcado de ventanas de clasificación para las 3 poblaciones nombradas en el punto anterior. Este segundo proyecto se encuentra aún en curso y, a diferencia del anterior, está centrado en el estudio de la expresión de los ARNs no codificantes largos (lncRNAs) durante la espermatogénesis. La calidad del material de partida nos permite predecir que se podrán hacer aportes relevantes también en esta área del conocimiento.

- Como se mencionó anteriormente, el hallazgo de una población celular de elevado SSC-H dentro de la población 2C fue de los más llamativos de esta tesis. A raíz de esta observación, y en el marco de una tesis doctoral del grupo que ha dado inicio recientemente, se continúa indagando sobre esta población y sobre el mecanismo de acción del VDG (es importante destacar que el mecanismo molecular de acción de este fluorocromo es aún desconocido). Los avances logrados hasta el momento son realmente prometedores, habiéndose, por ejemplo, logrado discriminar en los perfiles citométricos una población de células testiculares de extrema pureza, que corresponderían a las células de Leydig. Esto podrá permitir, en el futuro, realizar estudios de expresión génica muy precisos en células de Leydig altamente puras, y profundizar a nivel molecular en los mecanismos de producción de testosterona. Por otra parte, la discriminación de subpoblaciones dentro de la población 2C y en particular la purificación de células de Leydig, es actualmente objeto de un trabajo en elaboración a enviarse para su publicación a la revista internacional arbitrada *Cytometry A*.

Algunas limitaciones y aspectos a mejorar que enfrentamos son: maximizar la integridad celular para optimizar el rendimiento y calidad de los ARNs. Actualmente, continuamos investigando para intentar distinguir un mayor número de tipos celulares para su purificación. El ensayo de nuevos fluorocromos disponibles en el mercado sobre dichas suspensiones es uno de los intereses del grupo. La posibilidad de optimizar la purificación y preservación de algunos tipos celulares (especialmente espermatogonias y células somáticas) podría tener importantes aplicaciones biomédicas (ej.: desarrollo de sistemas de cultivo *in vitro*). Como se mencionó anteriormente, por razones de causa mayor, no se pudieron completar los estudios comparativos en presencia y ausencia de colagenasa, relativos a la integridad celular y viabilidad de las espermatogonias. Es probable que la incorporación de un suave tratamiento enzimático como el acá propuesto, tenga también consecuencias positivas en la integridad de las espermatogonias, al ayudar a distender el tejido antes del procesamiento mecánico. Existe gran interés del grupo en completar estos estudios apenas se retomen las actividades en el SECIF, con miras a eventuales desarrollos de interés biomédico.

En este sentido, es importante mencionar que el grupo de investigación ha iniciado recientemente un proyecto de colaboración con un laboratorio de Argentina para intentar purificar distintos tipos de espermatogonias a partir de biopsias de pacientes humanos. Estas muestras incluyen material de individuos infértiles con distinto grado de desarrollo de la espermatogénesis, o con cáncer testicular. El objetivo de esta colaboración es la obtención de espermatogonias en estado de alta pureza para tratamientos de infertilidad humana, o para preservación de la fertilidad (en el caso de pacientes oncológicos). Si bien se deberá seguir ahondando en los métodos de purificación, esta tesis sirvió como puntapié inicial al permitir, por primera vez, la discriminación de las espermatogonias dentro de la población 2C, y nos alienta a intentar seguir avanzando en esa dirección.

VI REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Almstrup JM, Nielsen JE, Hansen MA, Tanaka M, Skakkeæk NE, Leffers H. Analysis of cell-type specific gene expression during mouse spermatogenesis. *Biol Reprod* 70, 1751-1761. 2004.

Anderson R, Schaible K, Heasman J, Wylie C. Expression of the homophilic adhesion molecule, Ep-CAM, in the mammalian germ line. *J Reprod Fert* 116, 379–384. 1999.

Aravindan GR, Ravindranath N, Gopalakrishnan K, Moudgal NR. DNA flow-cytometric analysis of testicular germ cell populations of the bonnet monkey (*Macaca radiata*) as a function of sexual maturity. *J Reprod Fertil* 89, 397-406.1990.

Aslam H, Schneiders A, Perret M, Weinbauer GF, Hodges JK. Quantitative assessment of testicular germ cell production and kinematic and morphometric parameters of ejaculated spermatozoa in the grey lemur, *Microcebus murinus*. *Reproduction* 123, 323-332. 2002.

Bellvé AR, Cavicchia JC , Clarke FM, O'brien DA, Bhatnagar YM, Martin DYM. Spermatogenic cells of the prepuberal mouse. Isolation and Morphological Characterization. *J Cell Biol* 74, 68-75. 1977.

Bergmann M. Physiology of Spermatogenesis. En: *Andrology for the Clinician*. (Eds. Wolf-Bernhard Schill, Frank Comhaire, Timothy B. Hargreave) Springer, Berlin-Heidelberg. pp 272-281. 2006.

Blanchard Y, Lavault MT, Quernee D, Le Lannou D, Lobel B, Lescoat D. Preparation of spermatogenic cell populations at specific stages of differentiation in the human. *Mol Reprod Dev* 30, 275-282. 1991.

Blottner S, Schön J, Roelants H. Apoptosis is not the cause of seasonal testicular involution in roe deer. *Cell Tissue Res* 327, 615-624. 2007.

Buonomo, SB, Clyne, RK, Fuchs, J, Loidl, J, Uhlmann, F, Nasmyth, K. Disjunction of homologous chromosomes in meiosis I depends on proteolytic cleavage of the meiotic cohesin Rec8 by separin. *Cell*, 103, 387-398. 2000.

Chamindrani Mendis-Handagama SML, Siril Ariyaratne HB. Differentiation of the Adult Leydig Cell Population in the Postnatal Testis. *Biol Reprod* 65, 660–671. 2001.

Chemes H. Cambios testiculares asociados al comienzo y desarrollo de la pubertad humana. En: *Fisiopatología de la pubertad* (Eds. Bergadá C, Rivarola M) Ergón, Buenos Aires pp 49-67. 1986.

Chemes H. Leydig Cell development in humans. En: *The Leydig cell*. (Eds. Payne A, Hardy M, Russell L) Cache River Press, Viena pp 175-202. 1996.

Clausen OP, Abyholm T. Deoxyribonucleic acid flow cytometry of germ cells in the investigation of male infertility. *Fertil Steril* 34, 369-374.1980.

Clausen OP, Parvinen M, Kirkhus B. Stage-related variations in DNA fluorescence distribution during rat spermatogenic cycle measured by flow cytometry. *Cytometry* 2, 421-425. 1982.

Clermont Y. Cycle of the seminiferous epithelium of the guinea pig. A method for identification of the stages. *Fertil Steril* 11, 563-573. 1960.

Clermont Y. The cycle of the seminiferous epithelium in man. *Am J Anat* 112, 35–51. 1963.

Cohen PE, Pollack SE, Pollard JW. Genetic analysis of chromosome pairing, recombination and cell cycle control during first meiotic prophase in mammals. *Endocr Rev* 27, 398-426. 2006.

Cordelli ET, Eleuteri P, Leter G, Rescia M, Spano M. Flow cytometry applications in the evaluation of sperm quality: semen analysis, sperm function and DNA integrity. *Contraception* 72, 273-279. 2005.

Da Cruz I, Rodríguez-Casuriaga R, Santiñaque FF, Farías J, Curti G, Capoano CA, Folle GA, Benavente R, Sotelo-Silveira JR, Geisinger A. Transcriptome analysis of highly purified mouse spermatogenic cell populations: gene expression signatures switch from meiotic-to postmeiotic-related processes at pachytene stage. *BMC Genomics* 17, 294-312. 2016.

De Iuliis GN, Thomson LK, Mitchell LA, Finnie JM, Koppers AJ, Hedges A, Nixon Brett, Aitken RJ. DNA damage in human spermatozoa is highly correlated with the efficiency of chromatin remodeling and the formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, a marker of oxidative stress. *Biol Reprod* 81, 517-524. 2009.

De Robertis EDP, De Robertis EMF. Biología celular y molecular. 10^a Ed. El Ateneo, Buenos Aires. 613p.1981.

De Rooij DG. Stem cells in the testis. *Int J Exp Pathol* 79, 67-80. 1998.

De Rooij DG. Proliferation and differentiation of spermatogonial stem cells. *Reproduction* 121, 347-354. 2001.

Druart X, Gatti JL, Huet S, Dacheux JL, Humblot P. Hypotonic resistance of boar spermatozoa: sperm subpopulations and relationship with epididymal maturation and fertility. *Reproduction* 137, 205-213. 2009.

- Dym M. The male reproductive system. En: *Histology*. (Eds. Weiss, L , Greep RO), 4a Ed., McGraw-Hill, New York pp 979-1038. 1977.
- Ersland KM, Christoforou A, Stansberg C, Espeseth T, Mattheisen M, et al. Gene-based analysis of regionally enriched cortical genes in GWAS data sets of cognitive traits and psychiatric disorders. *PLoS One* 7, e31687. 2012.
- Esponda P, Giménez-Martín G. The attachment of the synaptonemal complex to the nuclearenvelope. *Chromosoma* 38, 405-417. 1972.
- Evenson DP, Kasperson K, Wixon RL. Analysis of sperm DNA fragmentation using flow cytometry and other techniques. *Soc Reprod Fertil Suppl* 65, 93-113. 2007.
- Falciatori I, Borsellino G, Haliassos N, Boitani C, Corallini S, Battistini L, Bernardi G, Stefanini M, Vicini E. Identification and enrichment of spermatogonial stem cells displaying side-population phenotype in immature mouse testis. *FASEB J* 18, 376-378. 2004.
- Fallahi M, Getun IV, Wu ZK, Bois PR. A Global Expression Switch Marks Pachytene Initiation during Mouse Male Meiosis. *Genes* 1, 469–483. 2010.
- Fawcett DW. The mammalian spermatozoon. *Dev Biol* 44, 394- 436. 1975. (a)
- Fawcett DW. Ultrastructure and function of the Sertoli cell. En: *Handbook of Physiology*. (Eds. Hamilton D, Greep R) Williams and Wilkins Co, Baltimore, USA pp 51-55. 1975. (b)
- Franke W, Grund C, Schmid E. Intermediate-sized filaments present in Sertoli cells are of the vimentin type. *Eur J Cell Biol* 19, 269-75. 1979
- Fraune J, Schramm S, Alsheimer M, Benavente R. The mammalian synaptonemal complex: proteincomponents, assembly and role in meiotic recombination. *Exp Cell Res* 318, 1340-1346. 2012.
- Fujita K, Ohta H, Tsujimura A, Takao T, Miyagawa Y, Takada S, Matsumiya K, Wakayama T, Okuyama A. Transplantation of spermatogonial stem cells isolated from leukemic mice restores fertility without inducing leukemia. *J Clin Invest* 115, 1855-1860. 2005.
- Fujita K, Tsujimura A, Miyagawa Y, Kiuchi H, Matsuoka Y, Takao T, Takada S, Nonomura N, Okuyama A. Isolation of germ cells from leukemia and lymphoma cells in a human in vitro model: potential clinical application for restoring human fertility after anticancer therapy. *Cancer Res* 66,11166-11171. 2006.

- França LR, Hess RA, Dufour JM, Hofmann MC, Griswold MD. The Sertoli cell: one hundred fifty years of beauty and plasticity. *Andrology* 4, 189–212. 2017.
- Garner DL. Flow cytometric sexing of mammalian sperm. *Theriogenology* 65, 943-957. 2006.
- Garrido N, Meseguer M, Remohi J, Pellicer A, Simón C. Flow cytometry in human reproductive biology. *Gynec Endocrinol* 16, 505-521. 2002.
- Gassei K, Schlatt S. Testicular morphogenesis: comparison of in vivo and in vitro models to study male gonadal development. *Annals NY Acad Sci* 1120, 152-167. 2007.
- Gaysinskaya V, Soh IY, Van der Heijden GW, Bortvin A. Optimized Flow Cytometry Isolation of Murine Spermatocytes. *Cytometry Part A* 85A, 556-565. 2014.
- Ge RS, Dong Q, Sottas CM, Papadopoulos V, Zirkin BR, Hardy MP. In search of rat stem Leydig cells: Identification, isolation, and lineage-specific development. *Dev Biol* 103, 2719–2724. 2005.
- Ge RS, Hardy MP. Regulation of Leydig cells during pubertal development. En: *The Leydig Cell in Health and Disease* (Eds. Payne AH, Hardy MP), Humana Press, Totowa. pp 55-70. 2007.
- Geisinger A. Spermatogenesis in Mammals: a very peculiar cell differentiation process. En: *Cell Differentiation Research Developments*. (Ed. Ivanova LB) Nova, New York pp 97–123. 2008.
- Geisinger A, Rodriguez-Casuriaga R. Flow cytometry for gene expression studies in mammalian spermatogenesis. *Cytog Genome Res* 128, 46-56. 2010.
- Grogan WM, Farnham WF, Sabau JM. DNA analysis and sorting of viable mouse testis cells. *J Histochem Cytochem* 29, 738-746. 1981.
- Hamano KI. Sex preselection in bovine by separation of X- and Y-chromosome bearing spermatozoa. *J Reprod Dev* 53, 27-38. 2007.
- Handel MA, Schimenti JC. Genetics of mammalian meiosis: regulation, dynamics and impact on fertility. *Nature Rev Genetics* 11 2, 124-136. 2010.
- Hann MC, Lau PE, Tempest HG. Meiotic recombination and male infertility: from basic science to clinical reality? *Asian J Andrology* 13, 212–218. 2011.
- Harper L, Golubovskaya I, Cande WZ. A bouquet of chromosomes. *J Cell Sci* 117, 4025- 4032. 2004.

- Hermann BP, Sukhwani M, Simorangkir DR, Chu T, Plant TM, Orwig KE. Molecular dissection of the male germ cell lineage identifies putative spermatogonial stem cells in rhesus macaques. *Human Reprod* 24, 1704-1716. 2009.
- Hess R, Franca L. Structure of the Sertoli Cell. En: *Sertoli Cell Biology* (Eds. Skinner M, Griswodd M) Elsevier Academic Press, USA pp 19-42. 2005.
- Hittmair A, Rogatsch H, Offner F, Feichtinger H, Ofner D, Mikuz G. Deoxyribonucleic acid flow cytometry and semiquantitative histology of spermatogenesis: a comparative study. *Fertil Steril* 58,1040-1045.1992.
- Hittmair A, Rogatsch H, Mikuz G, Feichtinger H. Quantification of spermatogenesis by dual-parameter flow cytometry. *Fertil Steril* 61, 746-750.1994.
- Holdcraft RW, Braun RE. Androgen receptor function is required in Sertoli cells for the terminal differentiation of haploid spermatids. *Development* 131,459-467. 2004.
- Honaramooz A, Megee SO, Rathi R, Dobrinski I. Building a testis: formation of functional testis tissue after transplantation of isolated porcine (*Sus scrofa*) testis cells. *Biol Reprod* 76, 43-47. 2007.
- Huckins C. The spermatogonial stem cell population in adult rats. I. Their morphology, proliferation and maturation. *Anat Rec* 169, 533-57.1971.
- Hunt PA. Meiosis in mammals: recombination, non-disjunction and the environment. *Biochem Soc Transactions* 34, 574-577. 2006.
- Iguchi N, Tobias JW, Hecht NB. Expression profiling reveals meiotic male germ cell mRNAs that are translationally up- and down-regulated. *PNAS USA* 103, 7712-7717. 2006.
- Jagetia GC, Jyothi P, Krishnamurthy H. Flow cytometric evaluation of the effect of various doses of vindesine sulphate on mouse spermatogenesis. *Reprod Toxicol* 11, 867-874. 1997.
- Jagetia GC, Krishnamurthy H, Jyothi P. Evaluation of cytotoxic effects of different doses of vinblastine on mouse spermatogenesis by flow cytometry. *Toxicology* 112, 227-236. 1996.
- Janca FC, Jost LK, Evenson DP. Mouse testicular and sperm cell development characterized from birth to adulthood by dual parameter flow cytometry. *Biol Reprod* 34, 613-623. 1986.

- Jeyaraj DA, Grossman G, Weaver C, Petrus P. Dynamics of testicular germ cell proliferation in normal mice and transgenic mice overexpressing rat androgen-binding protein: a flow cytometric evaluation. *Biol Reprod* 66, 877-885 2002.
- Jyothi P, Jagetia GC, Krishnamurthy H. Evaluation of teniposide (VM-26)-induced toxicity on mouse spermatogenesis by flow cytometry. *Toxicology* 163, 163-174 2001.
- Kleckner N. Chiasma formation: chromatin/axis interplay and the role(s) of the synaptonemal complex. *Chromosoma* 115, 175-194. 2006.
- Klinfelter GR, Hall PF, Ewing LL. Effect of luteinizing hormone deprivation in situ on steroidogenesis of rat leydig cells. Purified by a multistep procedure. *Biol Reprod*, 769-783. 1987.
- Kostakopoulos A, Georgoulakis J, Deliveliotis C, Spanakis G, Filippidou A, Tamvakis N. Deoxyribonucleic acid flow cytometry in the assessment of spermatogenesis. *J Urol* 158, 79-81. 1997.
- Lam DMK, Furrer R, Bruce WR. The separation, physical characterization and differentiation kinetics and spermatogonial cells of the mouse. *PNAS USA* 65, 192-199. 1970.
- Lassalle B, Bastos H, Louis JP, Riou L, Testart J, Dutrillaux B, Fouchet P, Allemand I. Side Population' cells in adult mouse testis express Bcrp1 gene and are enriched in spermatogonia and germinal stem cells. *Development* 131, 479-487. 2004.
- Leblond CP, Clermont Y. Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. *Annals NY Acad Science* 55, 548-573. 1952.
- Lee JH, Oh JH, Lee JH, Kim MR, Min CK. Evaluation of in vitro spermatogenesis using poly (D,L-lactic-co-glycolic acid) (PLGA)-based macroporous biodegradable scaffolds. *J Tissue Eng Regen Med* 5,130-137. 2011.
- Lin Y, Gill ME, Koubova J, Page DC. Germ cell-intrinsic and -extrinsic factors govern meiotic initiation in mouse embryos. *Science* 322,1685-1687. 2008.
- Lok D, Weenk D, De Rooij DG. Morphology, Proliferation, and Differentiation of Undifferentiated Spermatogonia in the Chinese Hamster and the Ram. *Anat Rec* 203, 83-99. 1982.
- Malkov M, Fisher Y, Don J. Developmental schedule of the postnatal rat testis determined by flow cytometry. *Biol Reprod* 59, 84-92. 1998.

- Maratou K, Forster T, Costa Y, Taggart M, Speed RM, Ireland J, Teague P, Roy D, Cook HJ. Expression profiling of the developing testis in wild-type and Dazl knockout mice. *Mol Reprod Dev* 67, 26-54. 2004.
- Marchesi DE, Feng HL, Hershlag A. Current assessment of sperm DNA integrity. *Arch Androl* 53, 239-247. 2007.
- Martínez-Pastor F, Fernández-Santos MR, del Olmo E, Domínguez-Rebolledo AE, Estes MC, Montoro V, Garde JJ. Mitochondrial activity and forward scatter vary in necrotic, apoptotic and membrane-intact spermatozoan subpopulations. *Reprod Fertil Dev* 20, 547-556. 2008.
- Mays-Hoopes LL., Bolen J, Riggs AD, Singer-Sam, J. Preparation of spermatogonia, spermatocytes, and round spermatids for analysis of gene expression using fluorescence-activated cell sorting. *Biol Reprod* 53, 1003-1011. 1995.
- Meistrich ML, Bruce WR, Clermont Y. Cellular composition of fractions of mouse testis cells following velocity sedimentation separation. *Exp Cell Res* 79, 213-227. 1973.
- Meistrich ML. Separation of spermatogenic cells and nuclei from rodent testes. *Methods Cell Biol* 15, 15-54. 1977.
- Meistrich ML, Lake S, Steinmetz LL, Gledhill BL. Flow cytometry of DNA in mouse sperm and testis nuclei. *Mutat Res* 49, 383-396. 1978.
- Miller WL y Auchus RJ. The molecular biology, biochemistry, and physiology of 530 human steroidogenesis and its disorders. *Endocr Rev* 1, 81-151. 2011.
- Mital P, Hinton BT, Dufour JM. The blood-testis and blood-epididymis barriers are more than just their tight junctions. *Biol Reprod* 84, 851-858. 2011.
- Moens PB, Marcon E, Shore JS, Kochakpour N, Spyropoulos B. Initiation and resolution of interhomolog connections: crossover and non-crossover sites along mouse synaptonemal complexes. *J Cell Sci* 120, 1017-1027. 2007.
- Moses MJ. Synaptonemal complex. *Annu Rev Genet* 2, 363-412. 1968.
- Neubauer K, Jewgenow K, Blottner S, Wildt DE, Pukazhenthil BS. Quantity rather than quality in teratospermic males: a histomorphometric and flow cytometric evaluation of spermatogenesis in the domestic cat (*Felis catus*). *Biol Reprod* 71, 1517-1524. 2004.

- Nicander, L. An electron microscopical study of cell contacts in the seminiferous tubules of some animals. *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie* 83, 375-397. 1967.
- Nicander L, Plöen L. Fine structure of spermatogonia and primary spermatocytes in rabbits. *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie* 99, 221-234. 1969.
- Oakberg, EF. Spermatogonial stem-cell renewal in the mouse. *Anat Rec* 169, 515-532. 1971.
- Ojha P, Dhar JD, Dwivedi AK, Singh RL, Gupta G. Rat testicular germ cell type(s) targeted by anti-spermatogenic agents in vivo and their recovery on withdrawal of treatment-a flow cytometric study. *Anim Reprod Sci* 103,135-148. 2008.
- Orth JM, Gunsalus GM, Lamperti AA. Evidence from Sertoli cell-depleted rats indicates that spermatid numbers in adults depends on numbers of Sertoli cells produced during perinatal development. *Endocrinology* 122, 787-794. 1988.
- Oskam IC, Ropstad E, Andersen Berg K, Fredriksen B, Larsen S, Dahl E, Andresen O. Testicular germ cell development in relation to 5alpha-androstenone levels in pubertal entire male pigs. *Theriogenology* 69, 967-976. 2008.
- Petit JM, Ratinaud MH, Cordelli E, Spano M, Julien R: Mouse testis cell sorting according to DNA and mitochondrial changes during spermatogenesis. *Cytometry* 19, 304-312. 1995.
- Rath D, Johnson LA. Application and commercialization of flow cytometrically sex-sorted semen. *Reprod Domestic Anim* 43, 338-346. 2008.
- Reuter K, Schlatt S, Ehmcke J, Wistuba J. Fact or fiction. In vitro spermatogenesis. *Spermatogenesis* 2, 245-252. 2012.
- Rice WR, Chippindale AK. Sexual recombination and the power of natural selection. *Science* 294, 555-559. 2001.
- Ryu BY, Kubota H, Avarbock MR, Brinster RL. Conservation of spermatogonial stem cell self-renewal signaling between mouse and rat. *PNAS USA* 102, 14302-14307. 2005.
- Rodríguez R, Wettstein RM. Quantitative study on guinea pig spermatogenesis shows a relative high percentage of early meiotic prophase stages. *Anat Rec* 278, 493-504. 2004.

- Rodríguez-Casuriaga R, Geisinger A, López-Carro B, Porro V, Wettstein R, Folle GA. Ultrafast and optimized method of preparation of rodent testicular cells for flow cytometric analysis. *Biol Proced Online* 11,184-195. 2009.
- Rodríguez-Casuriaga R, Geisinger A, Santiñaque F, López-Carro B, Folle G. High-purity flow sorting of early meiocytes based on DNA analysis of guinea pig spermatogenic cells. *Cytometry* 79A, 625-634. 2011.
- Rodríguez-Casuriaga R, Folle G, Santiñaque F, López B, Geisinger A. Simple and efficient technique for the preparation of testicular cell suspensions. *J Vis Exp* 78, e50102. 2013.
- Rodríguez-Casuriaga R, Santiñaque FF, Folle GA, Souza E, López-Carro B, Geisinger A. Rapid preparation of rodent testicular cell suspensions and spermatogenic stages purification by flow cytometry using a novel blue-laser-excitable vital dye. *MethodsX* 1, e239–e243. 2014.
- Rommerts FFG, Molenaar R, Van der Molen HJ. Preparation of isolated leydig cells. *Methods Enzymol* 109, 22. 1985.
- Romrell LJ, Bellvé AR, Fawcett DW. Separation of mouse spermatogenic cells by sedimentation velocity. *Dev Biol* 19, 119-131. 1976.
- Salva A, Klinfelter GR, Hardy MP. Purification of rat leydig cells: increased yields after unit-gravity sedimentation of collagenase-dispersed interstitial cells. *J Androl* 22, 665-671. 2001.
- Sato T, Katagiri K, Gohbara A, Inoue K, Ogonuki N, Ogura A, et al. In vitro production of functional sperm in cultured neonatal mouse testes. *Nature* 471, 504-507. 2011.
- Scherthan H. Telomere attachment and clustering during meiosis. *Cell Molec Life Sci* 64, 117-124. 2007.
- Schlatt S, Rodríguez-Sosa JR, Dobrinski I. Testicular xenografting. En: *Male Germline Stem Cells: Developmental and Regenerative Potential* (Eds. Orwing E, BP Hermann) Humana Press, c/o Springer Science & Business media. USA pp 205-225. 2011.
- Schmekel K, Daneholt B. The central region of the synaptonemal complex revealed in three dimensions. *Trends Cell Biol* 5, 239-242. 1995.
- Schrans-Stassen BHGJ, Saunders PTK, Cooke HJ, de Rooij DG. Nature of the Spermatogenic Arrest in Dazl -/- Mice. *Biol Reprod* 65, 771–776. 2001.

Sharpe RM. Regulation of spermatogenesis. En: *The Physiology of Reproduction* (Eds. Knobil E, Neil JD) Raven Press, New York pp 434-1363. 1994.

Sharpe JC, Evans KM. Advances in flow cytometry for sperm sexing. *Theriogenology* 71, 4-10. 2009.

Shima JE, McLean DJ, McCarrey JR, Griswold MD. The murine testicular transcriptome: characterizing gene expression in the testis during the progression of spermatogenesis. *Biol Reprod* 71, 319-330. 2004.

Shinohara T, Orwig KE, Avarbock MR, Brinster RL. Spermatogonial stem cell enrichment by multiparameter selection of mouse testis cells. *PNAS USA* 97, 8346-8351. 2000.

Solari A. J. The evolution of the ultrastructure of the sex chromosomes (sex vesicle) during meiotic prophase in mouse spermatocytes. *J Ultrastruct Res* 27, 289-305. 1969.

Spanó M, Evenson DP. Flow cytometric analysis for reproductive biology. *Biol Cell* 78, 53-62. 1993.

Stammler A, Lüftner BU, Kliesch S, Weidner W, Bergmann M, Middendorff R, Konrad L. Highly Conserved Testicular Localization of Claudin-11 in Normal and Impaired Spermatogenesis. *PLoS One* 11, e0160349. 2016.

Suter L, Koch E, Bechter R, Bobadilla M. Three-parameter flow cytometric analysis of rat spermatogenesis. *Cytometry* 27,161-168. 1997.

Tanaka H, Pereira LAVD, Nozaki M, Tsuchida, J, Sawada K, Mori, H, Nishimune, Y. A germ cell specific nuclear antigen recognized by a monoclonal antibody raised against mouse testicular germ cells. *Int J Androl* 20, 361-366. 1998.

Tanaka K, Tamura H, Tanaka H, Katoh M, Futamata Y, Seki N, Nishimune Y, Hara T. Spermatogonia-dependent expression of testicular genes in mice. *Dev Biol* 246, 466-479. 2002.

Thomas KH, Wilkie TM, Tomashefsky P, Bellvé AR, Simon MI. Differential gene expression during spermatogenesis. *Biol Reprod* 41, 729-739.1989.

Traish A. Testosterone therapy in men with testosterone deficiency: Are we beyond the point of no return? *Investig Clin Urol* 57, 384-400. 2016.

Tvrda E, Agarwal A, Alkuhaimi N. Male Reproductive Cancers and Infertility: A Mutual Relationship. *Int J Molec Sci* 16, 7230-7260. 2015.

- Van der Wee KS, Johnson EW, Dirami G, Dym TM, Hofmann MC. Immunomagnetic isolation and long-term culture of mouse type A spermatogonia. *J Androl* 22, 696-704 2001.
- Van Dilla MA, Trujillo TT, Mullaney PF, Coulter JR. Cell microfluorometry: a method for rapid fluorescence measurement. *Science* 163, 1213-1214. 1969.
- Van Kroonenburgh MJ, Beck JL, Scholtz JW, Hacker-Klom U, Herman CJ. DNA analysis and sorting of rat testis cells using two parameter flow cytometry. *Cytometry* 6, 321-326. 1985.
- Vigodner M, Lewin LM, Shochat L, Mittelman L, Golan R. Meiosis in the golden hamster: a confocal microscopy and flow cytometric analysis. *Molec Reprod Dev* 64, 86-95. 2003.
- Vigodner M, Lewy H, Lewin LM, Shochat L, Golan R. Evidence for biological rhythm in spermatogenesis in the pubertal hamster (*Mesocricetus auratus*): a flow cytometric study. *Life Sci* 74, 1119-1126. 2004.
- Vilardell J, Coll MD, Querol E, Egozcue J. Histone electrophoretic pattern in the characterization of synaptonemal complexes. *Cell Molec Biol* 35, 201-214. 1989.
- Von Wettstein D, Rasmussen SW, Holm PB. The synaptonemal complex in genetic segregation. *Annu Rev Genet* 18, 331-413. 1984.
- Wang Y, Song W, Li S, Guan X, Miao S, Zong S, Koide SS, Wang L. GC-1 mRHBDD1 knockdown spermatogonia cells lose their spermatogenic capacity in mouse seminiferous tubules. *BMC Cell Biol* 10, 25. 2009.
- Warrington JA, Nair A, Mahadevappa M, Tsyganskaya M. Comparison of human adult and fetal expression and identification of 535 housekeeping/ maintenance genes. *Physiol Genomics* 2, 143-7. 2000.
- Weiss M, Vigier M, Hue D, Perrard-Sapori MH, Marret C, Avallet O, Durand P. Pre- and postmeiotic expression of male germ cell-specific genes throughout 2-week cocultures of rat germinal and Sertoli cells. *Biol Reprod* 57, 68-76. 1997.
- Wettstein R, Sotelo JR. The molecular architecture of synaptonemal complexes. *Adv Cell Molec Biol* 1, 109-152. 1971.
- Wistuba J, Schrod A, Greve B, Hodges JK, Aslam H, Weinbauer GF, Luetjens M. Organization of seminiferous epithelium in primates: relationship to spermatogenic efficiency, phylogeny, and mating system. *Biol Reprod* 69, 582-591. 2003.

Yoon CY, Hong CM, Cho YY, Chung YH, Min HK, Yun YW, Lee BJ, Yang KH, Lee YS, Kim CK. Flow cytometric assessment of ethylene glycol monoethyl ether on spermatogenesis in rats. *J Veterin Med Sci* 65, 207-212. 2003.

Zhou Q, Li Y, Nie R, Friel P, Mitchell D, Evanoff RM, Pouchnik D, Banasik B, McCarrey JR, Small C, Griswold MD. Expression of stimulated by retinoic acid gene 8 (Stra8) and maturation of murine gonocytes and spermatogonia induced by retinoic acid in vitro. *Biol Reprod* 78, 537-545. 2008.

Zhou KW, Zheng XM, Yang ZW, Zhang L, Chen HD. Overexpression of CIRP may reduce testicular damage induced by cryptorchidism. *Clin Investig Med* 32, 103-111 2009.

Zickler D, Kleckner N. The leptotene-zygotene transition of meiosis. *Annu Rev Genet* 32, 619-697.1998.

Zickler D. From early homologue recognition to synaptonemal complex formation. *Chromosoma* 115,158-174. 2006.

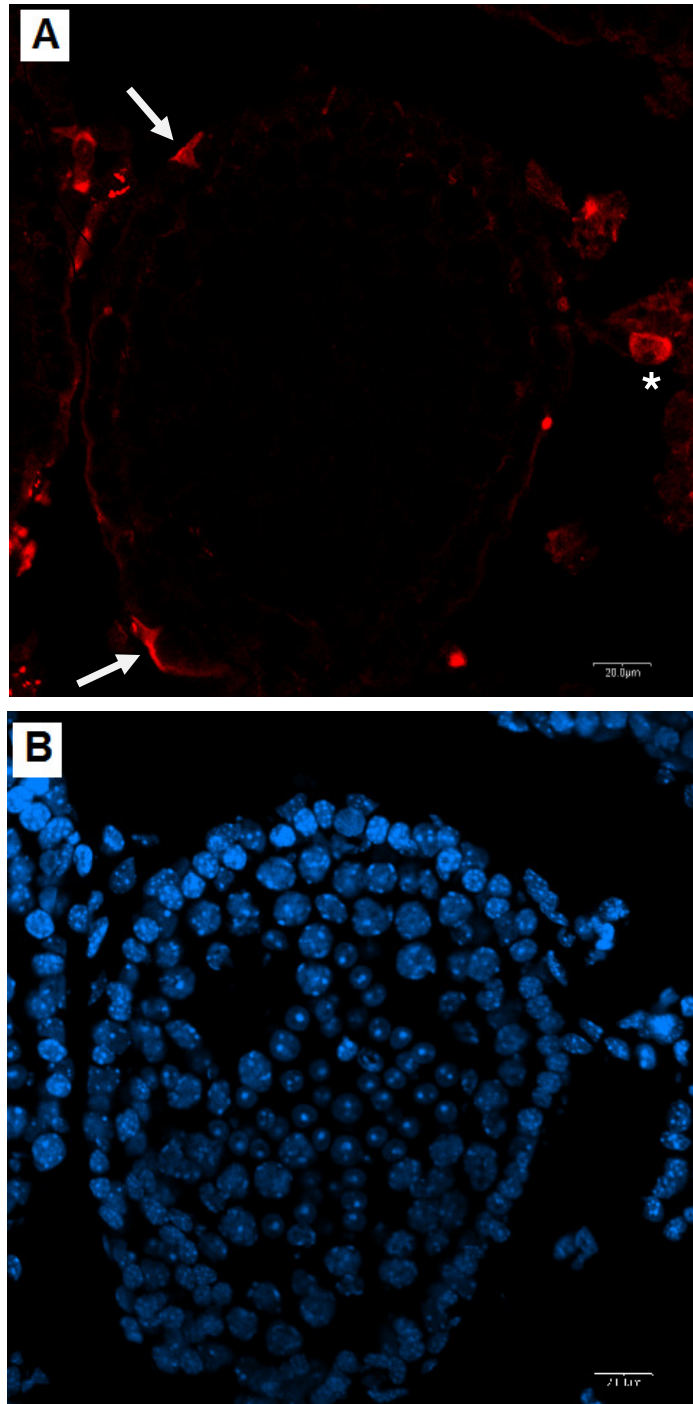
VII. ANEXOS

VII.1. Tabla de iniciadores empleados en los PCR

Se indica la secuencia de los iniciadores diseñados para los ensayos de PCR en este estudio, y los tamaños esperados de los productos de la amplificación.

Gen	Iniciador <i>Forward</i>	Iniciador <i>Reverse</i>	Tamaño del amplicón
<i>Dazl</i>	CTAGGCAGCCACCTCACG	TCCATCCTAACATCAATTCCTCC	240
<i>Cyp17a1</i>	TCAGCACCTTTTCCCTGTTC	CCAGGACATCCACAATACCC	240
<i>Cldn11</i>	TCACAACGTCCACCAATGAC	AGGGCTCTACAAGCCTGCAC	184
<i>Ppp1cc</i>	CATATCTTGAGTGGTGCTTCA	GACAGCATCATCCAACGGCT	158
<i>Prm1</i>	GCTCACAGTTGGCTGGCTC	TGATGGACTTGCTATTCTGTGC	251

VII.2. Ensayos de inmunohistoquímica



En la figura se muestra un ejemplo de los resultados obtenidos mediante ensayos inmunohistoquímicos sobre criosecciones de testículo de ratón de 25 dpp. En este caso, se empleó un anticuerpo antivimentina (A). Puede apreciarse la marcación de células de Sertoli, de aspecto piramidal (flechas); células de Leydig, a nivel del interticio (asterisco); y mioides peritubulares, delimitando a los túbulos seminíferos. En (B) se muestra la contratinción con DAPI.