

Universidad de la República
Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA)
Área Biología – Subárea Biología Celular y Molecular

Tesis de Doctorado:

**Estudio funcional del gen *Spats1* y su rol
en la espermatogénesis de los mamíferos.**

Mag. Carlos Adrián Capoano Bevilacqua

Directores: Dra. Adriana Geisinger
Dr. Ricardo Benavente

Co-directora: Dra. Rosana Rodríguez-Casuriaga

Tribunal de Tesis: Dr. Gustavo Folle
Dra. Rossana Sapiro
Dr. Alejandro Bielli

Dedicatoria:

Dedico este trabajo a mi familia, fundamentalmente a mi niña y a mis padres por toda la fe y el amor que iluminaron el camino.

Agradecimientos:

Un gran agradecimiento a todos mis compañeros del Dpto. de Biología Molecular del IIBCE, por permitirme hacer todas las cosas que hicimos en el laboratorio, tantos experimentos, por los momentos compartidos y los amigos que conocimos en el camino. Especialmente, a la Dra. Adriana Geisinger que confió en mí y consiguió todo lo necesario para hacer un buen trabajo. Nunca podré olvidar su compromiso, generosidad y paciencia durante la mayor parte de mi formación y el desarrollo de este trabajo. Agradezco asimismo al Dr. Benavente y a la Dra. Rodríguez-Casuriaga, por los valiosos aportes durante el desarrollo de esta tesis. También a todos los colaboradores de tantas instituciones diferentes como Dra. Martina Crispo y Mag. Geraldine Schlapp de la UATE del IPMont, Dra. Rossana Sapiro del Dpto. de Histología de la Facultad de Medicina (UDELAR), y de varios departamentos del IIBCE que colaboraron desinteresadamente y siempre con el mejor espíritu de fraternidad científica como el Dr. Gustavo Folle y la Dra. Carina Gaggero. Un especial agradecimiento a la ANII por otorgarme una beca, y a PEDECIBA por permitirme ingresar en el programa de doctorado. Finalmente, agradezco a los integrantes del tribunal por haber aceptado evaluar esta tesis.

TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN	1
<u>I. INTRODUCCIÓN</u>	
<u>1. DESARROLLO TESTICULAR Y ESPERMATOGÉNESIS EN LOS MAMÍFEROS</u>	
1.A. Los testículos de los mamíferos	4
1.B. La espermatogénesis de los mamíferos	4
1.C. Las células de Sertoli y la barrera hematotesticular	9
1.D. Ciclo del epitelio seminífero, heterogeneidad testicular y dificultades para el estudio de la espermatogénesis	11
1.E. La infertilidad masculina	13
<u>2. LA PROTEÍNA SPATS1</u>	
2.A. Descubrimiento, características y patrón de expresión de SPATS1	15
2.B. SPATS1 y la vía Wnt	19
<u>3. MÉTODOS DE GENERACIÓN DE RATONES <i>KNOCKOUT</i> (KO)</u>	
3.A. Los ratones KO	22
3.B. <i>Gene Targeting</i> y <i>Recombineering</i>	23
3.C. Introducción a <i>gene trap</i>	25
3.D. Sistemas de edición de genomas	28
3.D.a. Introducción a los sistemas de edición de genomas	28
3.D.b. Desde el sistema inmune bacteriano CRISPR/Cas hasta las nucleasas guiadas por ARN	29
<u>II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</u>	
<u>1. HIPÓTESIS</u>	34
<u>2. OBJETIVOS</u>	34
2A. Objetivo general	34
2B. Objetivos específicos	34

III. MATERIALES Y METODOS

1. ESTUDIOS BIOINFORMÁTICOS, MINERÍA DE DATOS

- 1.A. Alineamiento de secuencias, búsqueda de homologías y estudios de expresión 36
- 1.B. Análisis de dominios proteicos, determinación teórica de estructura proteica predicha, interacciones proteína-proteína 37

2. ANIMALES 38

3. GENERACIÓN DE RATONES KO

- 3.A. *Recombineering*: diseño de un *targeting vector* 39
- 3.B. *Gene trap* 41
 - 3.B.a. Selección de clones de trampa génica 41
 - 3.B.b. Microinyecciones en embriones 42
- 3.C. CRISPR/Cas 9 42
 - 3.C.a. ARN guía 42
 - 3.C.b. Microinyección de cigotos 43
 - 3.C.c. Genotipado 44
 - 3.C.d. Western blot confirmatorios 45

4. CARACTERIZACIÓN DE LOS RATONES KO

- 4.A. Inspección macroscópica 46
- 4.B. Tests de Fertilidad 46
- 4.C. Estudio de poblaciones celulares por citometría de flujo 47
- 4.D. Estudios de motilidad y vitalidad espermática (*computer assisted sperm analysis, CASA*) 48
- 4.E. Conteo de espermatozoides de animales de 1 año de edad 49
- 4.F. Evaluación de morfología espermática 49
- 4.G. Análisis histológicos 50
- 4.H. Extracciones de ARN y qRT-PCR 51
- 4.J. Caracterización del tumor 54
- 4.K. Análisis estadísticos 54

5. ENSAYOS DE CO-INMUNOPRECIPITACIÓN PARA IDENTIFICACION DE INTERACCIONES PROTEÍNA-PROTEÍNA

5.A. Ensayos de inmunoprecipitación	54
5.B. Identificación de péptidos por espectrometría de masas	56

IV. RESULTADOS

1. ESTUDIOS BIOINFORMÁTICOS

1.A. Homología de secuencias en otras especies	58
1.B. Conservación del patrón de expresión de <i>Spats1</i>	63
1.C. Similitudes con otras proteínas, y dominios proteicos	66
1.D. Predicción de estructura proteica teórica (MODbase Database).	71
1.E. Predicción de interacciones proteína-proteína	72

2. GENERACIÓN DE RATONES KO DEL GEN *SPATS1*

2.A. Utilización del método <i>Recombineering</i> para la generación de ratones KO	74
2.B. Utilización del método de <i>gene trap</i>	75
2.C. Utilización de la tecnología CRISPR/Cas9	77
2.C.a. ARN guía	79
2.C.b. Generación del ratón KO por método CRISPR/Cas9	81
2.C.c. Mutaciones seleccionadas	84
2.C.d. Evaluación de la presencia de proteína salvaje y ARNm de <i>Spats1</i> en los ratones KO	87

3. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LOS RATONES KO

3.A. Análisis de ratones KO adultos jóvenes	89
3.A.a. Observación macroscópica	89
3.A.b. Test de Fertilidad	90
3.A.c. Representatividad de las distintas poblaciones celulares en el testículo	91
3.A.d. Motilidad espermática	93
3.A.e. Análisis de defectos de capacitación	95
3.A.f. Morfología espermática	96
3.A.g. Análisis histológico	97

3.B. Análisis de ratones KO envejecidos	103
3.B.a. Observación macroscópica	103
3.B.b. Caracterización del tumor	105
3.B.c. Conteos y morfología espermática	106
3.B.d. Test de Fertilidad	108
3.B.e. Análisis histológico	109
3.C. Estudios de expresión génica en ratones KO <i>Spats1</i> vs WT	111
4. ESTUDIOS DE INTERACCIÓN PROTEÍNA-PROTEÍNA	
4.A. Ensayos de co-inmunoprecipitación	114
4.B. Identificación de péptidos por espectrometría de masas MALDI-TOF	116
V. <u>DISCUSIÓN</u>	
1. <u>GENERACIÓN DE RATONES KO</u>	118
2. <u>HACIA EL ROL DE SPATS1...</u>	
2.A. SPATS1 y adhesión celular	120
2.B. SPATS1 y fertilidad	125
2.C. SPATS1, desarrollo de tumores y vía Wnt	129
VI. <u>CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS</u>	133
VII. <u>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	137
VIII. <u>ANEXOS</u>	
1. MATERIALES Y MÉTODOS – <i>Recombineering</i>: diseño de un targeting vector	
1.A. Plásmidos y cepas	149
1.B. Subclonado de un fragmento de 13,8 Kpb del gen <i>Spats1</i> del BAC al plásmido mediante la técnica de <i>gap repair</i>	150
1.C. Introducción de casete Neo ^r en exón 2 de <i>Spats1</i>	151
2. RESULTADOS – Curva de calibración para experimentos de qRT-PCR	155

Resumen

En trabajos anteriores de nuestro grupo se había reportado la identificación y caracterización de un gen de expresión específica del testículo de la rata, denominado *Spats1* (*spermatogenesis-associated, serine-rich 1*). Se observó que *Spats1* se expresaba diferencialmente durante el desarrollo testicular, alcanzando su pico de expresión en la primera onda espermatogénica y principalmente en las células en profase meiótica I. La importante conservación de este gen a lo largo de la evolución de los metazoarios nos sugirió la importancia de su función.

Con el objeto de contribuir a la elucidación del rol de la proteína SPATS1 en relación al desarrollo del testículo y/o la espermatogénesis, se procedió a la realización de diversos estudios bioinformáticos, generación de ratones *knockout* (KO) y caracterización fenotípica de los mismos, además de ensayos bioquímicos de interacción proteína-proteína.

Con respecto a la generación de ratones KO *Spats1*, la utilización en paralelo de diversas metodologías para producción de KOs para un mismo gen nos permitió comparar la eficiencia de los distintos métodos. En tanto otras metodologías presentaron distintas limitaciones debido a su alta complejidad, la técnica de CRISPR/Cas9 representó una enorme ventaja tanto en términos económicos como de rapidez y tasa de transmisión del transgén a la línea germinal. Es así que este método nos permitió generar los primeros ratones KO producidos enteramente en el Uruguay.

La caracterización del fenotipo de los ratones mutantes incluyó análisis morfológicos, histológicos, moleculares y funcionales. El estudio macroscópico de los ratones KO no reveló ningún defecto en el desarrollo anatómico de los animales ni en su comportamiento, así como tampoco diferencias en peso ni tamaño, en comparación con los ratones WT control. Tampoco evidenciamos defectos en la capacidad reproductiva. Sin embargo, los cortes histológicos de los testículos de ratones KO adultos jóvenes revelaron una obstrucción del lumen en prácticamente el 90% de los túbulos seminíferos, los que se encontraban desde parcialmente hasta completamente obstruidos. Además, algunos túbulos seminíferos mostraron desprendimientos de tejido.

Es interesante destacar que este fenotipo se asemeja de modo notable a los observados en otros estudios de ratones KO deficientes en genes codificantes para proteínas vinculadas a adhesión celular en el testículo. En ese sentido, estudios de expresión génica mostraron que en los ratones KO *Spats1* se alteró a la baja la expresión de claudina 11, una

proteína asociada a las uniones intercelulares estrechas. Más aún, estudios de interacción proteica predicha, sumados a los ensayos de co-inmunoprecipitación que hemos realizado, nos sugieren que SPATS1 sería una proteína interactuante con las fibras del citoesqueleto de actina. En suma, estos resultados en conjunto nos permiten sugerir que SPATS1 tendría un rol en el mantenimiento de la estructura interna de los túbulos seminíferos, vinculado a la adhesión celular.

Por otra parte, uno de los ratones mutantes desarrolló un teratoma al año de edad. Sería demasiado prematuro en este momento sugerir que la alteración de *Spats1* estaría vinculada con el desarrollo de este tumor. Sin embargo, dado que la aparición de estos tumores es muy infrecuente, y que se trata de un tumor de células germinales, este resultado nos alienta a seguir investigando en este sentido. Un trabajo previo había sugerido un rol para SPATS1 como inhibidor de la vía Wnt. Si así fuera, especulamos con que los ratones KO para el gen *Spats1* podrían ser defectuosos en su capacidad de inhibir la vía Wnt en el testículo, lo que redundaría en una sobreexpresión de genes blanco de esta vía, varios de los cuales son oncogenes, lo que podría eventualmente contribuir al desarrollo de tumores.

I. INTRODUCCIÓN

1. DESARROLLO TESTICULAR Y ESPERMATOGÉNESIS EN LOS MAMÍFEROS

1.A. Los testículos de los mamíferos

Los testículos son las gónadas masculinas, responsables de la producción de espermatozoides (células germinales masculinas) y hormonas sexuales masculinas (andrógenos). En los mamíferos, están cubiertos por la túnica vaginal que cubre a su vez a la túnica albugínea, a partir de la cual se originan numerosos tabiques o septos interlobulares que dividen al órgano en lobulillos testiculares. En el interior de los lobulillos aparecen los túbulos seminíferos, rodeados por el espacio intersticial (Figura I.1A). Los testículos están organizados en una red de túbulos seminíferos compuestos por un epitelio estratificado especializado cuyas células desarrollan un proceso denominado espermatogénesis, por el cual se originan los espermatozoides, haploides (Bernavé *et al.*, 2012). Dentro de los túbulos seminíferos se ubican las células de la línea germinal en distintos estadios de diferenciación, junto con las células de sostén, o células de Sertoli.

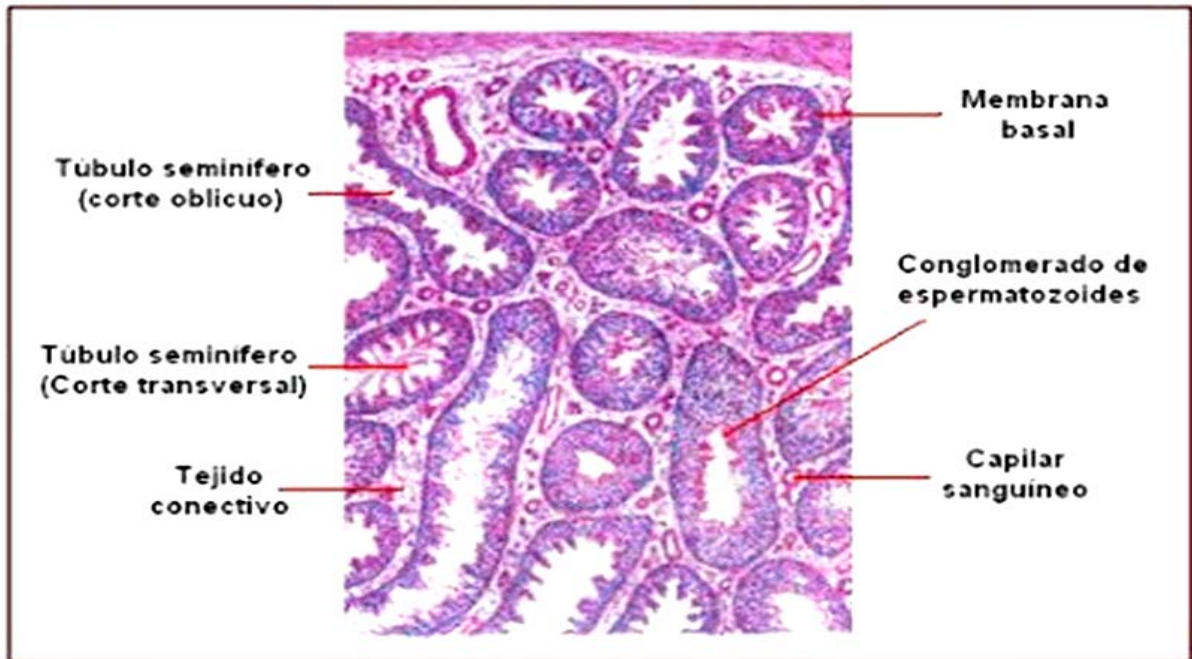
Los túbulos seminíferos se encuentran además rodeados por células mioideas peritubulares, en estrecha relación con la pared de los mismos. Por su parte, en el espacio intersticial que rodea a los túbulos seminíferos se encuentra un estroma que contiene distintos tipos celulares: células de Leydig productoras de testosterona, linfocitos, macrófagos, leucocitos, etc. (Figura I.1B).

1.B. La espermatogénesis de los mamíferos

La espermatogénesis es el proceso de producción de espermatozoides, y se da a partir de la pubertad y a través de toda la vida reproductiva del individuo. Es un proceso de desarrollo y diferenciación celular complejo, que involucra una coordinada división y diferenciación de un gran número de células. Es esencial para todas las especies con reproducción sexuada, y puede describirse como la ejecución coordinada de tres programas sucesivos de expresión génica. El primer programa corresponde a la proliferación mitótica de las espermatogonias, células troncales precursoras de las células de la línea germinal. El segundo programa, correspondiente a la meiosis, provee a los espermatoцитos I (células en la primera profase meiótica) del aparato molecular para el apareamiento, recombinación y segregación de los cromosomas homólogos, y el tercer programa, la espermiogénesis, es responsable de los cambios estructurales y bioquímicos que sufren las espermátidas

redondas (células haploides resultantes de la segunda división meiótica), hasta completar su diferenciación como espermatozoides (Erickson, 1990).

A



B

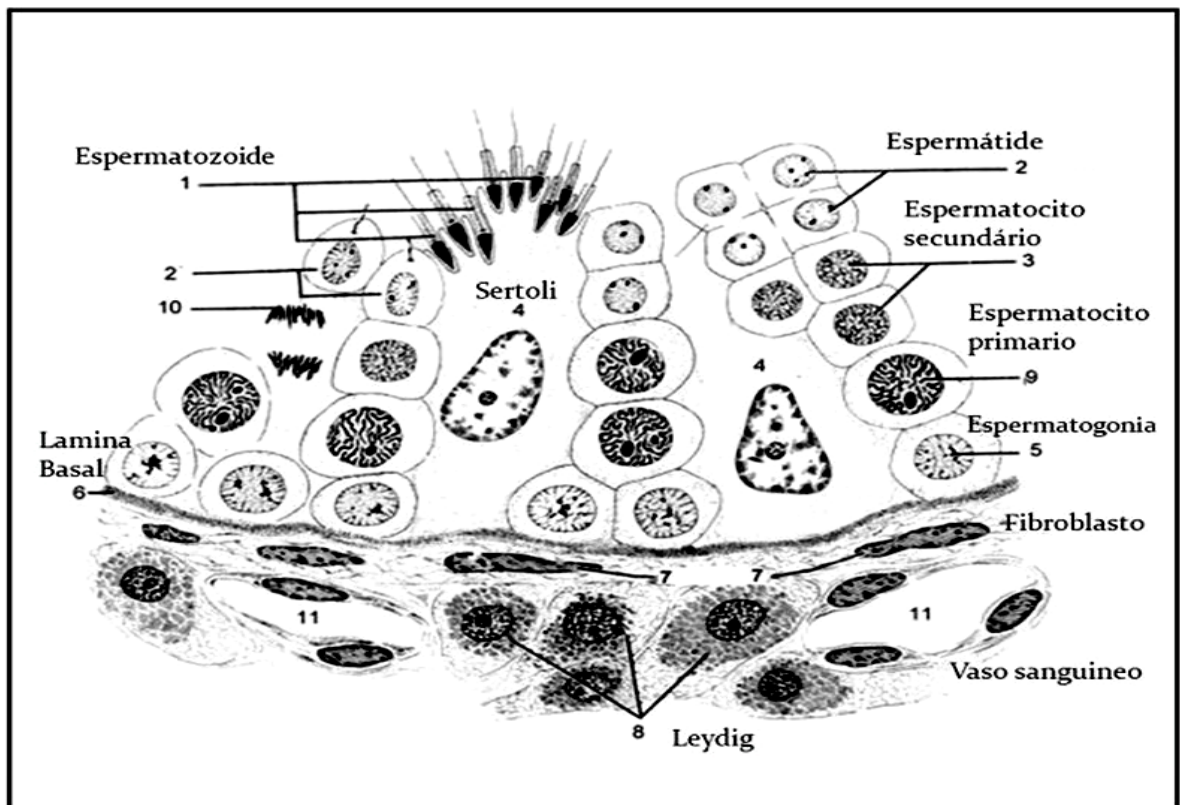


Figura I.1. A. Esquema de un corte histológico de testículo, donde se observan los distintos túbulos seminíferos y el tejido intersticial. B. Esquema de una sección transversal de túbulo seminífero. Se representan los distintos tipos celulares presentes dentro del túbulo, así como en el intersticio.

Las células germinales están constituidas por varios tipos morfológicos que representan diferentes fases de desarrollo y diferenciación de los espermatozoides. Se localizan entre y por encima de las células de Sertoli. Las células de la línea germinal van avanzando en su diferenciación desde la base hacia la luz del túbulo seminífero, de modo que las más basales son las espermatogonias A y B, más hacia la luz se disponen los espermatocitos I y II y en la zona apical del epitelio se encuentran las espermatidas y los espermatozoides; estos últimos son liberados hacia la luz.

Las espermatogonias A *stem*, también denominadas células madre, representan el estrato germinal del epitelio seminífero. Tienen morfología esférica y pequeño tamaño. El núcleo es esférico, el citoplasma es claro y contiene escasos organoides. Estas células se dividen mediante mitosis formando nuevas generaciones de espermatogonias A y B.

Las espermatogonias B tienen una morfología muy similar a la de las A, aunque el citoplasma es más oscuro y presentan inclusiones proteicas. Se encuentran en continua división, originando nuevas espermatogonias B mediante divisiones mitóticas (Boitani *et al.*, 2016).

Los espermatocitos I se sitúan por encima de las espermatogonias y nada más formarse, emigran hacia el compartimento apical o adluminal (ver sección 1.c). Están envueltos por prolongaciones citoplasmáticas de las células de Sertoli. Estas, son las células de mayor tamaño del epitelio tubular. En su citoplasma aparecen numerosas mitocondrias, un aparato de Golgi evidente y escaso retículo endoplásmico. Tienen un gran núcleo con su ADN duplicado ($2n\ 4C$) y diferentes características según en el estadio de la profase I en el que se encuentren.

La Profase I de la meiosis es un período largo en el cual los cromosomas presentan un comportamiento particular, diferente del observado en mitosis. Por otro lado, al igual que en la mitosis, al final de la misma la envoltura nuclear y el nucléolo se desorganizan, los centriolos en el caso de los animales migran hacia los polos opuestos duplicándose durante ese movimiento, y se ordena el huso acromático. Para un mejor estudio, la profase I se ha subdividido en cinco etapas (Page y Hawley, 2003):

a) Leptoteno: Los cromosomas comienzan a condensarse, sus telómeros se unen a la envoltura nuclear y comienzan a migrar en el plano de la misma.

b) Cigoteno: Continúa la condensación de los cromosomas. Los extremos cromosómicos llegan a concentrarse en una pequeña área dando lugar a la configuración denominada *bouquet*. Los cromosomas homólogos comienzan a aparearse de manera específica punto

por punto. Este contacto se denomina sinapsis homóloga, y la estructura resultante se denomina cromosoma bivalente (porque está constituida por dos cromosomas). El complejo macroproteico mediador de esta sinapsis constituye el complejo sinaptonémico (CS), estructuras exclusivas de la profase meiótica (Smith *et al.*, 1992).

c) Paquiteno: Los cromosomas homólogos completan su apareamiento, de un extremo cromosómico al otro, aunque no hay fusión entre cromátidas, el contacto mediado por el CS es sumamente estrecho. Los cromosomas se hallan enrollados más apretadamente y las cromátidas se hacen visibles; el par homólogo recibe ahora el nombre de tétrada (constituido por cuatro cromátidas). Uno de los fenómenos más notorios que ocurre en esta etapa es el entrecruzamiento o recombinación entre cromátidas homólogas (*crossing-over*). Tanto la sinapsis como la recombinación entre los cromosomas homólogos están mediadas por los CS (Smith *et al.*, 1992).

d) Diploteno: Los cromosomas homólogos comienzan a repelerse, aunque sin separarse por completo. Quedan unidos por ciertos puntos denominados quiasmas, que constituyen la expresión morfológica de los intercambios ocurridos entre material genético de origen materno y paterno..

e) Diacinesis: Mientras continúa la condensación de los cromosomas, los quiasmas se desplazan hacia los extremos de los mismos y los cromosomas homólogos sólo quedan ligados por los extremos.

El intercambio de fragmentos cromosómicos o recombinación homóloga que ocurre durante la profase I de la primera división meiótica, constituye una fuente fundamental de variabilidad para las especies con reproducción sexuada y es uno de los sustratos más importantes de la evolución. El apareamiento y segregación cromosómica que tienen lugar en la primera división meiótica, son los responsables del mantenimiento del número cromosómico de la especie. Existen durante la profase meiótica, puntos de control (*checkpoints*) que monitorean que estos complejos eventos ocurran de manera adecuada, y las células que no pasan estos puntos de control suelen quedar detenidas en la profase meiótica o morir por apoptosis, pudiendo esto ser causa de infertilidad. Además, la alteración de estos procesos suele también encontrarse en la base de patologías como el cáncer testicular, y otras (Reoder y Bailis, 2000).

Los espermátocitos II, resultantes de la primera división meiótica, tienen un número haploide de cromosomas (1n), aunque su contenido de ADN es 2C. Son células de menor tamaño, y luego, a través de la segunda división meiótica dan lugar a las espermátidas

redondas, haploides y 1C en contenido de ADN. Las espermatidas a su vez originan los espermatozoides mediante un proceso de diferenciación denominado espermiogénesis, que consta de varias fases (Bernavé *et al.*, 2012):

- Fase del Golgi: se caracteriza porque hay un gran desarrollo del aparato de Golgi que proyecta un sáculo hacia la porción cefálica del núcleo, produciéndose un proceso de condensación enzimática por enzimas hidrolíticas. Esto se observa como un cuerpo denso homogéneo denominado gránulo acrosómico, que dará lugar al cuerpo del acrosoma.

- Fase del núcleo: conforme se va desarrollando el acrosoma, el núcleo se desplaza caudalmente con respecto a éste, y su cromatina se condensa. La morfología del núcleo va cambiando a lo largo de la espermiogénesis, pasando de una morfología redondeada (espermatidas redondas) a una elongada (espermatidas elongadas).

- Fase del flagelo: a la vez que se forma el acrosoma y el núcleo se modifica, en el polo opuesto dos centriolos van a originar los filamentos axiales de la cola. En una primera fase los centriolos se sitúan en una fosa de implantación en el polo caudal del núcleo y posteriormente diferencian el axonema o zona central del flagelo, constituida por dos fibrillas centrales y nueve dobletes periféricos. Al axonema se van uniendo otras estructuras como mitocondrias y fibras densas. El flagelo queda totalmente desarrollado en las fases finales de diferenciación del espermatozoide.

- Fase de pérdida de citoplasma: durante esta fase el citoplasma sobrante es eliminado para favorecer la movilidad. Hacia los lados, y ayudado por el movimiento de la vesícula acrosómica hacia la zona basal y por microtúbulos, el citoplasma irá desplazándose en forma de restos citoplasmáticos, que serán eliminados por las células de Sertoli en el proceso de liberación del espermatozoide.

Los espermatozoides, están constituidos por tres zonas: cabeza, cuello y cola. La estructura general es muy similar aunque la morfología externa difiere según las especies, localizándose las principales diferencias morfológicas en el tamaño y forma de la cabeza.

- Cabeza: está constituida por el núcleo y el acrosoma. El núcleo es muy electródenso y su forma varía desde ovoide a falciforme, según la especie. El acrosoma es una gran bolsa que envuelve la porción cefálica y que contiene enzimas hidrolíticas cuya función es favorecer la entrada del espermatozoide en el óvulo.

- Cuello: es una estructura corta situada entre la cabeza y la cola. Está constituida por los centriolos y el aparato articular. Puede aparecer un solo centriolo o un diplosoma. A

partir del centríolo se forman el axonema del flagelo y el aparato articular, constituido por el *capitulum*.

- Cola: se compone a su vez de tres partes, la pieza intermedia, pieza principal y pieza final. La pieza intermedia está constituida por un cilio 9+2 como base del flagelo, rodeado por nueve columnas densas de proteínas fibrosas que vienen del cuello y a su vez por una vaina helicoidal de mitocondrias, responsables de la generación de energía. Esta pieza es la responsable del movimiento y la dirección. La pieza principal está constituida por un cilio interno rodeado por siete columnas densas, y éstas por otras dos, una dorsal y otra ventral, que adquieren gran tamaño y forman las columnas del espermatozoide, unidas lateralmente a las cuales aparecen proteínas fibrosas que se denominan costillas fibrosas. La pieza terminal está constituida por el flagelo, formado por el axonema y la membrana del flagelo. En las últimas porciones se produce la pérdida de parte de los microtúbulos (Bernavé *et al.*, 2012).

1.C. Las células de Sertoli y la barrera hematotesticular

Las células de Sertoli son las células de nutrición y sostén del epitelio seminífero, y participan en la liberación de los espermatozoides a la luz del túbulo seminífero. Son células con base ancha adherida a la membrana basal, y cuyo citoplasma restante se extiende hacia adentro hasta alcanzar la luz del túbulo (ver Figura I.1B). Presentan procesos citoplasmáticos laterales y apicales que llenan todos los espacios entre las células espermatogénicas adyacentes. Tienen un núcleo oval y un gran nucléolo central. Además de las funciones mencionadas, eliminan los productos de desecho, y especialmente los restos citoplasmáticos de las espermatidas. Estas células también producen sustancias como la proteína fijadora de andrógenos y la inhibina (Van Zonneveld *et al.*, 2003). La inhibina alcanza la corriente sanguínea y ejerce una retroalimentación negativa en la secreción de hormona folículo estimulante (FSH).

Las células de Sertoli además forman hemidesmosomas con la lámina basal y presentan uniones temporales con las células germinales, que juegan un papel muy importante en el desplazamiento vertical y liberación de las mismas. Como se mencionó anteriormente, entre las células de Sertoli contiguas aparecen uniones complejas que delimitan un compartimento basal y otro apical, y constituyen la barrera hematotesticular (Figura I.2A). En el compartimento basal se produce la renovación de las células progenitoras espermatogénicas y la multiplicación de las espermatogonias; en este compartimento el

fluido tisular intertubular tiene un relativo acceso libre. La barrera hematotesticular previene selectivamente la entrada de sustancias al compartimento apical o adluminal, donde existe un microambiente controlado y tienen lugar la meiosis y la espermiogénesis. Los espermatocitos jóvenes (preleptoténicos) pasan a este compartimento mediante un mecanismo de apertura de las uniones intercelulares con un funcionamiento similar al de una cremallera (Figura 1.2B).

Por otra parte, las espermátidas en elongación son transportadas durante el ciclo del epitelio seminífero (ver Sección 1.C) hacia arriba y hacia abajo en el compartimento adluminal, hasta que finalmente las espermátidas elongadas completamente desarrolladas (es decir, espermatozoides) se alinean en el borde adluminal del túbulo y son liberadas a la luz (espermiación), lo que ocurre durante el estadio VIII del epitelio seminífero en roedores (ver sección 1.D), y estadio II en humanos (Wen *et al.*, 2016).

Las uniones intercelulares tienen un rol fundamental, al permitir las interacciones y comunicación tanto en la barrera hematotesticular entre células de Sertoli adyacentes, como entre las células de Sertoli y las células germinales. Estas uniones son de tipo ocluyente (ej. ocludina y claudinas), uniones de tipo gap, y uniones adherentes (ej. NCAM, nectinas y proteínas “nectin-like”, cadherinas, cateninas) asociadas a cisternas del retículo endoplásmico. Hay también otros componentes estructurales, como los complejos túbulobulbares que anclan las espermátidas tardías a las células de Sertoli. Varias de estas moléculas de adhesión interactúan con el citoesqueleto de actina, que les brinda soporte (revisión por Hermo *et al.*, 2010). Además, cada vez surgen más evidencias que sugieren la participación del citoesqueleto de actina y los microtúbulos en los movimientos celulares dentro del túbulo seminífero, tanto en la migración a través de la barrera hematotesticular como en el transporte de las espermátidas (Wen *et al.*, 2016).

En particular, con respecto a las uniones adherentes, las mismas requieren de un complejo cadherina-catenina, donde las cateninas anclan a las cadherinas al citoesqueleto de actina, proceso en el que participarían la α y la β -catenina. Tanto estas dos como la δ -catenina han sido localizadas en la barrera hematotesticular y en los puntos de contacto entre células de Sertoli y células de línea germinal (Hermo *et al.*, 2010). A su vez, la β -catenina participa en la vía de señalización Wnt (ver Sección 2.B).

1.D. Ciclo del epitelio seminífero, heterogeneidad testicular y dificultades para el estudio de la espermatogénesis

La distribución de células del epitelio seminífero no es uniforme y depende de la fase de la espermatogénesis en que se encuentre. El ciclo se realiza por zonas a manera de ondas consecutivas, de tal forma que a lo largo de un túbulo aparecen diferentes fases de la espermatogénesis. Además, antes de que termine de madurar una onda de espermatozoides comienza la formación de otros nuevos, y así sucesivamente.

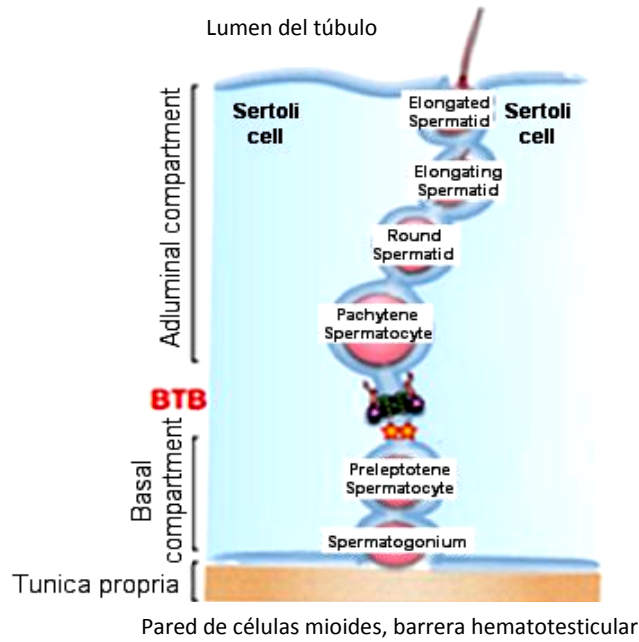
Dado que esto ocurre a intervalos regulares, se forman asociaciones de células de composición constante que siguen una a otra en un determinado punto del túbulo.

El ciclo del epitelio seminífero se define como la serie de cambios que ocurren en una región determinada del epitelio entre dos apariciones sucesivas de una misma asociación celular (Leblond y Clermont, 1952), y el número de asociaciones descritas varía dependiendo de la especie. En el ratón se han descrito 12 etapas, en la rata 14 y en el hombre 6, pero en la mayoría de los mamíferos el ciclo se divide en 8 etapas. La duración de los ciclos también varía según la especie: en el carnero dura 8 días, en el caballo 12, en el toro 13,5 y en el hombre 16 (Boitani *et al.*, 2016). Por otra parte, dentro del testículo no existe sincronía entre los distintos túbulos seminíferos, por lo cual no todos están en la misma fase de maduración. Como consecuencia, todos los tipos celulares de la espermatogénesis coexisten en los testículos de los individuos adultos.

La espermatogénesis es un proceso continuo, que comienza en el nacimiento y se completa en la adultez. En la rata (*Rattus norvegicus*), los túbulos seminíferos de un individuo de 12 días sólo contienen células de Sertoli y espermatogonias. A los 17-18 días ya hay presentes espermatoцитos primarios (leptoteno/cigoteno), y a los 21 días se encuentran células que alcanzan la profase meiótica media (paquiteno). A los 27 días ya se ha completado la primera ronda de meiosis, por lo que se observan además las espermátidas redondas (final de la meiosis e inicio de la espermiogénesis). Alrededor de los 40 días se alcanza la adultez, observándose una onda espermatogénica completa, es decir, aparecen los primeros espermatozoides (y todos sus estadios previos) (Malkov *et al.*, 1998).

En el ratón (*Mus musculus*), por su parte, los espermatoцитos aparecen alrededor de los 10-11 días postparto, el paquiteno se alcanza alrededor de los 13-14 días, y las espermátidas redondas aparecen a los 21 días. A los 25 días ya se observan espermátidas en elongación, y alrededor de los 28-30 días aparecen los primeros espermatozoides. A los 39-40 días el individuo puede considerarse un adulto joven (Bellvé *et al.*, 1977).

A



B

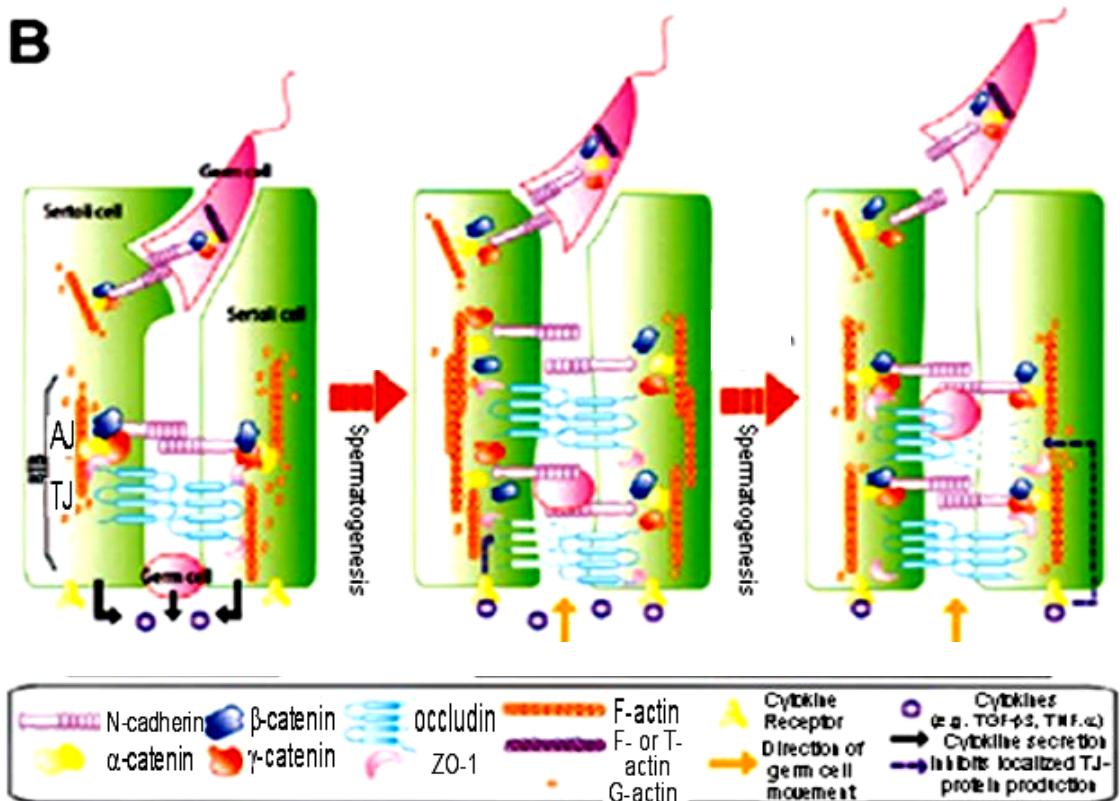


Figura 1.2. A. Esquema de túbulo seminífero mostrando los compartimentos basal y adluminal, definidos por la barrera hematotesticular. Modificado de *Siu et al., 2009*. **B.** Dinámica de la barrera hemato-testicular. Las uniones ocluyentes ("tight junctions", TJ) coexisten y están estructuralmente asociadas con las uniones adherentes ("adherens junctions", AJ). Estas asociaciones se alteran para permitir el movimiento celular a través de la barrera hematotesticular durante la espermatogénesis. Se observan la N-cadherina, cateninas, occludina y actina, entre otros componentes. Fuente: *Yan y Cheng, 2005*.

A pesar de su enorme importancia, la adquisición de conocimientos a nivel molecular acerca de la espermatogénesis de los mamíferos se ha visto retrasada con respecto a otros órganos y tejidos, principalmente por la complejidad del testículo como objeto de estudio. Una de las principales limitantes es la enorme cantidad de tipos celulares diferentes a que hemos hecho referencia y que, como hemos mencionado, coexisten en los túbulos seminíferos: células de los distintos estadios de la línea germinal, representativas de las distintas etapas de cada uno de los programas de expresión génica (espermatogonias, espermatocitos y espermátidas en distintos estadios de maduración), células somáticas (células de Sertoli) (Bellvé *et al.*, 1977), células mioides peritubulares, además de los tipos celulares del estroma que rodea a los túbulos (células de Leydig, macrófagos, fibroblastos, etc.). Por lo tanto, la realización de estudios de expresión génica requiere de sofisticados métodos para la purificación de células en la etapa de interés (e.g. da Cruz *et al.*, 2016).

Una complicación adicional es la falta de un sistema eficiente de cultivo *in vitro* de células de línea germinal (Reuter *et al.*, 2012). Como consecuencia de esto último, los abordajes que se han venido utilizando para la realización de estudios funcionales de proteínas vinculadas a espermatogénesis, en general han sido la expresión heteróloga de proteínas reproductivas en cultivos de células somáticas, o la generación de ratones *knockout* (KO).

1.E. La infertilidad masculina

Si bien las estadísticas varían, aparentemente un 30% de los hombres son subfértiles, y un 2% totalmente infértiles. Entre las causas de infertilidad masculina, las estimaciones sugieren que un 60% de los casos se debería a desórdenes genéticos (Mauduit *et al.*, 2006). Además, en el mundo desarrollado los tumores testiculares son el tipo de tumor sólido más frecuente en hombres jóvenes (e.g. Shaha *et al.*, 2010). Por todo esto, la profundización en el conocimiento de las bases moleculares de la producción de células germinales masculinas, así como de los mecanismos que conducen a su alteración, es imprescindible.

La azoospermia (ausencia de espermatozoides) puede clasificarse en azoospermia obstructiva (cuando existe una obstrucción para la salida de los espermatozoides, por ejemplo en los conductos deferentes), y azoospermia no obstructiva (cuando el defecto radica en la incapacidad de producir espermatozoides).

En la mayor parte de los casos de azoospermia no obstructiva o de oligozoospermia (escasez de espermatozoides) severa, la causa específica se desconoce (NICE, 2013; Dabaja y Schegel, 2014), por lo cual la infertilidad se suele clasificar como “infertilidad idiopática” (de causa desconocida). Incluso cuando se atribuye una causa genética, en la mayoría de los casos la causa genética específica suele desconocerse. Si bien se han asociado algunos factores genéticos con la azoospermia no obstructiva, el número de estudios que realmente relaciona mutaciones en un gen específico con un problema de infertilidad es muy pequeño (Massart *et al.*, 2012). Más aún, se ha sugerido que en muchos casos la infertilidad sería una enfermedad multigénica, e incluso en algunos casos podría ser consecuencia de una combinación de factores genéticos y ambientales (Aston *et al.*, 2010; Massart *et al.*, 2012). Además, hay cada vez más evidencias que involucran alteraciones epigenéticas tales como diferencias en la expresión de micro ARNs (Abu-Halima *et al.*, 2014), modificaciones en los patrones de metilación (Kitamura *et al.*, 2015; Pacchierotti y Spanò, 2015), y cambios en los patrones de empaquetamiento de la cromatina (Francis *et al.*, 2014).

En al menos parte de los casos de infertilidad idiopática humana, tanto en hombres como en mujeres, parecen estar involucrados errores meióticos. Los defectos en la meiosis con frecuencia resultan en errores de segregación cromosómica que conducen a la muerte celular o aneuploidía en los gametos, que es la principal causa de los abortos espontáneos (Handel y Schimenti, 2010). Se ha descrito interrupción parcial o completa de la meiosis en profase I en más del 10% de los casos de azoospermia no obstructiva (Topping *et al.*, 2006), lo cual podría explicarse porque las células meióticas no pasarían los puntos de control arriba mencionados (Roeder y Bailis, 2000). Como los dos eventos principales que tienen lugar en la profase meiótica I, es decir el apareamiento y la recombinación, tienen un papel crucial para la segregación cromosómica posterior, es entendible que la alteración de los genes relevantes para estos procesos pueda tener consecuencias dramáticas para la fertilidad. En estudios con ratones KO se han identificado numerosos genes necesarios para el apareamiento cromosómico y la recombinación, y cuya mutación afecta la capacidad reproductiva. Sin embargo, sólo para unos pocos de ellos se ha demostrado su participación en la fertilidad humana hasta ahora (Hann *et al.*, 2011; Quartuccio y Schindler, 2015; Yang *et al.*, 2015).

Por otra parte, a veces las fallas en la espermatogénesis pueden explicarse por defectos en los túbulos seminíferos que suelen producir liberación de células inmaduras o espermatozoides aberrantes (Aivatiadou *et al.*, 2007).

2. LA PROTEÍNA SPATS1

2.A. Descubrimiento y patrón de expresión de SPATS1

En estudios anteriores realizados en el Departamento de Biología Molecular (grupo de Biología Molecular de la Reproducción) del IIBCE, se había reportado la identificación y caracterización de genes de expresión específica del testículo de la rata (*Rattus norvegicus*) con la ayuda del método del *mRNA differential display* (e.g. Geisinger *et al.*, 1996). Uno de estos genes fue denominado *Spats1* (*spermatogenesis-associated, serine-rich 1*), debido a la presencia de un largo tramo de serinas en su secuencia proteica predicha. El otro motivo identificable en la secuencia fue una posible señal de localización nuclear de tipo bipartito (Geisinger *et al.*, 2002).

El gen *Spats1* y su proteína producto fueron caracterizados por nosotros, en el marco de la tesis de maestría. Además de incursionarse en la identificación y caracterización de la proteína producto del gen *Spats1*, se determinó su patrón de expresión mediante microscopía confocal de inmunofluorescencia y ensayos de Western blot. Para ello, se clonó el gen *Spats1* en un vector de expresión y se purificó la proteína recombinante con el fin de producir un suero policlonal anti-SPATS1, con el cual se identificó la proteína de interés. De esta manera, se obtuvo la primera evidencia de la existencia de la proteína producto del gen *Spats1*. Los estudios de Western blot e inmunolocalización en cortes histológicos, junto con ensayos de Northern blot, mostraron la presencia, tanto del transcripto como de la proteína, en el testículo de la rata y su ausencia en otros nueve tejidos (hígado, riñón, cerebro, pulmón, bazo, ovario, intestino, epidídimo, corazón). Esta evidencia nos permitió determinar que SPATS1 es una proteína específica del testículo (Figura I.3; ver también Capoano *et al.*, 2010).

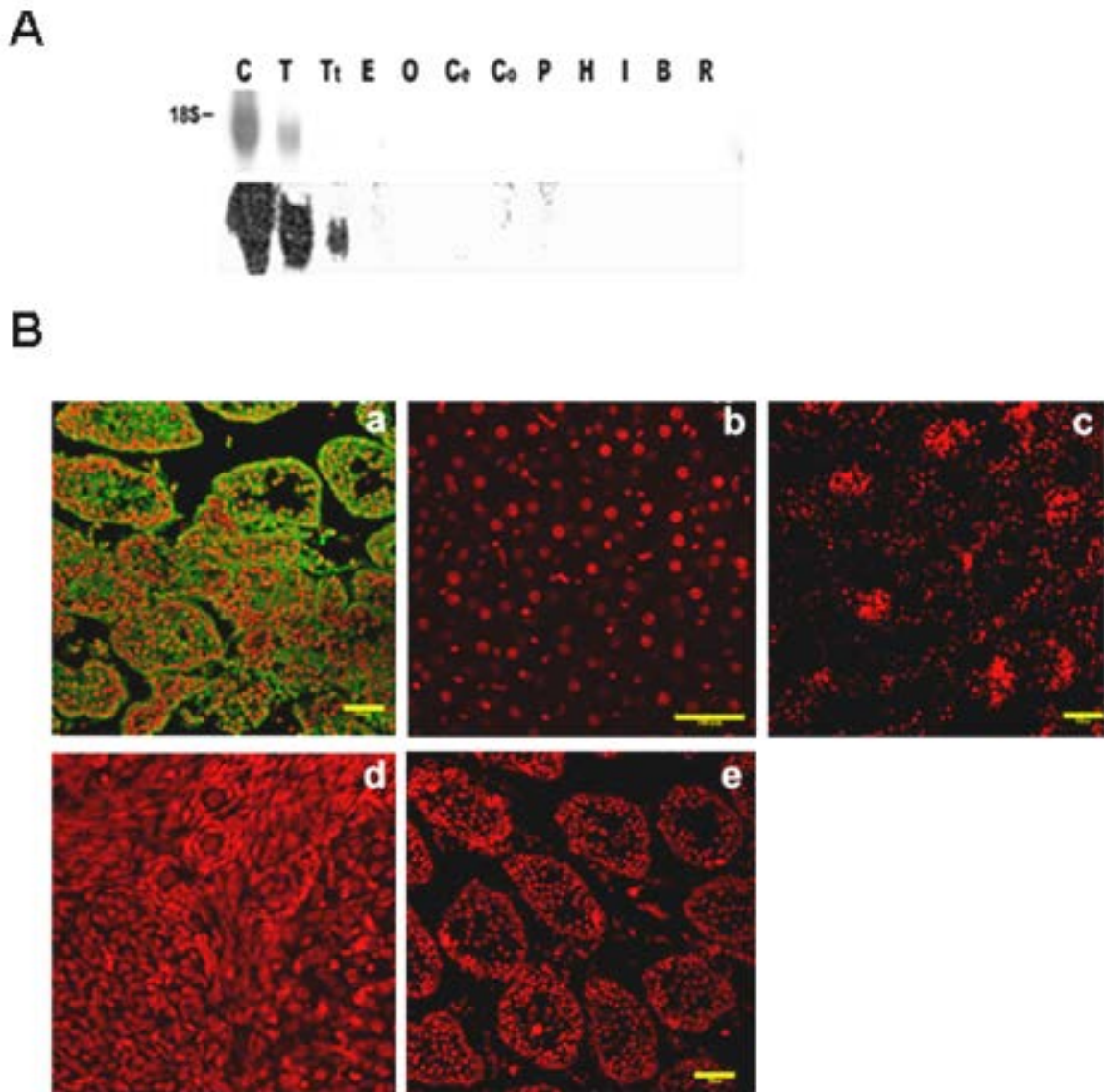


Figura 1.3. A. Detección de expresión del ARNm de *Spats1* de la rata analizado mediante ensayos de Northern-blot. Se puede observar la ausencia de expresión en otros tejidos que el testículo. Cada carril contiene ARN total de: espermatoцитos paquiténicos (C), espermátidas redondas (T), testículo total (Tt), epidídimo (E), ovario (O), cerebro (Ce), corazón (Co), pulmón (P), hígado (H), intestino (I), bazo (B) y riñón (R). **B.** Detección de SPATS1 mediante inmunohistoquímica y microscopía confocal sobre cortes histológicos de testículo (a), hígado (b), riñón (c) y ovario (d) de ratas de 40 días de edad. e: control negativo con suero preinmune sobre cortes de testículo. La señal de SPATS1 se ve en verde, y los núcleos en rojo (TOPRO-3, intercalante de ADN). Las barras corresponden a 100 μ m. Fuente: [Capoano et al., 2010](#).

Por otro lado, los ensayos de Western blot detectaron dos bandas en los lisados de testículos de ratas pre-púberes de 12, 18 y 21 días posparto (dpp), y trazas en las de 27 dpp (púberes), no encontrándose señal en los testículos de individuos de 40 dpp (adultos). La banda de menor peso molecular poseía el peso molecular predicho para esta proteína (31 KDa). Con respecto a la otra banda (la de mayor peso molecular, 39 KDa), la misma desapareció luego de incubar los lisados testiculares con fosfatasa alcalina, indicando que

esta banda era producida por la fosforilación de la proteína; esto permitió deducir que SPATS1 era una proteína altamente fosforilable. Debido a que la proteína SPATS1 tiene un largo tramo de serinas, que estos tramos suelen ser fosforilados por kinasas, y dada la diferencia en la migración de la banda fosforilada con respecto a la banda sin fosforilar, dedujimos que SPATS1 sería fosforilada en dicho tramo de serinas. Además, el no haberse detectado formas intermedias de fosforilación nos permite suponer que SPATS1 se fosforilaría en todo el tramo de serinas, a modo de “todo o nada” (Capoano *et al.*, 2010).

SPATS1 se expresa temprano en el desarrollo del testículo, comenzando a detectarse en el embrión de 17 días “post-coitum” (dpc) (Figura I.4A), se acumula durante el desarrollo posnatal, y alcanza su máxima expresión en los testículos de 21 dpp, coincidiendo con el inicio de la primera meiosis, en la primera onda espermatogénica. Luego, la señal disminuye rápidamente hasta niveles más bajos en el adulto (40 días)(Figura I.4B).

La presencia de la proteína se detectó principalmente en los espermátocitos. Se detectó señal también en el citoplasma de las células de Sertoli, espermátogonias, y en menor cantidad en las espermátidas redondas, no detectándose señal en las espermátidas en elongación ni en los espermatozoides. También se detectó señal en el citoplasma de las células mioideas que rodean al túbulo seminífero. Curiosamente, en los espermátocitos primarios también se observó señal de SPATS1 en el núcleo además del citoplasma (ver Figura I.4C). Estos resultados, junto con la elevada expresión de la proteína en los espermátocitos de testículos de 21 dpp, nos sugirieron la posibilidad de que esta proteína tuviera una función específica en estas células, y que dicha función pudiera requerir el ingreso al núcleo, mediado por la señal de localización nuclear. Asimismo, hipotetizamos que el tramo de serinas y su fosforilación pudieran estar, de algún modo, vinculados a la función de la proteína.

Por otra parte, los elevados niveles de expresión de esta proteína así como la importante conservación evolutiva de la misma (ver “Resultados”) nos permitieron sospechar que la función de SPATS1, cualquiera que ella fuera, podría ser importante para la espermatogénesis y/o el desarrollo testicular. Sin embargo, no se realizaron estudios funcionales, por lo cual estas ideas quedaron en el plano especulativo.

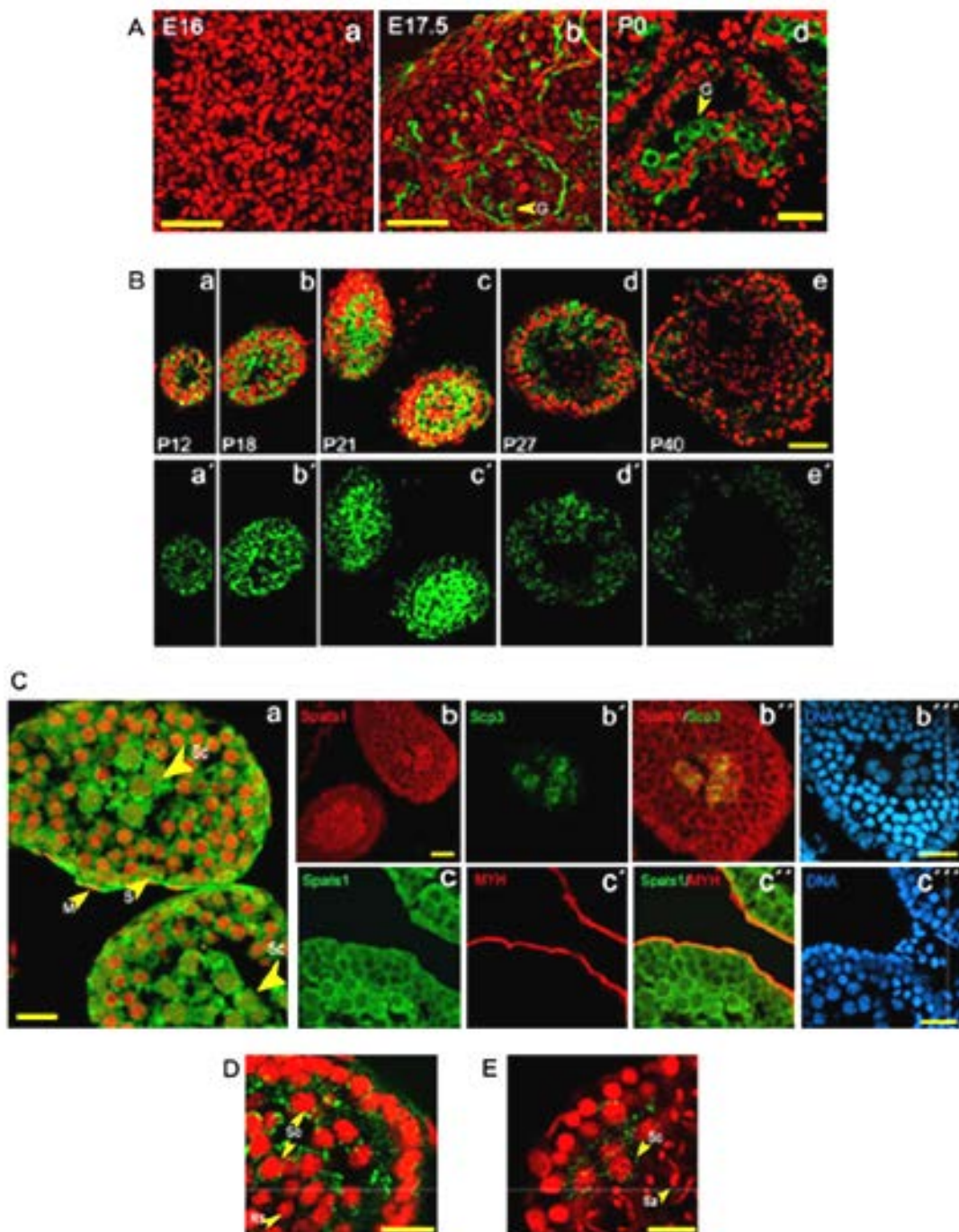


Figura 1.4. A. Expresión de SPATS1 durante el desarrollo embrionario de la rata, analizada por inmunohistoquímica confocal fluorescente, en criosecciones transversales de túbulos seminíferos. a: 15.5–16 días post-coito (dpc: E16); b: 17.5–18 dpc (E17.5); c: 20 dpc (E20); y d: 0 dpp (P0), Las criosecciones de testículo fueron teñidas con anticuerpo policlonal anti-SPATS1 (verde) y TOPRO-3 (rojo). Las puntas de flecha indican gonocitos (G). Las barras amarillas corresponden a 100 μ m. B. Expresión de SPATS1 durante la primera onda espermatogénica. Se muestran criosecciones transversales de túbulos seminíferos de ratas de 12 (P12), 18 (P18), 21 (P21), 27 (P27) y 40 (P40) dpp, incubadas con anti-SPATS1 (verde) y TOPRO-3 (rojo) (imágenes a–e). Las imágenes a’–e’ muestran la señal de SPATS1 sola. Barra: 100 μ m. C. a. Detalle de la expresión de SPATS1 en criosecciones de testículo de rata de 21 dpp. Los preparados fueron teñidos con anti-SPATS1 (verde) y los núcleos con TOPRO-3 (rojo). Las puntas de flecha señalan espermatocitos (Sc), Sertoli (S) y células mioideas peritubulares (M). b–b’’: co-inmunomarcado para SPATS1 (rojo) y SYCP3 (verde) como marcador del complejo sinaptonémico (marcador de espermatocitos en profase I). Las imágenes c–c’’ muestran co-inmunomarcados para SPATS1 (verde) y miosina (MYH, rojo) como marcador de células mioideas. En b’’’’ y c’’’’ se muestran los núcleos celulares marcados con DAPI (Azul). D y E: expresión de SPATS1 en criosecciones de testículos de rata de 27 y 40 dpp, respectivamente. Las puntas de flecha señalan espermatocitos (Sc), espermátidas redondas (Rs) y espermatozoides (Sz). Las barras en C, D y E corresponden a 25 μ m. Fuente: [Capoano et al., 2010](#).

2.B. SPATS1 y la vía Wnt

La vía de señalización canónica Wnt/ β -catenina (CTNNB1) está involucrada en varios procesos del desarrollo embrionario como la formación de los huesos y músculos, determinación del sexo (Sekido *et al.*, 2008), diferenciación de la notocorda, y determinación del linaje de células madre de múltiples tejidos. También estimula la proliferación mitótica de células madre, como los ovocitos (Chassot, 2011) y las espermatogonias (Takase y Nusse, 2016).

Los componentes principales de señalización intracelular de la vía son el eje Axina / GSK / β -catenina y los factores activadores de transcripción TCF/LEF. La β -catenina es una molécula con una función dual (Grigoryan *et al.*, 2008). Por un lado es un componente de las uniones adherentes, donde participa en el anclaje de las cadherinas al citoesqueleto de actina (ver Figura I.2B). A su vez, como integrante de la vía Wnt, puede ser estabilizada y translocada al núcleo, donde participa en la regulación de la expresión de varios genes (Herms *et al.*, 2010).

En ausencia de una señal Wnt, la β -catenina libre en el citoplasma (es decir, que no está participando en las uniones adherentes) es blanco del "complejo destructor de β -catenina", consistente en la glucógeno sintasa quinasa (GSK) 3 β , el supresor tumoral adenoma poliposis coli (APC), y la proteína de andamiaje Axina. Este complejo fosforila a la β -catenina, marcándola para su degradación por el proteasoma (Figura I.5). Por el contrario, la activación de la vía Wnt se da mediante la unión de un ligando WNT, como WNT4 (se conocen dieciséis proteínas WNT en ratón y humano) en la membrana plasmática, a un complejo multiproteico compuesto de un receptor Frizzled y otros co-receptores, como LRP5. En ese caso, la Axina es reclutada a la membrana por Dvl (dishevelled), quien desarma el complejo GSK3 / APC / Axina y bloquea la degradación de la β -catenina, que pasa a ser estabilizada en el citoplasma. Esta estabilización permite que la proteína se acumule y se transloque al núcleo, donde forma un complejo con los factores de transcripción TCF4/LEF (ver Figura I.5). Dicho complejo permite la activación de varios genes blanco de la vía, los cuales varían según el tipo y contexto celular (McDonald *et al.*, 2009; Lau *et al.*, 2014), si bien algunos de los más comunes son *Lef1*, *Tcf1*, ciclina *D1*, y *c-Myc* (Hurlstone y Clevers, 2002; Kumar *et al.*, 2016).

En el núcleo, varios factores han sido identificados para regular la formación del complejo activado TCF4 / β -catenina (Hurlstone *et al.*, 2002). Estos reguladores se agrupan en co-activadores (Incluyendo APPL1/2, Dvl, c-Jun, Bcl9/legless y Pygopus) y "destructores",

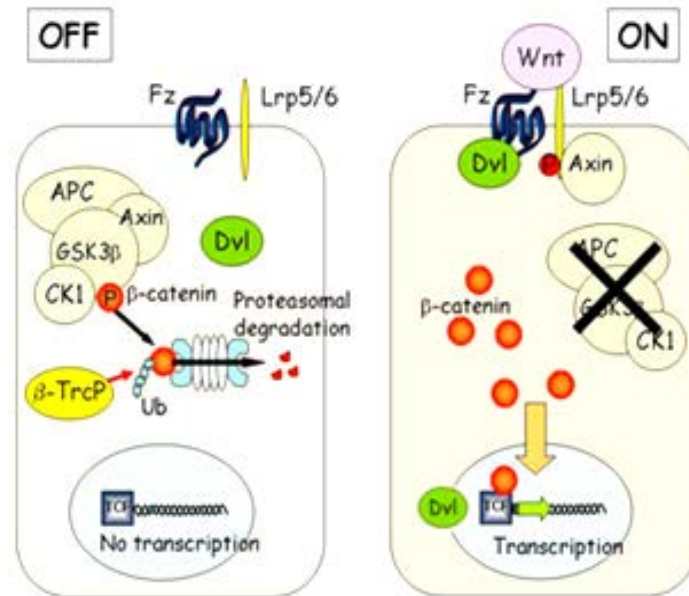


Figura 1.5. Esquema de interacciones moleculares de la vía Wnt, el complejo APC y la β -catenina. En el estado apagado (OFF), la β -catenina se une al complejo APC y éste es destruido, por lo cual no hay activación de los factores de transcripción TCF. Cuando un ligando Wnt se une al receptor Frizzled (Fz) en la superficie celular, se activa la cascada Wnt / β -catenina (ON), la β -catenina es liberada del complejo APC, se transloca al núcleo, se une con TCF4 y activa una cascada de genes relacionados con la división celular. Fuente: Zhang *et al.*, 2010.

como HDAC1/2, APC, e ICAT. Los co-activadores estabilizan la asociación de TCF4 y β -catenina, mientras que los destructores destruyen el complejo TCF4 / β -catenina, ya sea promoviendo la degradación de la β -catenina o compitiendo con ella bajo ciertas circunstancias. En definitiva, la expresión dominante de los reguladores mantiene la señalización Wnt activada, o inhibida. Cuando la β -catenina es marcada para degradación, muchos co-represores incluyendo Groucho, CBP y CtBP se unen firmemente a TCF4, para silenciar la actividad de TCF4 como factor de transcripción (Cavallo *et al.*, 1998).

Por otra parte, la transcripción de muchos genes relacionados con el crecimiento de tumores se inicia por la vía Wnt / β -catenina. A modo de ejemplo, defectos en esta vía se han relacionado con el cáncer de colon (Cabrera *et al.*, 2005). La mayoría de las mutaciones encontradas en pacientes con poliposis familiar hereditaria (FAP) son mutaciones sin sentido que generan proteínas APC truncadas, y el resto son mutaciones que producen ganancia de función génica de β -catenina, que ocasionan que la β -catenina no sea degradada y se acumule en el citoplasma celular. La β -catenina libre es translocada al núcleo celular donde interacciona con el factor de transcripción TCF4, activando la expresión de oncogenes como *c-Myc* y ciclina *D1*, críticos en la proliferación y transformación de las células epiteliales colónicas (Zhang *et al.*, 2010).

La vía canónica Wnt ha sido asociada desde hace tiempo con el desarrollo gonadal, donde WNT4 y su efector β -catenina desempeñan un rol central en la diferenciación del ovario (Tevosian y Manuylov, 2008). En la gónada fetal femenina, la vía de señalización RSPO1 / WNT / CTNNB1 está implicada en la proliferación y diferenciación de las células germinales primordiales en las células germinales femeninas, capaces de entrar en la meiosis.

La vía Wnt / CTNNB1 es también importante en el desarrollo testicular, aunque su rol ha sido bastante más controversial. Por un lado, se ha visto que la activación constitutiva de β -catenina en células de Sertoli resulta en pérdida de capacidad de mantener la espermatogénesis, aunque los reportes son contradictorios en relación al momento del desarrollo en que este efecto se observa, yendo desde la vida embrionaria hasta la adultez (Boyer *et al.*, 2008; Chang *et al.*, 2008; Tanwar *et al.*, 2010). Por otro lado, evidencia creciente sugiere que tanto la disrupción así como la sobreexpresión de la vía Wnt específicamente en la línea germinal masculina afectarían la espermatogénesis, si bien existen algunas inconsistencias en relación al fenotipo concreto y al momento en que éste se manifiesta (Chang *et al.*, 2011; Kerr *et al.*, 2014; Chassot *et al.*, 2016; Kumar *et al.*, 2016). En conjunto, estos hallazgos demuestran que en la actividad de señalización de Wnt / CTNNB1, es necesaria una sincronización finamente sintonizada para un correcto desarrollo del testículo y para el progreso de la espermatogénesis.

Con respecto a Dvl, de lo expuesto más arriba se desprende que actúa como regulador positivo de la vía Wnt, tanto a nivel citoplasmático como nuclear. Se trata de una familia de proteínas que tanto en ratón como en humano tienen tres homólogos muy relacionados (Dvl1, 2 y 3) que comparten tres dominios conservados (Gao y Chen, 2010). En un intento de aclarar el papel de Dvl en la vía Wnt, se efectuaron experimentos de interacción proteína-proteína a partir de librerías de ADNc de embriones de ratón de 11,5 dpc, en los que se utilizó la proteína Dvl2 de ratón como carnada. Estos experimentos identificaron una proteína de unión a uno de los dominios de Dvl. La proteína identificada, denominada en primera instancia DDIP (*Disheveled-DEP domain Interacting Protein*, GenBank ID: AY336501.1), resultó ser SPATS1 (Zhang *et al.*, 2010). Mediante expresión a partir de diversas construcciones transfectadas en cultivos de células somáticas HEK293T (células embrionarias de riñón humano), en el mencionado trabajo se concluyó que SPATS1 inhibiría la señalización la vía Wnt, promoviendo la degradación del complejo TCF4 a través de la vía del proteosoma. Observaron además que SPATS1 era capaz de inhibir la

proliferación en líneas celulares que tenían acumulación constitutiva de β -catenina, lo que llevó a la conclusión de que SPATS1 podría regular negativamente la proliferación de células, al inhibir la vía de señalización Wnt. Proteínas SPATS1 deletadas, carentes de su parte media (aminoácidos 109-209), eran incapaces de interactuar con Dvl2, en tanto se requería la proteína SPATS1 completa para promover la degradación de TCF4, ya que proteínas mutantes a las que les faltara tanto la región amino-terminal, carboxilo-terminal, o la región central, perdían esa capacidad.

3. MÉTODOS DE GENERACIÓN DE RATONES *KNOCKOUT* (KO)

3.A. Los ratones KO

El ratón es el principal organismo modelo para la comprensión de la función de los genes de los mamíferos. Los ratones son animales experimentales útiles porque son pequeños, tienen períodos de vida relativamente cortos, y son prolíficos. Además, los ratones actúan como un buen análogo para la mayoría de los procesos biológicos humanos ya que ambas especies comparten alrededor del 99% de los genes (Capecchi, 1994).

En la mayoría de los casos, la función de un gen no puede dilucidarse simplemente por la secuencia de aminoácidos de su proteína o examinando a los miembros familiares cercanos. La inactivación de genes es la mejor manera de delinear el rol biológico de un gen y su proteína (Bradford *et al.*, 2009). Por lo tanto, para los genetistas la eliminación selectiva de un gen en un ratón proporciona un medio importante para determinar el papel biológico de un determinado gen o alelo. En ese sentido, el ratón KO ha sido una herramienta valiosa para los genetistas para discernir el papel de un gen, tanto durante el desarrollo embrionario como en la homeostasis fisiológica normal.

Algunos ratones KO han servido como valiosos modelos animales para las enfermedades genéticas humanas. Cuando se encuentra una mutación humana que desactiva una proteína, el ratón KO correspondiente puede ser un recurso importante para estudiar la fisiopatología subyacente, y para desarrollar terapias para tratar una enfermedad genética (Majzoub y Muglia, 1996). En lugar de simplemente desactivar un gen, sin embargo, algunas enfermedades genéticas resultan en la expresión de una proteína mutada. Mutaciones puntuales, micro-delecciones, o inserciones, son a menudo responsables de muchas enfermedades genéticas. Además de bloquear un gen, como en la mayoría de los ratones KO, se puede reproducir en la proteína del ratón la correspondiente sustitución,

delección o inserción de aminoácidos para replicar la enfermedad humana, y los efectos de la proteína alterada pueden ser estudiados en el modelo animal.

En algunos modelos de ratones KO, la gravedad del fenotipo puede impedir el análisis de un gen en la organogénesis de un tejido en particular. Por ejemplo, en alrededor del 15% de todos los KO, los ratones tienen mutaciones que resultan en la letalidad durante el desarrollo. En ese caso, se puede proceder a la generación de KO condicionales (Bradford *et al.*, 2009).

3.B. Gene Targeting y Recombineering

Una metodología para lograr obtener ratones KO se basa en construir un vector direccionador (*targeting vector*) capaz de modificar el genoma de una célula madre embrionaria (célula ES), que luego va a ser implantada en un cigoto.

La técnica de *gene targeting*, desarrollada en 2003, permite la introducción de mutaciones en *loci* genéticos específicos del ratón. El proceso de generar ratones con mutaciones dirigidas (*targeted mutations*) fue desarrollado a partir de dos descubrimientos muy importantes: la recombinación homóloga, y el aislamiento de células madre embrionarias de ratón (células ES).

La tecnología de la recombinación homóloga es usada ampliamente para la generación de animales KO. Este abordaje es conocido como *Recombineering* (***recombination-mediated genetic engineering***), por oposición a un método más antiguo, basado en el uso de enzimas de restricción y ligasas para la combinación de secuencias de ADN en un orden determinado. Su principal ventaja con respecto a aquel, radica en que no requiere de la presencia de sitios únicos de restricción convenientemente posicionados en la región a modificar (Lee *et al.*, 2009).

La recombinación homóloga es un mecanismo que participa en la reparación del ADN, y que es empleado en *gene targeting* para insertar una mutación pre-diseñada en el *locus* genético de interés. Esta técnica permite la clonación de grandes fragmentos de ADN en plásmidos mediante el uso de la maquinaria de recombinación homóloga en *E. coli*. El evento probablemente ocurre a través de la transferencia de cadenas por el grupo de proteínas de la familia RAD52 (Rijkers *et al.*, 1998; Vasquez *et al.*, 2001). A través de la recombinación homóloga, una construcción de ADN portadora de una mutación puede ser dirigida hacia su *locus* genético homólogo, y el sistema de reparación del ADN es capaz de

alinear estas construcciones y recombinar en el cromosoma la construcción de manera específica (ver Figura VIII.1 del Anexo 1).

Se vio que la recombinación homóloga en *E. coli* se volvía mucho más eficiente mediante el uso de proteínas codificadas por bacteriófagos, como las producidas por los genes *Red* en el bacteriófago Lambda, las cuales permiten la inserción de fragmentos de ADN doble hebra en plásmidos BACs o cromosomas, via recombinación homóloga. Los genes que codifican estas proteínas y permiten la recombinación homóloga se llaman *Exo*, *Bet* y *Gam*. Estos genes fueron clonados en el cromosoma de la cepa EL350 de *E. coli*, donde se pusieron bajo dominio de un promotor inducible por temperatura. A 32°C la expresión de estos genes en la cepa SW102 es indetectable, pero a 42°C en sólo 10-15 minutos la expresión es muy alta (Liu *et al.*, 2003).

Para que la recombinación ocurra en una célula, se requiere una región de homología de alrededor de 2 kb de secuencia (Melton, 2002). Sin embargo, de 6 a 14 kb de secuencia de homología es lo típicamente utilizado para las construcciones de *gene targeting*. Además, se encontró que el ADN lineal era el sustrato preferido para las proteínas recombinantes (Hasty *et al.*, 1992). Si bien se transforman millones de células, el evento objetivo se lleva a cabo en un pequeño porcentaje de células, ya que la recombinación homóloga ocurre aproximadamente mil veces menos que las inserciones aleatorias (Sargent y Wilson, 1998).

La electroporación es la forma más efectiva de introducir los vectores recombinantes en un gran número de células madre. Sin embargo, la eficiencia de transformación es baja (10^{-3}), y por lo tanto se necesita un marcador de selección positiva para enriquecer clones que han insertado el vector objetivo en su genoma (Ledermann, 2000).

La mayoría de los experimentos de direccionamiento utilizan vectores de sustitución (ver Figura VIII.3. en Anexo 1), que han sido particularmente útiles para la generación eficiente de ratones KO. En el diseño de un vector de sustitución, el marco de lectura abierto de un clon genómico se ve interrumpido por la colocación de un marcador de selección por antibióticos, que funciona para la selección positiva de células que han integrado el vector direccionador (*targeting vector*) en su cromosoma. Ocurren dos eventos de recombinación homóloga para insertar el vector direccionador que contiene el gen de resistencia a fármacos en un *locus* genético homólogo (Figura VIII.1. del Anexo 1). La neomicina, un aminoglucósido que interfiere con la síntesis de proteínas en células eucariotas, es el fármaco más comúnmente usado para la selección positiva. La integración del gen neomicina-fosfotransferasa (Neo^r) permite la resistencia a la neomicina.

Mansour et al. (1988) establecieron una técnica de selección negativa de recombinación inespecífica mediante la colocación en los vectores, del gen de timidina quinasa del virus del herpes simple (HSV - tk), adyacente a uno de los brazos que contiene homología dirigida a un *locus* genético. Los vectores que se integran aleatoriamente, normalmente contienen el gen HSV-tk intacto cuando se insertan en el genoma. Las células con integrantes aleatorios son eliminadas durante la selección negativa mediante el tratamiento con ganciclovir o FIAU [1-(2'-desoxi-2'-Fluoro-β-D-arabinofuranosil)-5-iodouracilo], compuestos que requieren fosforilación por HSV-tk para inhibir la síntesis de ADN. Puede producirse un enriquecimiento de 2.000 veces del clon objetivo con este tipo de vector. Sin embargo, incluso con la selección positiva y negativa, un número sustancial de los clones celulares que surgen en el cultivo son falsos positivos ya que HSV-tk puede ser inactivado antes de la recombinación, por eventos como deleciones parciales.

Al diseñar un vector direccionador, deben considerarse algunos factores que podrían generar un KO incompleto. Un gen puede expresarse de forma residual si existen promotores alternativos o crípticos que no se interrumpen en el alelo diana (**Müller, 1999**). Además, un procesamiento diferencial del ARNm podría también generar especies de ARN donde se omite el marcador de selección.

3.C. Introducción a *gene trap*

El *gene trapping* o trampa genética, es un método de generación de células ES con mutaciones insercionales aleatorias, pero bien caracterizadas. La mutación se genera insertando una construcción de vector de “trampa génica” en una región intrónica del ADN genómico (**Stanford et al., 2001**).

El elemento principal de estos vectores es un casete consistente en un gen reportero sin promotor y/o un marcador genético seleccionable, flanqueado por un sitio aceptor de procesamiento 3' corriente arriba y una secuencia de poliadenilación corriente abajo. Al quedar inserto en un intrón de un gen expresado, el casete de trampa génica pasa a ser transcrito a partir del promotor endógeno de ese gen bajo forma de un transcripto de fusión, en el cual el exón corriente arriba del sitio de inserción es procesado en fase con el gen reportero o marcador seleccionable. Dado que la transcripción se termina prematuramente en el sitio de poliadenilación insertado, el transcripto de fusión codificará una versión trunca, no funcional, de la proteína celular conteniendo el reportero/marcador seleccionable. En consecuencia, la trampa génica simultáneamente inactiva el gen y provee

una marca (etiqueta) para la rápida identificación del gen interrumpido, en su sitio de inserción (Figura I.6).

Las líneas celulares de *gene trap* contribuyen a la línea germinal, produciendo cepas de ratón mutantes muy útiles para la caracterización funcional de los genes. Aunque la inserción de la construcción de vector en una región génica típicamente resulta en la inactivación completa del gen "atrapado" (un alelo nulo), esto no está garantizado. En algunos casos, la inserción de un vector puede fallar en inactivar un gen, o resultar en un fenotipo negativo dominante. Generalmente, es más probable que la inserción del vector cerca del extremo 5' de un gen pero corriente abajo de la región no traducida 5' cree un alelo nulo, que la inserción cerca del extremo 3'.

El *International Gene Trap Consortium* (IGTC) representa y centraliza todas las líneas celulares de trampa de genes disponibles públicamente, las cuales se distribuyen de forma no colaborativa por cargos nominales de manejo. Los investigadores pueden encontrar genes atrapados de interés en el sitio web de IGTC (www.genetrap.org) y ordenar líneas celulares para la generación de ratones mutantes, lo que permite ahorrar tiempo y gastos. Estas células ES pueden ser empleadas para la generación de ratones mutantes a través de la inyección directa en blastocistos de ratón (Nord *et al.*, 2006). Actualmente, el IGTC está localizado en el portal del *Mouse Biology Program* (MBP), en la Universidad de California Davis (<https://www.komp.org/index.php?link=1>).

La actividad del consorcio IGTC consistió en la utilización del método de *gene trap* a nivel masivo para producir mutaciones en el genoma. Luego se secuenciaron, en cada caso, las regiones flanqueantes al casete de trampa génica, para determinar en qué gen se había insertado el casete, y esos datos se anotaron. Es así que el consorcio generó 121.703 líneas celulares ES de trampa génica (www.genetrap.org), en la cepa de ratón C57BL/6N. La cepa C57 BL/6 (por C57 "black 6", conocida comúnmente como B6) es una línea de ratones endocriados de color marrón oscuro, casi negro. Consiste en el fondo genético más ampliamente utilizado para la generación de ratones genéticamente modificados, por ejemplo para su empleo como modelos de enfermedad humana, y su genoma se encuentra enteramente secuenciado. De sus dos subcepas, 6N (establecida en el *National Institute of Health*) y 6J (mantenida en *The Jackson Laboratory*), la subcepa 6N fue la escogida por el *Knockout Mouse Project* para la generación de ratones KO (<https://www.jax.org/news-and-insights/2013/april/a-tool-for-telling-apart-c57bl-6j-versus-c57bl-6n-substrains>).

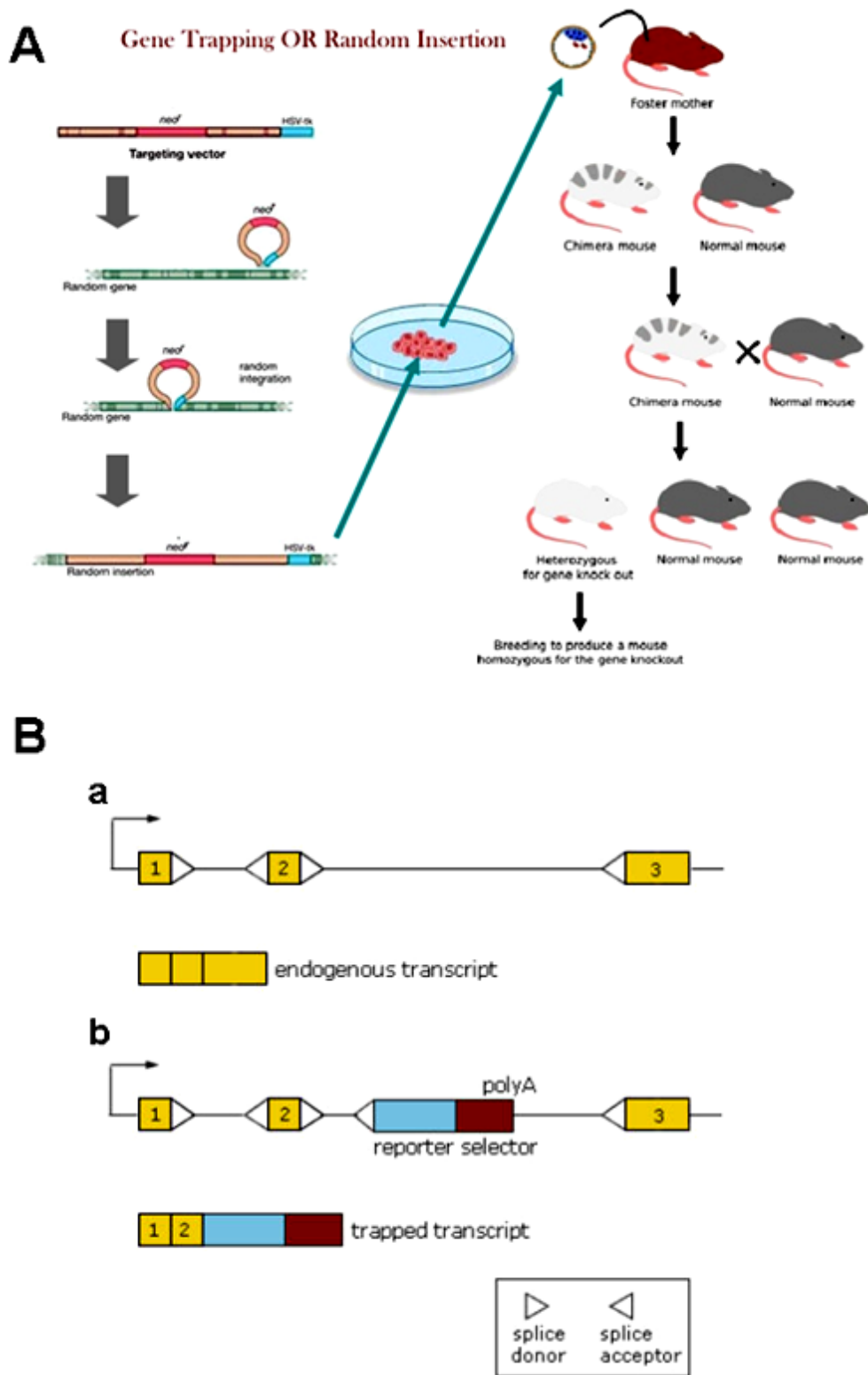


Figura I.6. A. Esquema de funcionamiento de la técnica *gene trap*. A la izquierda se muestra un esquema de construcción de la línea celular bloqueada, mediante la inserción de un *targeting vector* en una zona al azar del ADN celular. Los clones resultantes son analizados y aislados. A la derecha se muestra un esquema de cómo se procede una vez obtenido el *gene trap* de interés, para generar un ratón KO. Primero se aísla el clon *gene trap* de interés, se microinyecta dentro mórulas o blastocistos de ratón, y éstos se implantan en hembras pseudopreñadas. Luego se realizan cruzamientos hasta obtener el ratón $KO^{-/-}$ homocigota para la inserción. **B.** Ejemplificación de un gen endógeno y su transcrito (a), en comparación con el mismo gen interrumpido por un casete de trampa génica, y su transcrito aberrante (b). Los números representan exones y las líneas rectas, intrones. Los triángulos representan sitios dadores y aceptores de procesamiento. Fuente: *German Gene Trap Consortium* (http://genetrapp.helmholtz-muenchen.de/ggtc/info/gt_method/intro.php).

3.D. Sistemas de edición de genomas

3.D.a. Introducción a los sistemas de edición de genomas

Como hemos mencionado, la capacidad de introducir cambios dirigidos en la secuencia genómica en células vivas y organismos complejos proporciona una poderosa herramienta para la investigación biológica, así como una potencial vía para la terapia de enfermedades genéticas.

Sin embargo, durante muchos años las estrategias para introducir eficazmente alteraciones precisas y dirigidas al genoma se limitaron sólo a ciertos organismos (por ejemplo, la utilización de recombinación homóloga en levaduras, o recombinación en ratones), y a menudo requerían marcadores seleccionables por fármacos o dejaban secuencias “cicatrices” (por ejemplo, sitios loxP residuales de la escisión mediada por la recombinasa Cre).

La edición de genes usando nucleasas dirigidas proporciona un nuevo método general para introducir deleciones selectivas, inserciones y cambios de secuencia precisos, en una amplia gama de organismos y tipos de células. La alta eficacia de la edición del genoma evita la necesidad de secuencias adicionales tales como los genes marcadores de resistencia a los fármacos, y por lo tanto la necesidad de manipulaciones adicionales para eliminarlos (Jeffrey *et al.*, 2014).

Un primer paso crucial para la realización de la edición dirigida de genes es la creación de una ruptura de doble hebra de ADN (*double strand break*, DSB) en el locus genómico a ser modificado (Carrol *et al.*, 2011). Los primeros métodos para dirigir las nucleasas que inducen DSBs a sitios genómicos específicos se basaban en sistemas centrados en proteínas con especificidades de unión al ADN personalizables tales como meganucleasas, nucleasas con dedos de zinc (ZFN), y nucleasas efectoras similares a activadores de transcripción (TALENs) (Carrol *et al.*, 2011). Estas plataformas han permitido avances importantes, pero cada una tiene su propio conjunto de ventajas y desafíos asociados.

Más recientemente, se ha desarrollado una nueva plataforma basada en el sistema bacteriano CRISPR/Cas9, que es única y flexible debido a que utiliza una secuencia corta de ARN como guía que dirige a la nucleasa a una secuencia de ADN deseada. A diferencia de las plataformas ZFN y TALEN que utilizan las interacciones proteína-ADN para la focalización, estas nucleasas dirigidas por ARN utilizan las simples reglas de apareamiento de bases entre

un ARN diseñado y el sitio de ADN blanco complementario, para localizar el sitio que se desea editar.

3.D.b. Desde el sistema inmune bacteriano CRISPR/Cas hasta las nucleasas guiadas por ARN

Los sistemas CRISPR (*clustered regularly interspaced short palindromic repeats*) son mecanismos inmunitarios adaptables utilizados por muchas bacterias para protegerse de ácidos nucleicos extraños, como virus o plásmidos (Horvath *et al.*, 2010; Wiedenheft *et al.*, 2012; Fineran *et al.*, 2012). El sistema CRISPR incorpora secuencias de ADN invasor entre secuencias de repetición CRISPR codificadas como matrices de repetidos dentro del genoma del huésped. Los transcritos de las matrices de repetición CRISPR se procesan en un ARN CRISPR (crRNA), cada uno de los cuales alberga una secuencia variable transcrita del ADN invasor, conocida como la secuencia, así como parte de la repetición CRISPR. En la versión más simple, que son los sistemas CRISPR de tipo II, cada crRNA se hibrida con un segundo ARN CRISPR transactivante (tracrRNA), y estos dos ARNs forman un complejo con la nucleasa Cas9. La porción codificada por el *protospacer* del crRNA dirige a Cas9 para escindir secuencias de ADN diana complementarias, si son adyacentes a secuencias cortas conocidas como "motivos adyacentes al *protospacer*" (PAMs). Las secuencias del *protospacer* incorporadas en el locus CRISPR no se escinden porque no están presentes junto a una secuencia PAM (Horii *et al.*, 2013).

El sistema CRISPR de tipo II de *Streptococcus pyogenes*, se ha adaptado para inducir DSBs específicos de secuencia y edición de genes dirigida (Jinek *et al.*, 2012). En su forma más simple y ampliamente utilizada, dos componentes deben ser introducidos y/o expresados en células o en un organismo, para realizar la edición del genoma: el ARN codificante para la nucleasa Cas9, y un "ARN guía" (ARNg), que consiste en una fusión de un crRNA y un tracrRNA (secuencia constante, ver Figura 1.7A). Los 20 nucleótidos en el extremo 5' del ARNg (correspondientes a la secuencia *protospacer* del crRNA) dirigen a Cas9 a un sitio de ADN diana complementario específico, utilizando reglas de apareamiento de bases estándar de ARN-ADN. Estos sitios objetivo deben situarse inmediatamente 5' de una secuencia PAM que coincida con la forma canónica 5'-NGG, si bien se ha descrito también el reconocimiento en sitios con secuencias PAM alternativas (por ejemplo 5'-NAG), aunque con menor eficiencia (Jiang *et al.*, 2013; Pattanayak *et al.*, 2013). De este modo, con este

sistema, la actividad de la nucleasa Cas9 se puede dirigir a cualquier secuencia de ADN de la forma N20-NGG, simplemente alterando los primeros 20 nucleótidos del ARNg para que correspondan a la secuencia de ADN diana específica que se desea editar. También se han utilizado sistemas CRISPR tipo II de otras especies de bacterias que reconocen secuencias PAM alternativas y que utilizan diferentes secuencias de crRNA y tracrRNA, para realizar la edición dirigida de genes (Gasiunas *et al.*, 2012; Esvelt *et al.*, 2013; Hou *et al.*, 2013).

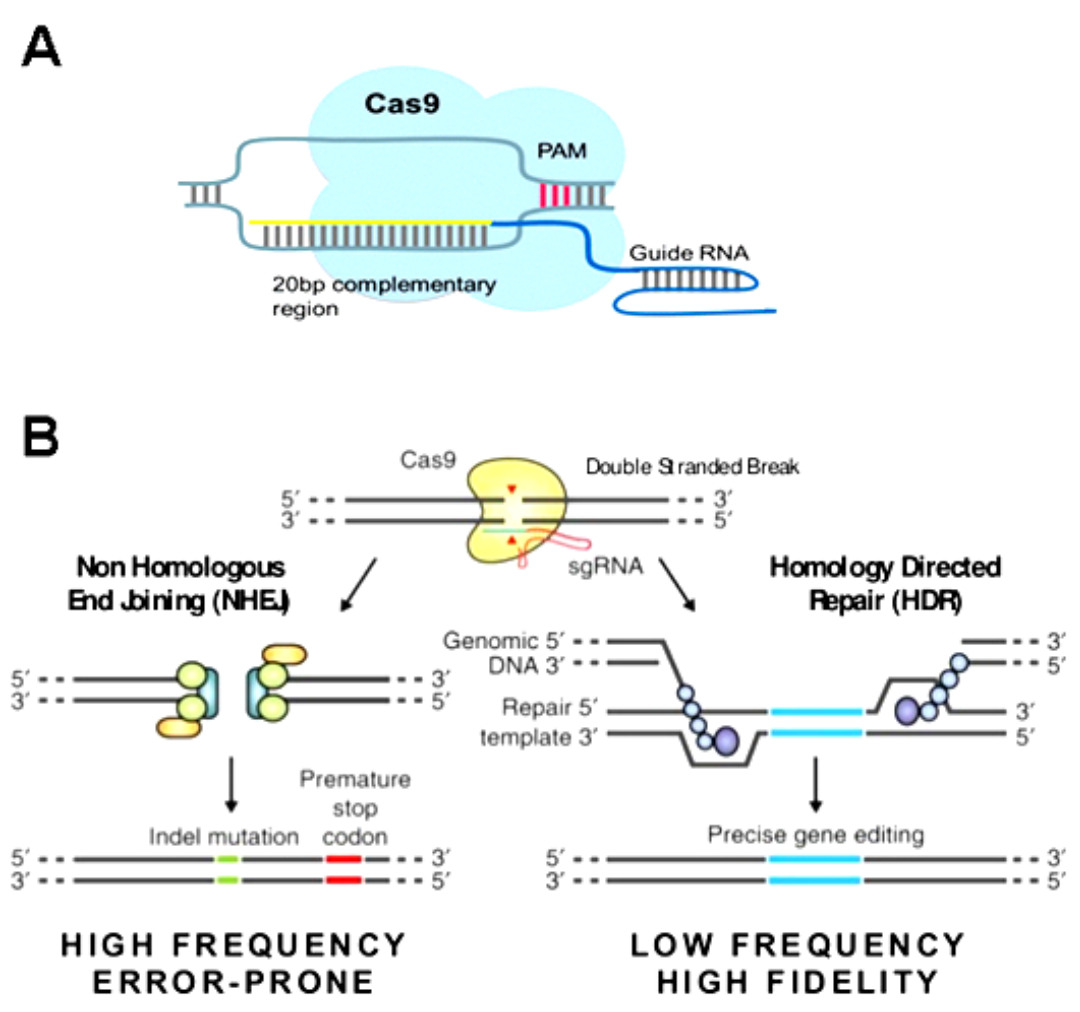


Figura I.7. A. Esquema de ARN guía y su interacción con el ADN diana. El ARN guía (ARNg) se compone de una secuencia constante (Azul, tracrRNA), y las 20 bases complementarias específicas del sitio que se desea alterar (crRNA, amarillo). Imagen obtenida de www.tigm.org. **B.** Los DSBs inducidos por Cas9 (amarillo) pueden repararse de dos formas. En la vía de reparación con errores (NHEJ), los extremos de una DSB son procesados por la maquinaria endógena de reparación y ligados, lo que puede resultar en mutaciones de tipo “indel” en el sitio de ligación. Cuando estas mutaciones ocurren en regiones codificantes de un gen, pueden producir cambios en el marco de lectura y generación de codones STOP, produciendo un KO. Alternativamente, se puede suministrar un molde para reparación de modo de inducir la vía de reparación homóloga (HDR), lo que permite la edición precisa y con alta fidelidad. Los cortes en una sola hebra también pueden inducir HDR. Fuente: Ran *et al.*, 2013.

Los DSBs producidos por la nucleasa Cas9, pueden ser reparados por una de al menos dos vías diferentes que son operativas en casi todos los tipos de células y organismos: reparación no homóloga (NHEJ) y reparación dirigida por homología (HDR). La NHEJ puede conducir a la introducción eficiente de mutaciones de inserción/delección (“*indels*”) de varias longitudes, que pueden interrumpir el marco de lectura traduccional de una secuencia codificante o los sitios de unión de factores de acción en *trans* en promotores o potenciadores. La reparación mediada por HDR puede usarse para introducir mutaciones puntuales específicas, o para insertar las secuencias deseadas mediante la recombinación del *locus* diana, utilizando ARNs molde suministrados adicionalmente (Figura 1.7B).

Las frecuencias de estas alteraciones son mucho mayores que por los métodos previamente descritos: típicamente superiores al 1% y, en algunos casos, pueden ser del 50% o superiores. Las modificaciones a estos niveles permiten la identificación de las mutaciones deseadas mediante un cribado simple, como hemos mencionado, sin necesidad de selección de marcadores de resistencia a fármacos (Gasiunas *et al.*, 2012).

Después de las demostraciones iniciales de que Cas9 podría ser programada para cortar varios sitios de ADN *in vitro* (Jinek *et al.*, 2012), una serie de artículos publicados mostraron que esta plataforma también funcionaba eficientemente en una gran variedad de células y organismos. Los estudios iniciales de prueba de concepto demostraron que Cas9 podría ser dirigida a genes endógenos en bacterias (Jiang *et al.*, 2013), líneas celulares de cáncer humanas transformadas cultivadas y células madre pluripotentes humanas en cultivo (Cong *et al.*, 2013; Cho *et al.*, 2013; Jinek *et al.*, 2013; Mali *et al.*, 2013), así como en un organismo entero, el pez cebra (Hwang *et al.*, 2013). Posteriormente, Cas9 se ha utilizado para alterar genes en la levadura (DiCarlo *et al.*, 2013), tabaco (Li *et al.*, 2013; Nekrasov *et al.*, 2013), arroz (Shan *et al.*, 2013; Xie *et al.*, 2013), trigo (Shan *et al.*, 2013), ratones (Shen *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2013), ratas (Li *et al.*, 2013), conejos (Yang *et al.*, 2014), ranas (Nakayama *et al.*, 2013), moscas de la fruta (Bassett *et al.*, 2013; Yu *et al.*, 2013) y gusano de seda (Wang *et al.*, 2013), entre otros.

Los DSBs inducidos por Cas9 se han utilizado para introducir mutaciones de tipo “*indel*” mediadas por NHEJ así como para estimular HDR, tanto con ADN de plásmidos de doble cadena como con modelos de donantes de oligonucleótidos de cadena sencilla. La capacidad de introducir DSBs en múltiples sitios en paralelo utilizando el sistema Cas9 es una ventaja única de esta plataforma en relación con meganucleasas, ZFN o TALENs. Por ejemplo, la expresión de Cas9 y gRNAs múltiples se ha utilizado para inducir pequeñas o

grandes deleciones o inversiones entre los DSBs (Cong *et al.*, 2013; Horii *et al.*, 2013; Upadhyay *et al.*, 2013; Xiao *et al.*, 2013), para introducir simultáneamente mutaciones en tres genes en células de rata (Li *et al.*, 2013), en cinco genes en clones de células madre de ratón (Wang *et al.*, 2013), y en cinco genes en las células somáticas de un solo pez cebra (Jao *et al.*, 2013).

La simplicidad de la orientación de Cas9 también ha inspirado la generación de grandes bibliotecas de gRNA empleando la síntesis de oligonucleótidos en matriz (arrays). Estas bibliotecas pueden ser diseñadas para abarcar múltiples gRNAs para cada gen diana en un organismo huésped, facilitando en gran medida los estudios genéticos y selección de clones de interés específico con muchas alteraciones a la vez (Li *et al.*, 2013).

Las enormes ventajas que representa este sistema para la interrupción/modificación de genes frente a los otros sistemas previamente descritos (simplicidad, alta eficiencia de modificación, no necesidad de introducción de genes que dejen huella en el genoma, posibilidad de empleo en diversos tipos de células y organismos, posibilidad de *multiplexing*, etc.) han provocado que a partir de la publicación de los primeros trabajos en 2012 y 2013 (Jinek *et al.*, 2012; Cong *et al.*, 2013; Mali *et al.*, 2013), comenzara a surgir una verdadera revolución CRISPR que algunos ya comparan en importancia con el descubrimiento de la estructura del ADN, las enzimas de restricción, y la secuenciación completa del genoma humano (Bellver Capella, 2016).

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1. HIPÓTESIS

En base a los datos obtenidos en trabajos anteriores realizado por nuestro grupo (Geisinger et al. 2003; Capoano et al., 2010), creemos que la proteína *SPATS1* tendría un rol vinculado a la organización de la estructura del túbulo seminífero y/o a la progresión de la espermatogénesis.

2. OBJETIVOS

2A. OBJETIVO GENERAL

Elucidar la función de la proteína *SPATS1*, contribuyendo, de ese modo, al conocimiento original sobre la expresión génica durante el desarrollo del testículo y la espermatogénesis de los mamíferos.

2B. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 2B.1.** Obtener el mayor caudal de información posible sobre *SPATS1* a partir del material disponible en bases de datos, y empleo de diversas herramientas bioinformáticas para la realización de estudios *in silico*, de modo de intentar contribuir al conocimiento sobre esta proteína y, eventualmente, sobre la función de la misma.
- 2B.2.** Generar ratones *knockout* (KO) para el gen *Spats1*.
- 2B.3.** Contribuir a la comprensión de la función de *SPATS1* en relación con la espermatogénesis y el desarrollo normal del ratón a través de la caracterización fenotípica de los ratones KO generados en el punto anterior, es decir, estudiar el efecto ocasionado por la pérdida de función de *SPATS1*.
- 2B.4.** Contribuir a la comprensión de la función de *SPATS1* a través de la identificación de posibles proteínas interactuantes con ella.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. ESTUDIOS BIOINFORMÁTICOS, MINERÍA DE DATOS

El Proceso de edición de secuencias de ADN y ARN se realizó mediante la herramienta Bioinformática BioEdit. Los alineamientos múltiples de secuencias se efectuaron empleando la herramienta ClustalW. La secuencia de referencia utilizada fue la tomada del GenBank para *Spats1* de *Mus musculus*. Las traducciones conceptuales se hicieron con la herramienta *translate tool* del portal de herramientas bioinformáticas ExpASy (*Expert Protein Analysis System*, http://web.expasy.org/cgi-bin/translate/dna_aa).

1.A. Alineamiento de secuencias, búsqueda de homologías y estudios de expresión

Para las búsquedas de homólogos de secuencia de *Spats1* de ratón con otras especies, se utilizó la secuencia de ARNm anotada en Genbank-NCBI del gen *Spats1* de *M. musculus* [*Mus musculus spermatogenesis associated, serine-rich 1 (Spats1)*, mRNA, NCBI Reference Sequence: NM_027649.3]; esta secuencia corresponde al transcripto [ENSMUST00000024731.8](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/gca000000024731.8) de la base de datos del proyecto Ensembl. La secuencia proteica empleada fue la AAI31910 (A2RRY8 en la base de datos Uniprot), de 269 aminoácidos.

Los alineamientos de secuencias se efectuaron mediante el programa BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*), que es un programa informático de alineamiento de secuencias de tipo local, ya sea de ADN, ARN o de proteínas (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), empleando las herramientas blastp (compara contra las bases de datos de proteínas) y tblastn (compara contra las secuencias nucleotídicas traducidas conceptualmente). Las comparaciones se realizaron alternativamente contra toda la base de datos, contra vertebrados exclusivamente, o excluyendo mamíferos (según los parámetros seleccionados en cada caso).

Para los análisis de conservación del patrón de expresión de *Spats1* en los distintos tejidos se realizó minería de datos a partir de la información del proyecto *Mouse ENCODE Transcriptomic Data* de la enciclopedia ENCODE (*Encyclopedia of DNA Elements, National Human Genome Research Institute* de los Estados Unidos), <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/PRJNA66167/>. En paralelo, se relevó toda la información disponible en Ensembl sobre el patrón de expresión de *Spats1* para cada una de las especies para las cuales existe alguna información reportada al respecto.

Con respecto a la caracterización del patrón de expresión de *Spats1* en los distintos tipos celulares del testículo del ratón, se utilizaron los datos de secuenciación masiva

obtenidos por nuestro grupo de investigación, publicados en [Da cruz et al., 2016](#). En este trabajo se secuenciaron los transcriptomas de células de testículo altamente purificadas: espermatogonias y células somáticas del testículo (contenido 2C de ADN), espermatocitos leptocigoténicos (profase meiótica temprana), espermatocitos paquiténicos (profase meiótica media) y espermátidas redondas (espermiogénesis).

1.B. Análisis de dominios proteicos, determinación teórica de estructura proteica predicha, interacciones proteína-proteína

La búsqueda *in silico* de dominios estructurales proteicos conservados entre SPATS1 y otras proteínas se realizó mediante la herramienta de *software Conserved Domain Architecture Retrieval Tool* <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/lexington/lexington.cgi>.

Para los estudios de predicción de coiled-coils se emplearon los programas Coils y Marcoil ([Delorenzi Y Speed, 2002](#)) disponibles en el servidor de proteómica del Instituto Suizo de Bioinformática ExpASY, NPS ([Combet et al., 2000](#)) del *Prabi-Gerland Rhone-Alpes Bioinformatic Pole* (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/primanal_lupas.pl), y *Predictor of coiled-coil regions* ([Fariselli et al., 2007](#)). Coils y NPS se basan en el algoritmo de Lupas ([Lupas et al., 1991](#)), en tanto los otros dos programas emplean un método basado en el Modelo Oculto de Markov.

La modelización de la estructura tridimensional de SPATS1 se realizó mediante las herramientas bioinformáticas *Expasy Bioinformatics Resource portal*, de *Swiss Model Tools* (http://www.expasy.org/structural_bioinformatics) y *MODbase Database – MOD Web* (<https://modbase.compbio.ucsf.edu/modweb>).

El estudio de interacciones proteicas predichas *in silico* se llevó a cabo con las herramientas IntAct e Interpro. *IntAct Molecular Interaction Database* (<http://www.ebi.ac.uk/intact/>) es una base de datos de estudios empíricos de interacciones proteína – proteína publicados, en tanto InterPro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>) proporciona un análisis funcional de las proteínas, clasificándolas en familias, y predicción de dominios y sitios importantes.

2. ANIMALES

Las cepas de ratones (*Mus musculus*) utilizadas en este trabajo fueron:

- BALB/cJ (<https://www.jax.org/strain/000651>): cepa de ratones albinos endocriados.

Se emplearon embriones en etapa de mórula o blastocisto para la microinyección de células ES con mutaciones de trampa génica (ver más abajo) con el objetivo de generar ratones KO. Los embriones microinyectados se transfirieron a madres receptoras pseudopreñadas de esta misma cepa.

- B6D2/F2 (<https://www.jax.org/strain/100006>): cepa de ratones endocriados de color marrón oscuro, cruce de ratones hembra B6 con machos DBA/2J (D2). Es un contexto genético ampliamente utilizado para la generación de ratones KO. Se microinyectaron cigotos de esta cepa con los ARNg para la generación de ratones KO mediante el método de CRISPR/Cas9. Los embriones microinyectados se transfirieron a madres receptoras pseudopreñadas de esta misma cepa. Posteriormente, se efectuaron todos los estudios de caracterización fenotípica en ratones WT, heterocigotas para la mutación *Spats1* y homocigotas para dicha mutación.

- CD1 Swiss (<http://www.criver.com/products-services/basic-research/find-a-model/cd-1-mouse?loc=>): cepa de ratones albinos exocriados. Se utilizaron animales de esta cepa para los ensayos de co-inmunoprecipitación.

Los animales de las cepas BALB/cJ y B6D2/F2 procedieron del bioterio del Institut Pasteur de Montevideo (IPMont). Los ensayos de microinyección, transferencia embrionaria y cruzamientos hasta homocigosis se llevaron a cabo en la Unidad de Animales Transgénicos (UATE) del IPMont, que cuenta con un bioterio en condiciones libres de patógenos específicos (SPF), personal altamente capacitado y todas las habilitaciones correspondientes. Los animales se trasladaron al IIBCE para la realización de todos los estudios posteriores.

Los animales de la cepa CD1 Swiss se obtuvieron del bioterio del IIBCE.

Las disecciones se llevaron a cabo en el Departamento de Biología Molecular del IIBCE. Los animales se sacrificaron por dislocación cervical, y se extrajeron los testículos con pinzas y tijeras de disección estériles.

Todos los estudios realizados contaron con protocolo de experimentación aprobado por la Comisión de Ética en el Uso de Animales del IIBCE (CEUA), número de protocolo 004/09/2011.

3. GENERACIÓN DE RATONES KO

3.A. Recombineering: diseño de un *targeting* vector

A grandes rasgos, el protocolo diseñado y seguido para la generación del vector direccionador, fue el siguiente:

1. Se adquirieron las cepas y vectores del sistema *Recombineering* [National Cancer Institute (NCI), Frederick, MD, USA]. Todos los protocolos seguidos, fueron los recomendados por el fabricante (<https://redrecombineering.ncifcrf.gov/protocols/>).
2. Se realizó una exhaustiva búsqueda mediante la herramienta Blast en el banco de datos de la genoteca BMQ de la empresa Geneservice (*Source Bioscience UK Limited, Inglaterra*), de modo de procurar identificar un BAC (cromosoma artificial bacteriano) conteniendo la secuencia genómica completa del gen *Spats1* de *M. musculus*. Esto se llevó a cabo con el objeto de obtener un fragmento genómico de ADN de ratón que contuviera una gran porción del gen *Spats1*, para poder crear los brazos de homología en la construcción del *targeting* vector. Los clones BAC contienen generalmente de 100 a 300 kb de secuencia genómica, y por lo tanto son grandes las probabilidades de que contengan la secuencia genómica completa de un gen, o al menos buena parte de ella.
3. Se obtuvo un BAC conteniendo la secuencia genómica completa del gen *Spats1* de ratón (bmq-464k12, cepa 129S7). La secuencia del BAC, y en particular la presencia de la secuencia de *Spats1* dentro del mismo, se confirmó por PCR y Southern-blot.
4. Se seleccionó dentro del gen *Spats1* una región de aproximadamente 13,8 Kb que contenía los exones 2 y 3 de *Spats1* (más el intrón intermedio), como blanco para ser sustituida por el casete de resistencia a neomicina (Neo^r). Esta región poseía la longitud de un vector de reemplazo típico en esta técnica (Deng y Capecchi, 1992), y sin duda su reemplazo habría de producir una proteína SPATS1 inactiva, al encontrarse al inicio del gen.
5. Se amplificó por PCR el casete Neo^r a partir del plásmido pL452 (NCI) mediante el uso de iniciadores conteniendo, cada uno, 25 bases complementarias al casete Neo^r y 75 bases homólogas (total 100 bases) a las secuencias flanqueantes a la región a sustituir del gen *Spats1* (exones 2 y 3, con el intrón intermedio). Se obtuvo un producto de PCR de 1.851 pb, que luego de la recombinación sustituiría a los exones 2 y 3 de *Spats1*, de modo que se generara un gen *Spats1* mutante al que le faltaran dos exones, y cuyas células portadoras fueran seleccionables a través de la resistencia a neomicina.

6. Se diseñaron dos juegos de iniciadores con sitios de restricción apropiados, los que permitieron amplificar por PCR dos regiones de aproximadamente 450 pb cada una, correspondientes a ambos extremos flanqueantes del fragmento de 13,8 Kb seleccionado, a partir del gen *Spats1* contenido en el BAC. Ambos productos de PCR fueron digeridos y ligados a ambos extremos del vector pL253 (NCI) linealizado, obteniéndose así el plásmido aceptor. Estos procedimientos se realizaron siguiendo el protocolo de [Chan et al., 2007](#).

7. El BAC y el plásmido aceptor fueron transferidos mediante electroporación a células electrocompetentes de la cepa SW102 de *Escherichia coli* (NCI), que contiene la secuencia codificante para la maquinaria de replicación y recombinación del bacteriófago Lambda (*Red*) integrada en el genoma bacteriano. Se incubó a 40°C durante 15 minutos para inducir la expresión de las replicasas/recombinasas de Lambda. Se esperaba que durante el proceso de replicación de la bacteria, el plásmido (lineal) se posicionase sobre el BAC, a través de su región homóloga (los extremos de 450 pb ligados previamente), y las enzimas del sistema de replicación rellenaran el hueco de 13 Kb que separaba los dos extremos, usando el BAC como molde ([Liu et al., 2003](#)) mediante la técnica de *gap repair*. De esta manera, el fragmento de 13,8 Kb del BAC sería copiado dentro de los sitios homólogos del vector pBluescript recombinante.

8. A continuación se transformarían células electrocompetentes de la cepa SW102 conteniendo el pBluescript con el ADN de *Spats1* subclonado previamente, con el casete de Neo^r. Al ser inducidas por temperatura ("*heat-shock*"), las recombinasas Red del bacteriófago Lambda debían promover la introducción específica del casete por recombinación homóloga ([Liu et al., 2003](#); [Chan et al., 2007](#)). El casete sustituiría a la región conteniendo los exones 2 y 3 del gen *Spats1*, de modo que quedasen aproximadamente 5 Kb que continuaran siendo homólogos a *Spats1*, flanqueantes a cada lado del casete.

9. Finalmente, se procedería a la selección de células transformantes en placas conteniendo neomicina (o kanamicina, ya que ambos antibióticos poseen un mecanismo similar de resistencia), para obtener sólo las colonias que hubieran recibido el casete Neo^r (selección positiva). Estas serían portadoras del vector direccionador (*targeting vector*), conteniendo el casete de resistencia a neomicina flanqueado por 5 Kb del gen *Spats1*, a cada lado. Además, contendrían el gen *Tk*, para eliminar aquellas células que hubiesen realizado recombinación inespecífica (selección negativa). Por último, la verificación de la secuencia del inserto y del clonado direccional del casete dentro del sitio deseado se haría mediante digestión con enzimas de restricción y PCR.

El protocolo quedó detenido en el paso 7, por las razones que se explicitan en la Sección Resultados. Consideramos que la descripción detallada del protocolo empleado sería excesiva, y por lo tanto no se presenta aquí. No obstante, los detalles metodológicos del protocolo utilizado, descripción de las cepas, así como la secuencia de los iniciadores utilizados en cada caso y varias figuras explicativas se consignan en el Anexo I, a los efectos de que estén disponibles en caso de interés.

3.B. Gene trap

Como mencionáramos en la Introducción, el método de *Gene trap* para generar ratones KO consiste en utilizar líneas de células madre embrionarias de ratón (células ES, de ratones negros) genéticamente modificadas, para microinyectarlas en embriones en estadio de mórula o blastocisto (de ratones blancos), e implantar estos embriones quiméricos en hembras pseudo-preñadas. Los ratones descendientes serán quiméricos, es decir que portarán células normales (blancas) y células KO (negras) en su organismo, a modo de mosaico, en todos sus tejidos. Luego se cruzan estos animales con ratones blancos y se espera que nazcan camadas de hijos de color marrón, que corresponderán a los ratones heterocigotas para la mutación esperada. Finalmente se cruzan los hermanos heterocigotas hasta obtener ratones negros KO dobles nulos (-/-).

3.B.a. Selección de clones de trampa génica

Como ya mencionamos previamente, las cepas de células ES modificadas por *gene trap* son elaboradas por el *International Gene Trap Consortium* (IGTC). Las búsquedas para elegir el clon de interés se llevaron a cabo en las bases de datos disponibles en el portal web del consorcio, encontrándose cientos de clones de células ES Lex3.13 (cepa C57BL/6N) portadoras de mutaciones únicamente en el gen *Spats1*. Cada clon fue analizado y se seleccionaron aquellos que contuvieran interrumpido el gen *Spats1* en los primeros 2 exones (ver Resultados). De esta selección, nos quedamos con 3 clones, que efectivamente mostraban interrupción en el ARNm y la proteína predicha resultante.

A continuación se muestra la región flanqueante al sitio de inserción del *gene trap* en dos de los tres clones seleccionados, que fueron los que finalmente se utilizaron (el asterisco al principio de la secuencia diana marca el sitio de inserción):

-Clon IST13143D8:

```
*AGTTCACACAGTGAAAAGCAATCGGACCCAAAAGGTGCTTGTAGAAAAGGCTATCATTCAAAACCAACAGACCCCATAA
GTCATTGAAATTCAAGAGGCAGCGCAAGGGAAAAACCTAAATCTCACTGGACCTCTAGCGGTGTTACAGGGTTTGAATG
TCCTGCCACTCCTCCTCCTGACTCAGGGCTCCCGAAAGTACTCGCCCCGCCCGTCTTGGGTCTCCTTCCACCTCTG
AGTCCCACCTACTTCCCTGGGGGAAGCCCTTCATCTACCCTTGAAGACTCCATGGAGGATGTGGCCAGATCAACGCAC
CAACTGGCAGCGGAAGTCCAAATACCAGGATGCAAAGCGAAAGCAAGGGCGTCTACNACCGCTGCAAGGCTCGGTCC
AGGGTTGCCAGGACAACGCGCCACTTCCCGGAGCTGGCGCGTACTCTTGACNCACCTATCTTCTGCACCCGGCGTCC
GGCCTGGGTTGANAANGGANNTCNNANNNTCANANCTGCAGANCNTCNGATTTTGTTTANTTTGCGNCTNTTTCC
NNCNCNTN
```

-Clon IST10765G4:

```
*CAAGCGCCAGCTTANCTCCTTTTTGATGGAAGTCTCTGACTGATCANATCTCAAATGTAGACATGAGCTCATTGTGTGT
AGCCCTAACTATCTGCCTTAGCTTGATCTGCAATGCTCTCCAAAACCCATGTTTTAAAGATTTAGCTCCAGTCTGTCAT
ACTGTTGGGATGATGGGACTGTTTTAAAAGTCANAGGGCATGGANGTGGANAGAGTTANAACNNTTGATGCTTTGCAG
GGGGGGCGGGACTTCTATCCCCAGCACCGTGGTGGTTCACAGCCATCCATAACTCCNNTCCNGGGTATCCAACGCC
CTCTTCTACCTTCTGCANGCACCANACGAAACTCAGTATACATACATAAAACAGGCANGCAAACATACATAAAATAAAA
TAAAGACNACTTTAAAAAATNAGAAGTCTTGGGTGTTGGGGTGCCTCTGNNTGAAANAGTGGNNNCACAGCCTNCC
TTTTACTCGTNATTATTTNTTGACTAAGAGGGANACGCTTTGATGANTGNCACCTATGANATGCCNCCAGNNGGG
```

3.B.b. Microinyecciones en embriones

Las microinyecciones se llevaron a cabo en la UATE del IPMont. Los experimentos de microinyección se realizaron con los clones IST13143D8 e IST10765G4, no llegándose a utilizar el tercer clon. Las células ES fueron microinyectadas en embriones de ratón de la cepa BALB/cJ (albinos) en estadio de mórula o blastocisto. En los distintos experimentos se probó modificar el parámetro del número de células microinyectadas, microinyectándose en algunos casos 12 células por embrión, y en otros de 5 a 7 células por embrión. Los embriones se transfirieron a hembras BALB/cJ pseudopreñadas. El número de hembras transferidas en cada sesión fue de entre 2 y 4 hembras, transfiriéndose en cada caso entre 15 y 16 embriones por hembra pseudopreñada.

3.C. CRISPR/Cas 9

3.C.a. ARN guía

Para el diseño del ARN guía (ARNg) y búsqueda de posibles sitios *off-target* se utilizaron los programas bioinformáticos disponibles *online* CHOP-CHOP (OIMC Tools, <https://omictools.com/chopchop-tool>) y *Custom gRNA* (Thermo Fisher Scientific). La síntesis del ARNg diseñado (que dirige el clivaje al exón 3 de *Spats1*) así como también el ARNm codificante para Cas9 se encargaron a la empresa Invitrogen (Carlsbad, California, USA).

El test de eficiencia del ARNg en la generación de rupturas de doble hebra se realizó en cultivo *in vitro* de células NIH 3T3, y empleando para ello el *GeneArt Genomic Cleavage Detection Kit* (Invitrogen). Brevemente, se cultivaron 4 pocillos (de placa de 96 pocillos) con

células 3T3 en DMEM/suero, los que fueron mantenidos a 37°C *overnight* (o.n.) sin antibiótico y 5% de CO₂, hasta una confluencia del 90% (aproximadamente 36-48 hs). Se transfectaron 100 ng de ARNg + 50 ng de ARNm de Cas9 + 0,3 µl de lipoafectamina, por pocillo, en 50 a 100 µl de DMEM y se mantuvo o.n. en estufa de CO₂.

A continuación se preparó una mezcla de 50 µl de buffer de lisis + 5 µl de *protein degrader* (contenido en el kit) por cada pocillo cultivado y se transfirió la mezcla, siguiendo las instrucciones del fabricante. Se incubó 5 minutos y se transfirió el líquido a un tubo de PCR de 0,2 ml. Se incubó a 68°C por 15 minutos, 95°C por 10 minutos, y los tubos se congelaron a -20°C. Luego se procedió a realizar una reacción de PCR con el siguiente juego de iniciadores (cuya síntesis se encargó a Macrogen, Corea), complementarios a regiones flanqueantes del exón 3 del gen *Spats1*:

Spats1-E3-F – GCCAGTCCTGTTGGATGAGG

Spats1-E3-R – ATGGCTCTCACATGAAGGCAC

El programa de PCR utilizado fue el indicado en el manual del kit, y es el mismo que se muestra en la Tabla III.1.

Posteriormente se efectuó el test de clivaje de híbridos empleando la enzima contenida en el kit, y siguiendo las instrucciones del fabricante.

La modificación introducida fue que si bien el kit sugiere el análisis del resultado del clivaje en un gel de agarosa y tinción con bromuro de etidio, nosotros comprobamos que las bandas correspondientes a los productos de clivaje se encontraban en el límite de detección del bromuro de etidio. En consecuencia, analizamos los resultados por electroforesis en geles de poliacrilamida al 6%, realizados y teñidos con nitrato de plata mediante los procedimientos convencionales.

3.C.b. Microinyección de cigotos

Las microinyecciones se realizaron en las instalaciones de la UATE del IPMont. Los ARNg y ARNm de Cas9 se microinyectaron en el citoplasma de embriones de 1 célula (cigotos) de ratones de la cepa B6D2/F2.

Por cada cigoto se microinyectó un volumen de aproximadamente 1µl, conteniendo 50ng/µl de ARNm de Cas9 y 20ng/µl del ARNg, disueltos en PBS 1X. En cada ensayo se microinyectaron aproximadamente 99 cigotos mediante micropipeta, bajo

micromanipulador (Leica MDi8, Alemania). Los cigotos microinyectados fueron implantados en úteros de hembras pseudopreñadas de la misma cepa.

3.C.c. Genotipado

Luego del destete de las crías nacidas a partir de los embriones transferidos, a los 21dpp, cada cría fue oportunamente identificada y numerada. Se recibieron de la UATE (IPMont) puntas de la cola de cada una de las crías para su genotipificación. Con este objetivo, realizamos extracciones de ADN genómico mediante el kit de extracción *GeneJet Genomic DNA Extraction Kit* (Thermo Fisher, Lituania). La concentración del ADN se estimó mediante Nanodrop (Thermo Fisher), y se procedió a la amplificación por PCR de un fragmento de ADN genómico de 400pb flanqueante al sitio blanco del ARNg, en el exón 3 del gen. Los iniciadores utilizados fueron los mismos que se describieron en el punto 3.C.a.

Las mezclas de reacción así como el programa utilizados para las reacciones de PCR se muestran en la Tabla III.1.

Tabla III.1. Reacciones de PCR del exón 3 de *Spats1* para genotipado.

Componente	Mezcla de reacción 1X (µl)	Programa	Tiempo
10X buffer (Fermentas)	2,0	95°C	5 min
25 mM MgCl ₂	2,0	40 ciclos de	
10 mM dNTPs	1,0	95°C	30 seg
20 µM Primer e3-F	0,5	56°C	30 seg
20 µM Primer e3-R	0,5	72°C	30 seg
H ₂ O	11,5	Ext. 72°C	5 min
Taq	0,3 (2,5 U)	Hold	4°C
ADN	2,0 (20 ng)		

Los productos de PCR se eluyeron del gel de agarosa mediante el *GeneJet Gel Extraction and DNA Cleaup Micro Kit* (Thermo Fisher, Lituania) en 15 µl de agua, y se enviaron para su secuenciación a Macrogen. Para la secuenciación se utilizaron los mismos iniciadores de PCR, y cada producto de PCR se secuenció de los dos lados. Los cromatogramas obtenidos de cada reacción de secuenciación se analizaron manualmente. La presencia de heterocigotas o dobles mutantes se evidenció por una superposición de picos en el cromatograma a partir de la zona de la alteración. La existencia de mosaicos se

manifestó por la superposición de más de dos picos en cada posición. El resultado de cada lectura se corroboró con la lectura obtenida a partir de la reacción de secuencia con el iniciador del otro extremo. Este procedimiento se realizó para los ratones obtenidos de la FO, y se repitió para la F1 y F2.

3.C.d. Western blot confirmatorios

Luego de la disección, los testículos fueron desprovistos de su túnica albugínea, homogenizados con homogeneizador de teflón, resuspendidos en buffer de Laemmli (Tris-Cl 0,12 M pH6,8, SDS 10%, glicerol 20%, β -mercaptoetanol 20%, azul de bromofenol 0,02%), y congelados a -20°C.

La separación por tamaño de las proteínas fue realizada mediante electroforesis en geles de poliacrilamida SDS-PAGE al 14%. El buffer de corrida fue Tris-glicina (25 mM Tris pH8,5, 0,112 M glicina, 0,1% SDS). Las muestras de proteína se desnaturalizaron en buffer de Laemmli a 100°C por 5 minutos previo a su cargada en el gel, y las corridas se efectuaron a 100V hasta que el frente de corrida llegara al final del gel.

Las proteínas se transfirieron a membrana de nitrocelulosa PROTRAN (Schleicher & Schuell, Alemania), utilizando un equipo de transferencia líquida *Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell II* (BioRad, Hercules, CA, USA). La transferencia se realizó en buffer CAPS 1/2 (25 mM CAPS, 10% metanol, 0,025% SDS; pH10) durante 1 hora a 95 V (0,5-0,9 A). Inmediatamente después de la transferencia la membrana se tiñó con rojo Ponceau-S [0,5% Rojo Ponceau-S (Sigma), 1% ácido acético] por 5 minutos para evaluar la calidad de la transferencia, se lavó con H₂O ultrapura hasta lograr visualizar las bandas de proteína, y se incubó o.n. en TBST (140 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH7,4, 0,1% Tween 20) conteniendo leche en polvo descremada al 10%, a 4°C.

Al día siguiente, la membrana en TBST/leche se incubó a temperatura ambiente con agitación durante 1 hora. Se lavó 2 veces con TBST 1X por 15 minutos cada vez, se incubó 2 horas a temperatura ambiente en el anticuerpo primario anti-SPATS1 (sc-139435; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) a concentración 1:1000 en TBST 1X, se efectuaron 2 lavados de 15min cada uno con TBST 1X y se incubó 1 hora en anticuerpo secundario anti-conejo conjugado a peroxidasa de rábano (Pierce-Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, USA) a concentración 1:30.000. Se lavó nuevamente y se reveló por autorradiografía empleando el *Supersignal West Pico Chemiluminescent Substrate Kit* (Pierce-Thermo Fisher), mediante los procedimientos habituales.

4. CARACTERIZACIÓN DE LOS RATONES KO

4.A. Inspección macroscópica

Consistió en una inspección ocular para buscar diferencias morfológicas grandes en alguna parte del cuerpo entre los ratones WT y KO. Se examinó su capacidad para moverse y reaccionar frente a ejercicios sencillos como saltar o correr, y se evaluó si se alimentaban correctamente. Se observó el desarrollo de los ratones desde el nacimiento hasta la adultez. Posteriormente se realizaron disecciones para explorar los órganos internos y buscar malformaciones, en particular en el testículo pero también en otros órganos como cerebro y otros. Luego de la disección, se midió peso corporal total y peso testicular (en gramos), y los testículos se fotografiaron con una regla para estimar tamaño testicular (en mm).

Estos estudios se realizaron tanto para ratones WT, como para ratones heterocigotas (+/-) y mutantes nulos (-/-) para ambas mutaciones (7b y 2b; ver “Resultados”), y tanto a los 45-60 dpp como al año de edad.

4.B. Tests de Fertilidad

Para los estudios de fertilidad en individuos de aproximadamente dos meses de edad, se efectuaron los siguientes cruzamientos:

- Machos WT vs hembras WT (Control) – 3 experimentos en paralelo;
- Machos KO^(-/-) mutación 2b vs hembras WT – 3 experimentos en paralelo;
- Machos KO^(-/-) mutación 7b vs hembras WT – 3 experimentos en paralelo;
- Hembras KO^(-/-) mutación 2b vs machos WT – 2 experimentos en paralelo;
- Hembras KO^(-/-) mutación 7b vs machos WT – 2 experimentos en paralelo;
- Hembras KO^(-/-) mutación 2b vs machos KO^(-/-) mutación 2b - – 2 experimentos en paralelo.

Los harenes se dejaron por 7 días. Luego del destete de las crías, las hembras se disecaron y se contaron los sitios de implantación.

Para el caso de los individuos de 1 año de edad, se realizaron las siguientes cruces:

- Macho WT1 vs 3 hembras WT (Control)
- Macho WT2 vs 3 hembras WT (Control)
- Macho KO1 vs 3 hembras WT
- Macho KO2 vs 3 hembras WT

4.C. Estudio de poblaciones celulares por citometría de flujo

Se utilizó en cada caso ½ testículo de ratones WT, KO *Spats1* heterocigotas (+/-) y KO *Spats1* homocigotas (-/-) para las mutaciones 2b y 7b, empleándose 3 animales de cada tipo.

Las suspensiones celulares fueron preparadas por un método desarrollado en nuestro laboratorio (Rodríguez-Casuriaga *et al.*, 2009; Geisinger y Rodríguez-Casuriaga, 2016). Brevemente, los testículos fueron disecados en placas de Petri conteniendo medio de separación [10% v/v suero fetal bovino (FCS) en *Dulbecco's Modified Eagle's medium* (DMEM) con alto contenido en glucosa y L-glutamina] sobre hielo, se retiraron las tunicas albugíneas y los testículos se cortaron en pequeños trozos de 2-3 mm³.

Estos trozos fueron colocados en un disgregador descartable Medicon con malla de separación de 50 µm (Becton Dickinson [BD], San José, CA, USA), más 1 ml de medio de separación frío, y procesados en Medimachine (BD) por 50 segundos. La suspensión celular resultante fue recuperada con una jeringa de 5 ml, y filtrada sucesivamente por malla de nylon de 50 µm y 25 µm. Se agregó NDA (2-naphthol-6,8-disulfonic acid, dipotassium salt; Chemos GmbH, Regenstauf, Alemania) 0.2% (w/v) a la suspensión final para prevenir aglomeraciones celulares.

Las células se fijaron con etanol 70% o.n. a 4°C, se centrifugaron por 5 minutos a 1000 rpm, y el precipitado fue resuspendido en 500 µl de PBS.

Luego de 5 minutos a temperatura ambiente, se agregaron 50 µL del intercalante fluorescente Ioduro de Propidio (PI, Sigma; 1 mg/ml) por cada 1 mL de suspensión celular, y ARNasa a concentración final 50 µg/ml, y se incubó a 0°C en la oscuridad por 10 minutos antes de proceder al análisis.

Las células fueron analizadas en el Servicio de Clasificación Celular y Citometría de Flujo (SECIF) del IIBCE, utilizando un citómetro de flujo FACSVantage (BD, California, USA) equipado con láser ion de argón (Coherent, Innova 304) ajustado para emitir a una longitud de onda de 488 nm. El poder del láser se ajustó a 100 mW y la fluorescencia emitida por el IP se colectó en FL2 empleando un filtro con paso de banda de 575/26. Se empleó una boquilla de 70 µm. Se utilizaron *DNA QC particles* (BD) para optimizar la detección de fluorescencia así como para chequear la linealidad del instrumento y discriminación de dobletes.

El análisis de los siguientes parámetros fue realizado con el *software CELLQuest* (BD): *forward scatter* o dispersión frontal (FSC-H), *side scatter* o dispersión lateral (SSC-H), área de pulso o fluorescencia total emitida (FL2-A), y ancho de pulso o duración de la emisión de fluorescencia (FL2-W). Todos los parámetros fueron operados en escala lineal y se

emplearon los mismos *settings* para cada análisis (con leves ajustes en detección de FL2). El *threshold* fue establecido en el parámetro de dispersión frontal al menor nivel posible. Se emplearon gráficos de puntos (*dot plots*) de FL2-A vs tiempo como control de la emisión de fluorescencia. La exclusión de dobletes se efectuó empleando *dot plots* de FL2-A vs FL2-W. Se realizaron capturas de pantalla de los gráficos obtenidos.

4.D. Estudios de motilidad y vitalidad espermática (computer assisted sperm analysis, CASA).

Se analizaron la cantidad, grado de motilidad y vitalidad espermáticas de espermatozoides de epidídimo de ratones WT y ratones KO *Spats1* y se compararon los resultados, mediante un *software* especializado bajo microscopio óptico con cámara digital. Estos estudios los realizamos en el Departamento de Histología de la Facultad de Medicina, UDELAR, que cuenta con el *software* para estos análisis.

Para estos estudios se partió de 3 ratones macho WT y 3 KO portadores de la mutación 2b, todos de 50 días de edad. Se disecaron las colas de ambos epidídimos de cada ratón adulto, las que se sumergieron en 500 μ l de medio HFT modificado (medio de capacitación, cuya composición se indica más abajo), y se efectuaron algunos pequeños cortes para permitir el exudado de los espermatozoides. Para cada ratón, uno de los epidídimos se incubó 10 minutos a 37°C en estufa de CO₂, se cargaron 5 μ l de suspensión por portaobjetos, y los espermatozoides se observaron bajo microscopio Nikon E200 Eclipse. Los conteos y fotografías se obtuvieron con el *software* SCA Mot/Scan Sperm Class Analyser 5.4 (Microptic, Barcelona, España). En cada caso, el otro epidídimo se incubó 60 minutos en estufa de CO₂ para promover la capacitación *in vitro*, y se procedió del mismo modo.

Composición del medio HTF modificado:

Solución A (para 50 ml):

-NaCl 580,3 mg, glucosa 100 mg, KCl 20,1 mg, Na₂HPO₄.H₂O 5,6 mg, piruvato de Na (4°C) 5,5 mg, penicilina G/bentamicina 6,3 mg, estreptomina (4°C) 5 mg, CaCl₂.2H₂O 26,4 mg, MgCl₂ 4 M 12,6 μ l, lactato de Na 60% (4°C) 350 μ l.

Disolver en 50 ml de H₂O ultrapura. Agregar una pizca de rojo fenol; si la solución está bien preparada, debe virar al color amarillo.

Solución B (para 50 ml):

NaHCO₃ 210,6 mg.

Disolver en 50 ml de H₂O ultrapura. Agregar una pizca de rojo fenol; si la solución está bien preparada, debe virar al color rosado.

4.E. Conteo de espermatozoides de animales de 1 año de edad

Para el conteo de espermatozoides a partir de los ratones de 1 año de edad se disecó la cola de un epidídimo de cada ratón, se realizaron cuatro escisiones a cada cola, la misma se colocó en 50 µl de buffer PBS, y se dejó durante una hora a temperatura ambiente para que exudaran los espermatozoides. En el caso del ratón KO2, que presentaba el tumor, se disecaron y procesaron ambos epidídimos por separado, por las dudas de que el tumor hubiera afectado diferencialmente la producción de espermatozoides de un lado. Los conteos se realizaron en paralelo por dos métodos diferentes.

Para el primer método, se tomaron 10 µl de cada suspensión y se procedió a realizar el conteo en cámara de Neubauer, empleando para ello el retículo central para conteo de eritrocitos de la cámara, y contando en total 5 cuadrados grandes (16 cuadraditos).

Para el segundo método, los 40 µl restantes de buffer conteniendo los espermatozoides se centrifugaron 10 minutos a 400g, y el precipitado se resuspendió en 75 µl de PFA 4% en PBS. Se trazaron con un marcador circunferencias de 1,5 cm de diámetro en cada portaobjetos, y dentro de cada circunferencia se distribuyeron homogéneamente 20 µl de una dilución 1:5 de la suspensión obtenida de cada ratón, de modo de asegurarnos que la superficie cubierta fuera idéntica en cada caso y, por lo tanto, que la concentración de espermatozoides fuera comparable. Los preparados se observaron mediante óptica de contraste diferencial interferencial (DIC) empleando un microscopio confocal Olympus DP70 (Olympus, USA). Se fotografiaron 10 campos escogidos al azar en cada caso empleando para ello cámara digital y el *software* FluoView (Olympus), y se contaron los espermatozoides presentes en los 10 campos.

4.F. Evaluación de morfología espermática

Con este objetivo, espermatozoides fijados extraídos de cola de epidídimo fueron extendidos sobre portaobjetos, se dejaron secar al aire, se fijaron en PFA 4%, y se evaluó la morfología mediante microscopía de contraste diferencial interferencial (DIC). Los

espermatozoides se clasificaron en cabezas morfológicamente normales y anómalas. Dentro de las cabezas anómalas, se categorizaron en “sin gancho”, “banana” y “otros”, de acuerdo con la categorización para espermatozoides de ratón realizada previamente por otros autores (Domínguez *et al.*, 2009; Wichman *et al.*, 2017). Además, adicionalmente se incluyó otra categoría que denominamos “cabeza de hacha”, y que según pudimos observar correspondía a cabezas con distinto grado de deformación, cuyo defecto parece originarse en el nacimiento del flagelo en una posición anómala.

Para estos experimentos se emplearon 6 ratones de 50dpp de cada tipo (6 WT y 6 KO), y se analizaron como mínimo 200 espermatozoides por individuo.

Para la evaluación de morfología espermática en los ratones de 1 año de edad, se utilizaron los mismos preparados que para conteo de espermatozoides (Sección 4.E). Aquí también se evaluaron en cada caso como mínimo 200 espermatozoides. En los casos en que la cantidad de espermatozoides en el preparado no llegara a 200 (*e.g.* epidídimo izquierdo del ratón KO2), se esparció sobre portaobjetos una gota (20 μ l) de la suspensión sin diluir, y la misma se utilizó para evaluar morfología espermática.

4.G. Análisis histológicos

Las muestras de testículo se procesaron de la siguiente manera:

- 1 - Los testículos enteros fueron desprovistos de su túnica albugínea y cortados en trozos de aproximadamente 2-3 mm³.
- 2 - Estos trozos se fijaron en una solución de glutaraldehído 2,5% en *buffer* fosfato 0,1M pH6,8, y se les dejó durante 14 hs a 4°C.
- 3 - Se cortaron en trozos de 1mm³ sobre placa de Petri con PBS 0,1M pH6,8.
- 4 - Se realizaron 3 lavados de 15 minutos cada uno con *buffer* fosfato sobre hielo.
- 5 - Se fijaron con una solución de tetróxido de osmio (OsO₄) 1% en *buffer* fosfato 0,1M pH6,8, durante 1 h en hielo.
- 6 - Se realizaron 3 lavados de 10 minutos cada uno con *buffer* fosfato 0,1M.
- 7 - Se procedió a deshidratar las muestras a temperatura ambiente en los siguientes pasos:
 - 15 min. en etanol 25%
 - 30 min. en etanol 50%
 - 30 min. en etanol 75%
 - 30 min. en etanol 100%
- 8 - Posteriormente, se prepararon las muestras para la infiltración con resina epóxica:

- Se realizaron dos cambios de acetona absoluta de 30 min. cada uno a temperatura ambiente.

- Se preparó la resina epóxica Durcupan (Fluka, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) mezclando sus cuatro componentes en las siguientes proporciones:

Para 20ml:

- 10ml de A/M (*epoxy resin*)
- 10ml de B (*hardener 964*)
- 0,35ml de C (*accelerator 964*)
- 0,15ml de D (*plastiscizer*).

9 - Las muestras se infiltraron de la siguiente manera:

-30 min. en solución de 25% Durcupan y 75% de acetona

-30 min. en solución de 50% Durcupan y 50% de acetona

-30 min. en solución de 75% Durcupan y 25% de acetona

- 1 h en Durcupan puro.

- Finalmente, las muestras se colocaron en moldes y se dejaron en estufa a 65°C durante 48 hs hasta obtener los bloques sólidos.

Una vez obtenidos los bloques, se realizaron cortes semifinos de 5 μm de espesor mediante un ultramicrotomo Power Tome XL (Boeckeler Instruments, Tucson, USA), los que fueron teñidos con azul de toluidina. Los cortes se observaron bajo microscopía de campo claro en un microscopio Olympus FV300 y se fotografiaron con cámara digital Olympus DP70 mediante el *software* DPController v. 1.1.1.65.

4.H. Extracciones de ARN y qRT-PCR.

Para las extracciones de ARN, testículos recién disecados fueron desprovistos de la túnica albugínea, y un trozo de testículo de cada animal se colocó en un tubo de microcentrífuga, se congeló de inmediato en nitrógeno líquido, y se guardó en freezer a -80 °C hasta su utilización. Se extrajo el ARN mediante el sistema *PureLink RNA Mini Kit* (Ambion-Thermo Fisher, Foster City, CA, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se ajustó la cantidad de ARN obtenida a 5 ng/ μl en base a mediciones en Nanodrop.

Las condiciones de amplificación (*e.g.* temperatura de *annealing*) se ajustaron mediante RT-PCR a tiempo final y electroforesis en geles de agarosa.

Para los experimentos de qRT-PCR se utilizaron el kit comercial *Power SYBR Green Cells-to-Ct Kit* (Ambion-Thermo Fisher) y el equipo de qPCR *CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System* (BioRad).

Se realizaron estudios de expresión génica relativa. Brevemente, el procedimiento realizado fue el siguiente:

- 1- Siguiendo las instrucciones del kit, se retrotranscribieron 20 ng de ARN a ADNc, en un volumen final de 50 µl, durante 1 h a 42°C.
- 2- Se realizaron qPCRs para cada gen en el mismo programa de qPCR, cargando 2 µl de reacción de retrotranscripción por cada gen. En la Tabla III.2 se muestra el programa de amplificación utilizado para las reacciones de PCR.
- 3- Se realizó una curva de calibración con el gen *Ppp1cc*, utilizando 4 diluciones seriadas de ARN: 100 ng, 10 ng, 1 ng y 0,1 ng. El uso de este gen como un buen gen calibrador para testículo ya había sido demostrado previamente por nuestro grupo (Da Cruz et al., 2016).
- 4- Los valores absolutos de expresión de cada gen fueron cuantificados según la curva de calibración definida con el gen *Ppp1cc*.
- 5- Los estudios para cada muestra fueron realizados por triplicado (3 muestras biológicas) y normalizados utilizando la expresión promedio del gen *Ppp1cc*. Adicionalmente, se hizo validación cruzada con un segundo gen calibrador, *Tax1bp1*, cuya utilidad como gen calibrador también demostramos previamente (Da Cruz et al., 2016). Sólo en el caso de los estudios de qRT-PCR en individuos de 1 año de edad los experimentos no se realizaron por triplicado sino por duplicado, ya que no se disponía de tres muestras biológicas para cada caso.
- 6- Los datos fueron analizados con el programa de *software* CFX Maestro, asociado al equipo.

La síntesis de todos los iniciadores diseñados se encargó a Macrogen. En la Tabla III.3 se incluye la lista de iniciadores utilizados en los experimentos de qRT-PCR.

Tabla III.2. Programa utilizado para los experimentos de qRT-PCR.

Programa: qPCR	Tiempo
95°C	5 min
40 ciclos de	
95°C	30 seg
Adquisición Green 56°C	30 seg

Tabla III.3. Lista de iniciadores utilizados en los experimentos de qRT-PCR.

Nombre del primer	Secuencia primers 5'-3'	Tm	PCR pb
<i>Ccnd1 -F</i>	CGTACCCTGACACCAATCTC	58	178
<i>Ccnd1 -R</i>	TCTTCGCACTTCTGCTCCTC	57	
<i>Cdc5l - F</i>	CAACGCAGTGGAGGACCATT	60	220
<i>Cdc5l - R</i>	AGCATCTCAAGTTCATCCTCATC	60	
<i>Cflar - F</i>	CGCCCACTCGTGGACCTC	60	279
<i>Cflar - R</i>	TACGGCTCATGCCTGTGC	60	
<i>Cldn11-F</i>	TCACAACGTCCACCAATGAC	61	184
<i>Cldn11-R</i>	AGGGCTCTACAAGCCTGCAC	60	
<i>Ctnnb1 - F</i>	GGTGTCTGCCATTGTACG	60	223
<i>Ctnnb1 - R</i>	TCCTTCCTGATGGAGCAG	60	
<i>cMyc-F</i>	TCCTGTACCTCGTCCGATTC	58	195
<i>cMyc-R</i>	GGTTTGCCTCTTCTCCACAG	58	
<i>Dazl - F2</i>	CTA GGC AGC CAC CTC ACG	60	240
<i>Dazl - R2</i>	TCCATCCTAACATCAATTCCTCC	60	
<i>Dvl1 - F</i>	CTATGGTACGAGTCCCTGCTC	60	234
<i>Dvl1 - R</i>	AGCCAGTCCACCACATCC	60	
<i>Dvl2 - F</i>	CAGTGAGCTGGAGAGTACC	60	216
<i>Dvl2 - R</i>	TGTTGAGCGTGACCGTGATG	60	
<i>Lef1-F</i>	AAATGGGTCCCTTTCTCCAC	58	108
<i>Lef1-R</i>	TCGTCGCTGTAGGTGATGAG	58	
<i>Ppp1cc-F</i>	CATATCTTGAGTGGTGCTTCA	60	158
<i>Ppp1cc-R</i>	GACAGCATCATCCAACGGCT	60	
<i>Prm1 - F2</i>	GCTCACAGGTTGGCTGGCTC	60	251
<i>Prm1 - R2</i>	TGATGGACTTGCTATTCTGTGC	60	
<i>Spa17-F</i>	CTCAGAATCTCCCGTGCAGCC	60	155
<i>Spa17-R</i>	ACACTGGAACCATCCGCACC	60	
<i>Spats1-F</i>	GATACCCAGCACGGTGATGCT	60	232
<i>Spats1-R</i>	TGAGGAACGATTAGACTGAGC	60	
<i>Sycp3 - F2</i>	TGTGGGGACAGCGACAGC	60	253
<i>Sycp3 - R2</i>	TACTTCACCTCCAACATCTTCA	60	
<i>TCF1-F</i>	CCATCCTTGATGCTGGGATC	58	141
<i>TCF1-R</i>	CTTCTCTGCCTTGGGTTCTG	58	
<i>Tax1bp1-F</i>	AGTGTGCATTAGGAAGGTA ACT	60	176
<i>Tax1bp1-R</i>	CTACGCTGAGAGGCAGTGG	60	
<i>Wnt4 - F</i>	GAGGAGTGCCAATACCAGTTC	60	258
<i>Wnt4 - R</i>	ATAGGCGATGTTGTCCGAGC	60	

4.I. Caracterización del tumor

Con respecto al tumor presente en la zona escrotal en uno de los animales de un año de edad, se disecó el tumor, se colocó en PFA 4% y se envió para analizar al Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Maciel. Los tacos de parafina, cortes y tinción con hematoxilina eosina se realizaron según los procedimientos habituales. El diagnóstico fue realizado por personal técnico especializado de dicho Servicio de Anatomía Patológica.

4.J. Análisis estadísticos

Para todos los análisis estadísticos se consideraron los resultados de como mínimo 3 experimentos independientes para cada caso (un individuo por experimento). La significancia estadística se analizó mediante análisis de varianza de un solo factor (*one-way ANOVA*). Se consideró como significativo un p valor <0,05.

5. ENSAYOS DE CO-INMUNOPRECIPITACIÓN PARA IDENTIFICACION DE INTERACCIONES PROTEÍNA-PROTEÍNA

5.A. Ensayos de inmunoprecipitación

Para estos ensayos se empleó el mismo anticuerpo anti-SPATS1 que en la Sección 3.C.d. (sc-139435; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA). Se utilizaron ratones macho WT de la cepa CD1-Swiss de 17 dpp. Esta edad corresponde a un avance de la espermatogénesis equivalente al observado a los 21 dpp en la rata, que es el momento del desarrollo posnatal en que habíamos detectado la expresión máxima de la proteína SPATS1 en los testículos (Capoano *et al.*, 2010). El ensayo se realizó dos veces por completo desde el inicio, partiendo de animales diferentes.

Dado que la solución en la que venía el anticuerpo comercial contenía albúmina de suero bovino (BSA) y gelatina, y que el manual de uso del kit de co-inmunoprecipitación utilizado (ver más abajo) establece que estas sustancias pueden competir por los sitios de acoplamiento en la resina, previo a la inmovilización del anticuerpo se procedió a la remoción de las mismas mediante el *Pierce Antibody Clean up Kit* (Pierce-Thermo Fisher).

El procedimiento se llevó a cabo según el protocolo del fabricante. Se lavaron 70 µg de anticuerpo, eluidos en 100 µl de volumen final.

Seguidamente se procedió a la realización de los ensayos de co-inmunoprecipitación, para lo cual se utilizó el kit comercial *Pierce Co-Immunoprecipitation (Co-IP) Kit* (Pierce-Thermo Fisher) según las instrucciones que figuran en el manual de uso del kit, con las siguientes particularidades:

1. La cantidad de anticuerpo primario anti-SPATS1 que se acopló a la resina fue de 70 µg.
2. Se procesaron 150 mg de testículo (equivale a dos testículos) sin albugínea, por experimento. Para ello, el tejido se cortó en pequeños trozos, se homogeneizó con homogeneizador manual en un tubo de microcentrífuga, y se le agregaron 500 µl de buffer de lisis/lavado. Se le adicionaron cocktail inhibidor de proteasas (Sigma P2714; Sigma, Saint Louis, Missouri, USA) a concentración final 0,5 mg/g de tejido, y fluoruro de sodio (inhibidor de fosfatasas) a concentración final 10mM. Se centrifugó a 13.000g por 10 minutos para remover restos celulares, se pasó el sobrenadante a un tubo limpio y se agregó más buffer de lisis/lavado en caso de que la suspensión tuviera una textura “gomosa”.
3. Se agregó 1/10 del volumen final de *crosslinker* DSP (dithiobis[sulfosuccinimidyl-propionato] con el fin de fijar las uniones entre proteínas adyacentes, teniendo en cuenta que el volumen final, incluyendo el *crosslinker* no superara los 1400 µl. Se incubó 30 minutos a temperatura ambiente, y se prosiguió según lo establecido en el protocolo del kit.
4. Se trató con 80 µl de suspensión de resina de agarosa control para pre-aclarar el lisado.
5. Se utilizó el equivalente a 50 mg de testículo en cada experimento, realizándose 3 experimentos en paralelo:
 - a- Resina anti-SPATS1 + lisado pre-aclarado de testículo total;
 - b- Resina control inactivada sin anticuerpo + lisado pre-aclarado de testículo total;
 - c- Resina control activada sin anticuerpo + lisado pre-aclarado de testículo total.

Los ensayos b y c constituyeron controles para eliminar interacciones inespecíficas, y se efectuaron según las instrucciones del manual del kit.

5. El paso de agregado del anticuerpo + lisado (cebo y presa) a la resina se realizó dos veces, una durante 2 hs y la otra o.n. Los controles se hicieron de idéntico modo.
6. Finalmente, el producto de la co-inmunoprecipitación se eluyó en 20 µl de buffer de elución.

Todos los demás pasos se efectuaron de acuerdo con las indicaciones del manual del kit. Una vez culminado el procedimiento, las columnas se regeneraron según lo sugerido en el manual.

5.B. Identificación de péptidos por espectrometría de masas.

El producto de elución de las inmunoprecipitaciones junto con los controles, fueron corridos en geles de poliacrilamida SDS PAGE al 14% para su análisis. Las condiciones de corrida fueron similares a las detalladas en el punto 3.C.d., salvo por el hecho de que todo el procedimiento se realizó en condiciones de extrema limpieza para evitar contaminación proteica exógena: se utilizó material de plástico/vidrio descartable o no usado previamente, y todos los buffers y la propia corrida se realizaron en cámara de flujo laminar.

Los geles se tiñeron en solución de azul de Coomasie (0,125% Azul de Coomasie, 40% metanol, 10% ácido acético) según los procedimientos habituales, y teniendo las precauciones de limpieza anteriormente mencionadas.

Las bandas obtenidas en los experimentos de co-IP fueron cortadas con bisturí estéril en cámara de flujo laminar y colocadas en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml. La identificación de las bandas se llevó a cabo en la Unidad de Bioquímica y Proteómica Analíticas del IPMont, donde fueron eluidas, digeridas con tripsina y analizadas mediante espectrometría de masas MALDI-TOF (*matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight*), en un espectrómetro de masas 4800 MALDI TOF/TOF, Abi Sciex (Applied Biosystems, Framingham, USA).

Los análisis se realizaron empleando el motor de búsqueda Mascot (<http://view6.workcast.net/?pak=3003276531895477&cpak=7053452047055213>).

IV. RESULTADOS

1. ESTUDIOS BIOINFORMÁTICOS

Con el objeto de intentar contribuir a la elucidación de la posible función de SPATS1, se comenzó por efectuar análisis *in silico* sobre la conservación de SPATS1 en la evolución, patrón de expresión, similitud de secuencia de SPATS1 con otras proteínas, estudios predictivos de la estructura proteica, presencia de dominios conservados, posibles interacciones con otras proteínas, etc.

1.A. Homología de secuencias en otras especies

Anteriormente habíamos observado un importante nivel de conservación de SPATS1 en la evolución de los mamíferos, tanto en euterios como en metaterios y prototerios. Asimismo, habíamos observado la existencia de proteínas homólogas en cordados primitivos, equinodermos y cnidarios (Capoano *et al.*, 2010). Dado que actualmente se dispone de un número mucho mayor de genomas secuenciados, se realizaron nuevos estudios de homología proteica entre todas las secuencias registradas en las bases de datos empleando el programa BLAST, mediante el uso de la herramienta bioinformática BlastSearch. Para ello se tomó como base la secuencia de SPATS1 de *Mus musculus*, y la misma se comparó contra las bases de datos proteicas (blastp), y contra las de secuencias nucleotídicas traducidas conceptualmente (tblastn).

En la tabla IV.1 se muestra, a modo de ejemplo, la presencia de proteínas homólogas a SPATS1 en una variedad de especies de metazoarios, desde todos los órdenes de mamíferos hasta cordados primitivos, hemicordados, equinodermos, braquiópodos, anélidos, moluscos, platelmintos y cnidarios. Incluso se encontraron homologías en protozoarios ciliados (ver Tabla IV.1). En la Figura IV.1 se muestra un ejemplo de reporte taxonómico para la proteína SPATS1 de ratón, obtenido excluyendo a los mamíferos.

Curiosamente, no aparecen homólogos para SPATS1 en aves. Tampoco aparecen homólogos en los animales pertenecientes al clado Ecdyzoa, el cual incluye, entre otros, a los nemátodos y artrópodos (Figura IV.2). Esto no deja de ser interesante dado que los invertebrados modelo *Drosophila melanogaster* y *Caenorhabditis elegans*, para los cuales su genoma se encuentra completamente ensamblado, pertenecen a este clado. Sin embargo, ya se ha reportado anteriormente la ausencia de homologías en este clado para otras proteínas de mamíferos (Peter y Reimer, 2012) incluyendo proteínas meióticas como los

componentes del complejo sinaptonémico (Fraune *et al.*, 2014), e incluso para ADN ribosomal (Aguinaldo *et al.*, 1997). La ausencia de homologías entre los integrantes de este clado y el resto de los metazoarios se ha interpretado como una consecuencia de la deriva evolutiva de los Ecdyzoa, en los que habría ocurrido una rápida evolución y gran diversificación de secuencias (Aguinaldo *et al.*, 1997; Fraune *et al.*, 2016). Nuestros resultados en relación a SPATS1, contribuyen a reforzar esta idea.

Al comparar la secuencia de SPATS1 dentro de los vertebrados, comprobamos que la región que más varía es la N-terminal, correspondiente a los primeros dos exones de la proteína del ratón (de un total de ocho exones) siendo más conservada la región C-terminal, como se observa en la Figura IV.3.

Tabla IV.1. Ejemplo de especies en las que se encontró una proteína homóloga a SPATS1 de ratón, usado como referencia, mediante la herramienta blastp.

Nombre de la Especie	Nombre común	Phylum	Clase	% cobertura*	% Identidad
<i>Mus musculus</i>	ratón	Chordata	Mammalia (Rodentia)	100	100
<i>Rattus norvegicus</i>	rata	Chordata	Mammalia (Rodentia)	97	84
<i>Homo Sapiens</i>	hombre	Chordata	Mammalia (Primates)	99	67
<i>Pan troglodytes</i>	chimpancé	Chordata	Mammalia (Primates)	99	67
<i>Equus caballus</i>	caballo	Chordata	Mammalia (Perissodactyla)	99	66
<i>Odobenus rosmarus divergens</i>	morsa del pacífico	Chordata	Mammalia (Carnivora)	99	65
<i>Monodelphis domestica</i>	Colicorto doméstico	Chordata	Mammalia (Metatheria/ Marsupialia)	68	49
<i>Alligator mississippiensis</i>	caimán	Chordata	Reptilia	72	47
<i>Xenopus tropicalis</i>	sapo	Chordata	Amphibia	63	42
<i>Salmo salar</i>	Salmón común	Chordata	Actinopterygii	64	37
<i>Branchiostoma floridae</i>	pez lanceta (amphioxo)	Chordata (Cephalochordata)	Leptocardii	61	30
<i>Ciona intestinalis</i>	ascidia	Chordata (Urochordata)	Ascidiacea	52	34
<i>Lingula anatina</i>	"lamp shell"	Brachiopoda	Lingulata	60	36
<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	erizo de mar	Echinodermata	Echinoidea	65	32
<i>Acanthaster planci</i>	estrella de mar	Echinodermata	Asteroidea	52	34
<i>Saccoglossus kowalevskii</i>	gusano de bellota	Hemichordata	Enteropneusta	50	34
<i>Cassostrea gigas</i>	ostión	Mollusca	Bivalvia	55	35
<i>Capitella teleta</i>	lombriz	Annelida	Polychaeta	50	38
<i>Macrostomum lignano</i>	-	Platyhelminthes	Turbellaria	52	34
<i>Orbicella faveolata</i>	coral	Cnidaria	Anthozoa	40	43
<i>Ichthyophthirius multifiliis</i>	protozoo ciliado	Ciliophora	Hymenostomatida	31	31
<i>Pseudocohnilembus persalinus</i>	protozoo ciliado	Ciliophora	Oligohymenophora	16	44

*Refiere al porcentaje de cobertura de la secuencia problema ("query").

Taxonomy	Number of hits	Number of Organisms	Description
root	81	43	
- artificial sequences	2	2	
- . synthetic construct	1	1	synthetic construct hits
- . Human ORFeome Gateway entry vector	1	1	Human ORFeome Gateway entr
- Eukaryota	79	41	
- . Eumetazoa	78	40	
- . . Bilateria	71	36	
- . . . Deuterostomia	48	28	
- Chordata	46	26	
- Gnathostomata	42	23	
- Euteleostomi	41	22	
- Sarcopterygii	29	12	
- Tetrapoda	27	11	
- Sauria	22	8	
- Archelosauria	8	4	
- Crocodylia	7	3	
- Alligator mississippiensis	5	1	Alligator mississippiensis hits
- Longirostres	2	2	
- Gavalis gangeticus	1	1	Gavalis gangeticus hits
- Crocodylus porosus	1	1	Crocodylus porosus hits
- Pelodiscus sinensis	1	1	Pelodiscus sinensis hits
- Toxicofera	14	4	
- Iguania	12	2	
- Pogona vitticeps	11	1	Pogona vitticeps hits
- Anolis carolinensis	1	1	Anolis carolinensis hits
- Serpentes	2	2	
- Python bivittatus	1	1	Python bivittatus hits
- Thamnophis sirtalis	1	1	Thamnophis sirtalis hits
- Anura	5	3	
- Nanorana parkeri	1	1	Nanorana parkeri hits
- Xenopus	4	2	
- Xenopus tropicalis	1	1	Xenopus tropicalis hits
- . Xenopus laevis	3	1	Xenopus laevis hits
- . Latimeria chalumnae	2	1	Latimeria chalumnae hits
- Clupeocephala	12	10	
- Otophysi	9	7	
- Characoidei	2	2	
- Pygocentrus nattereri	1	1	Pygocentrus nattereri hits
- Astyanax mexicanus	1	1	Astyanax mexicanus hits
- Cyprinidae	7	5	
- Cyprinus carpio	2	1	Cyprinus carpio hits
- . Danio rerio	2	1	Danio rerio hits
- . Sinocyclocheilus	3	3	
- . Sinocyclocheilus anshuiensis	1	1	Sinocyclocheilus anshuiensis hit
- . Sinocyclocheilus rhinoceros	1	1	Sinocyclocheilus rhinoceros hit
- . Sinocyclocheilus grahami	1	1	Sinocyclocheilus grahami hits
- Salmoninae	3	3	
- Oncorhynchus	2	2	
- Oncorhynchus kisutch	1	1	Oncorhynchus kisutch hits
- . Oncorhynchus mykiss	1	1	Oncorhynchus mykiss hits
- . Salmo salar	1	1	Salmo salar hits
- Callorhynchus milii	1	1	Callorhynchus milii hits
- Branchiostoma	3	2	
- Branchiostoma belcheri	1	1	Branchiostoma belcheri hits
- Branchiostoma floridae	2	1	Branchiostoma floridae hits
- Ciona intestinalis	1	1	Ciona intestinalis hits
- Saccoglossus kowalevskii	1	1	Saccoglossus kowalevskii hits
- Strongylocentrotus purpuratus	1	1	Strongylocentrotus purpuratus hi
- Lophotrochozoa	23	8	
- Capitella teleta	1	1	Capitella teleta hits
- Lingula anatina	2	1	Lingula anatina hits
- Mollusca	20	6	
- Pteriomorpha	14	2	
- Crassostrea gigas	10	1	Crassostrea gigas hits
- Mizuhopecten yessoensis	4	1	Mizuhopecten yessoensis hits
- Gastropoda	4	3	
- Lottia gigantea	2	1	Lottia gigantea hits
- Euthyneura	2	2	
- Aplysia californica	1	1	Aplysia californica hits
- . Biomphalaria glabrata	1	1	Biomphalaria glabrata hits
- . Octopus bimaculoides	2	1	Octopus bimaculoides hits
- Hexacorallia	7	4	
- Scleractinia	3	2	
- Orbicella faveolata	2	1	Orbicella faveolata hits
- Acropora digitifera	1	1	Acropora digitifera hits
- Actiniaria	4	2	
- Exaiptasia pallida	2	1	Exaiptasia pallida hits
- Nematostella vectensis	2	1	Nematostella vectensis hits
- Pseudocohnilembus persalinus	1	1	Pseudocohnilembus persalinus I

Figura IV.1. Ejemplo de reporte taxonómico de secuencias homólogas a SPATS1 de ratón en organismos distantes en la evolución (excluye mamíferos).

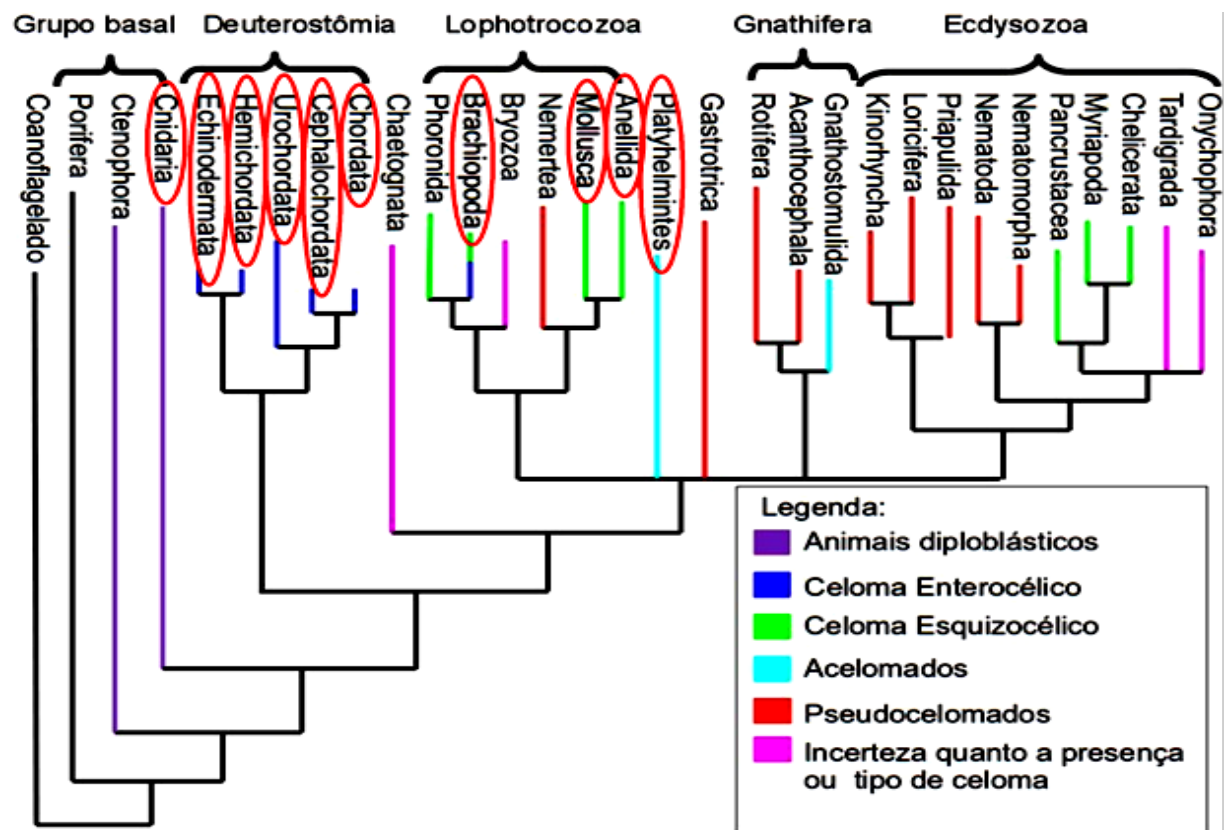
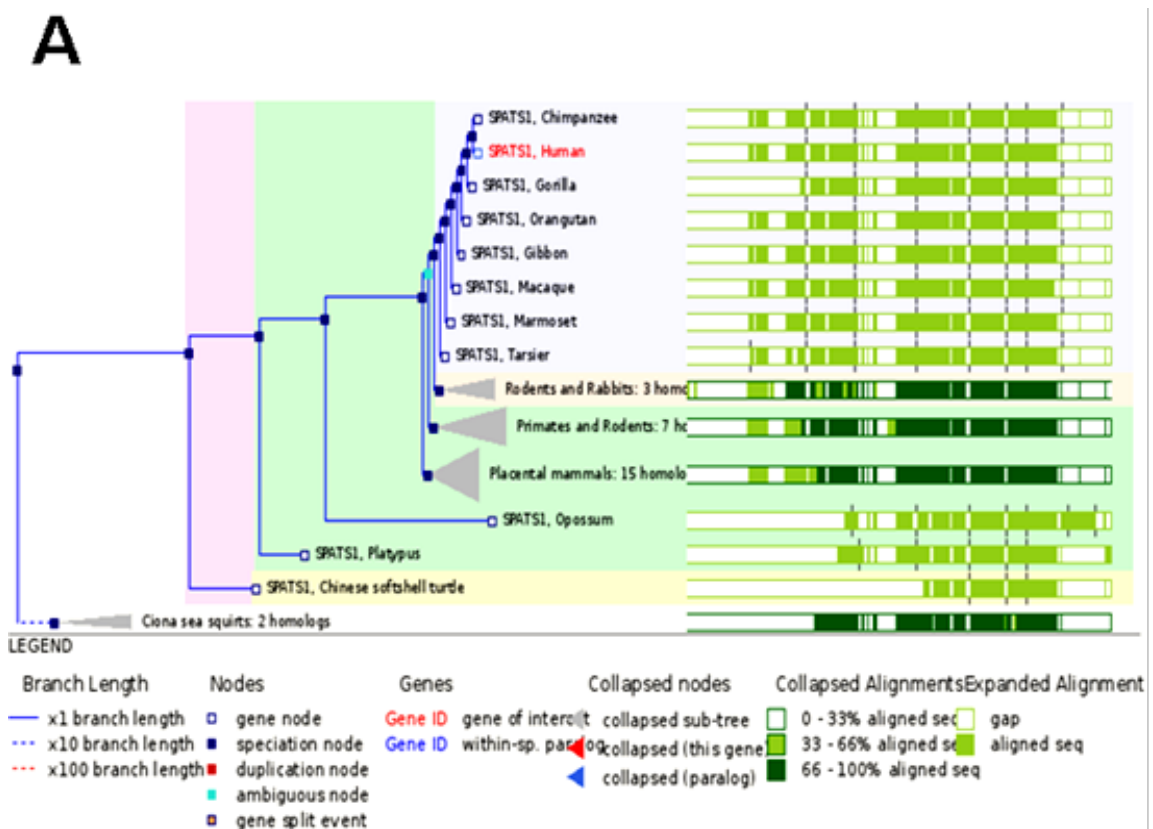


Figura IV.2. Filogenia de los metazoarios. Destacados en rojo se muestran los taxones para los que se identificaron secuencias homólogas a SPATS1 de *Mus musculus*. No se encontraron secuencias homólogas en los genomas de *C. elegans* (Phylum Nematoda) ni *D. melanogaster* (clado Pancrustacea, Phylum Arthropoda).



B

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

```

Mus -----MESKDTQHCDALERSKCL
Rattus -----MEAAPDAQHSDVLESKGCL
Homo MSPSMLTGNSPRCCRLPSISSTTCGRQLERWPEKRDSCMTVEVERTYSANCSDFLESKGCF
Eqqus ---MYTGNCPGCCRWPSISRVTCCTELEHAPKKGDSGMTMAERTYS TKHMD FLCSNCCF
Monodelphis -----MRCG
Alligator -----MVVTGNGARFPNACRGCNMVQSA GSTSQEDGEDGPGQIKSLQHPRLSSQTHR

Mus ANRTSSRQNKRTSLSSSDGTCPRVTE SLGLP RWLTPSDTAAELCQKTS SSSSSSSSSS---
Rattus ASRTSSHQNRRLASLSS-DCTCLRVTDAPCLPRVMTPSDTASGLCQKTSSTSSSSSSSSSS
Homo ANITPS-CRSVSSSSSVE TGPVSEPPGLP RVSA YVDTTADLDRLKLSFS-----
Eqqus ANITPSS-CRSVSPSSSVE TGLVSEPPGPCRVSVHLEPAADLAQRSSSS-----
Monodelphis CGKGCCHPAMDARLD PSPSASMQLD-----
Alligator YHRLHGHQHASHHILASQDNLDRPCLLSEDCSCSNHDLELDLELRSTPPLSTPSSSD---

Mus -----AQSNRSSKVS LPEIPREKYP EEFSL LN-SQTEDGQPEWT FYPRFSSNIHTY
Rattus SPSSSSSAQANRSLKVS LPEIQEKYKYP EEFSL LK-SQTTDQGPPEWT FYPRFSSNIHTY
Homo -----HSDHSS EMS LP EVQRDKYP EEFSL LK-LQTRDGHPRPEWT FYPRFSSNIHTY
Eqqus -----HSDHSS ETS LPKIQNDKYP EEFSL LK-LQTRDQGPPEWT FYPRFSSNIHTY
Monodelphis -----DWLAPKDKKI EYPKE IILLQ-DQR---AAEWS FYPRCC-NLHTY
Alligator -----APLLNTSAATALQCS RSP EKITLLE SPTQNKTKLALEWTFYPRFC-LHTY
          . . . . . * . . . . . * . . . . . * . . . . . * . . . . . * . . . . . *

Mus HIGKQCF FNCVFRGNRPSVAERTVDNSLGRKRYDIDPRNGIPKLT PCDNPMYFPEQSKEF
Rattus HVCKQCF FNCVFRGNRPSVAERTVDSLGRKRYDIDPRNGIPKLT PCDNPMYFPEQSKEF
Homo HVCKQCF FNCVFLGNRPSLSERTVDRKCFGRKRYDIDPRNGIPKLT PCDNPMYFPEQSKCF
Eqqus HVCKQL FNCVFLGNRPSVSE RTVDRKCFGRKRYDIDPRNGIPKLT PCDNPMYFPEQSKDF
Monodelphis HKGKCHFNGLFLANQBCSTEISLAKCFGRKRYGINLRNGLPQLSPCDKPYFRSEQSSDF
Alligator HIGKRCVFMGTFLPKRTSASERTLEMCLGRKHEIDCRNGIPMATPCDNCYNCPEHSLNF
          * ** : * ** * : . . : : . : * ** : * : ** * : * * : * . : * *

Mus FKAGATLPPVNFSLGPYERKFDTFIPLEPLPKIPNL PFWEKKEKANNLRNEIKREVEEDLNW
Rattus FKAGATLPPVNFSLGPYERKFDTFIPLEPLPKIPNL PFWEKKEKANNLRNEIKREVEDLNW
Homo HKACSMLPPVNFSLVPEYERKFDTFIPLEPLPKIPNL PFWVKEKANNLRNEIQEVEEDLNW
Eqqus HKACS TLPPVNFSLVPEYERKFDTFIPLEPLPKIPNL PFWVKEKANNLRNEIKREVEEDLNW
Monodelphis YELCS SMLPVNFSRKPYPYTRKVDTFIPLEPLPKERHL PFSVREKPKOKLNEIMREKLD SW
Alligator HRFCS TRPVVNFCC KRYKRWDTFIPLOHLPQIPCVYHVKERQKELARERNEVKNLDRW
          . . : * ** . * . : . : . : . : . : . : . : . : . : . : . : . : . : . : . :

Mus QVPMPFLHGFFSTGASNFSRQQ-----
Rattus QAPMPFLHGFLSTANRTITTCQKV-----
Homo QPAVPLMHMLHLSCALDFPQCS-----
Eqqus QPAFPSTHS LLTAGSLDFTRCS-----
Monodelphis NPAVPILTWLFPPLPIQKRVDSFVHQKSCMVCELCNEPSTRISQLCKLQVYMKNYPRFH
Alligator KPAPLLRQTL LIPSPLRRIKTS-----
          : . . . . .

```

Figura IV.3. A (página anterior). Árbol filogenético reducido del gen *Spats1*. Se muestran, a modo de ejemplo, algunos mamíferos pertenecientes a las tres sub-clases (Euterios, Metaterios y Monotremas), un reptil (tortuga), y un urocordado (cordado primitivo). En rojo se destaca *Spats1* humano. En verde, a la derecha se muestran las regiones nucleotídicas alineadas. Cuanto más alejado está el organismo evolutivamente de *Mus musculus*, la región que más varía es la N-terminal, correspondiente a los primeros dos exones de la proteína (de un total de ocho exones). Los exones 3-7 parecen ser los más conservados en la evolución. B. Alineación mediante el programa clustalW de las secuencias de la proteína SPATS1 de algunos vertebrados seleccionados, para ilustrar lo mostrado en la figura IV.3A. Los organismos seleccionados son: *Mus musculus*, *Rattus norvegicus*, *Homo sapiens* y *Equus caballus* (mamíferos euterios), *Monodelphis domestica* (marsupial), y *Alligator mississippiensis* (reptil). En gris se muestran las identidades aminoacídicas con respecto a la proteína de *M. musculus*. En celeste se observan aminoácidos conservados entre otros organismos.

1.B. Conservación del patrón de expresión de *Spats1*

A continuación nos propusimos evaluar si además de la secuencia, el patrón de expresión de *Spats1* también se encontraba conservado en las distintas especies. Con ese fin se buscó la información disponible sobre expresión génica. El análisis de los conjuntos de datos generados por el proyecto *Mouse ENCODE Project* de la enciclopedia ENCODE (*Encyclopedia of DNA Elements*, del *National Human Genome Research Institute* de los Estados Unidos), muestra de modo indudable que, al igual que en la rata, en el ratón *Spats1* es un gen de expresión eminentemente testicular (Figura IV.4A). Además, los rastreos mediante el buscador Ensembl nos permitieron comprobar que en todas las especies para las cuales existe información empírica acerca de la expresión de este gen en distintos tejidos, *Spats1* es un gen de expresión diferencial del testículo (Figura IV.4B).

Por otra parte, para los homólogos de SPATS1 identificados más allá de los mamíferos y registrados en la base de datos de NCBI (ver Tabla IV.1. y Figura IV.1), la gran mayoría correspondió a transcritos que fueron identificados en el testículo. A modo de ejemplo, tal es el caso para peces óseos (teleósteos: *Oryzias latipes*, número de acceso FS557457) y cartilagosos (condroictios: *Callorhinchus milii*, número de acceso XP_007901502.1), cefalocordados (*Branchiostoma belcher*, número de acceso XP_019647808 y *Branchiostoma floridae*, número de acceso XP_002590276.1), hemicordados (*Saccoglossus kowalevskii*, número de acceso XP_002731024.1), equinodermos (*Strongylocentrotus purpuratus*, número de acceso XP_001184069.1), braquiópodos (*Lingula anatina*, número de acceso XP_013389114.1), y moluscos (*Octopus bimaculoides*, número de acceso XP_014774497.1).

En relación al patrón de expresión de *Spats1* en el testículo, hemos realizado en colaboración con otros investigadores de nuestro grupo, estudios de RNAseq en los que analizamos el transcriptoma a lo largo de la espermatogénesis del ratón. Para dichos estudios empleamos distintas poblaciones celulares del testículo altamente purificadas por citometría de flujo, representativas de las distintas etapas de la espermatogénesis (Da Cruz *et al.*, 2016). Los transcriptomas estudiados correspondieron a espermatogonias y células somáticas testiculares (población 2C en contenido de ADN), espermatocitos en leptoteno/cigoteno (profase meiótica temprana), espermatocitos paquiténicos (profase meiótica media) y espermátidas redondas (espermiogénesis). El análisis de las listas de transcritos generadas mostró que la expresión de *Spats1* en el ratón aumenta en la profase meiótica media: *Spats1* aparece expresada aproximadamente unas 2,5 veces más en los

espermaticos paquiténicos que en la población 2C y espermaticos leptocigoténicos. Por otra parte, la expresión decae aproximadamente 4,5 veces en las espermáticas (ver listas suplementarias del mencionado manuscrito). Este resultado confirma los datos publicados previamente por nosotros para la rata, mostrando que el patrón temporal de expresión de *Spats1* a lo largo de la espermatogénesis coincide en ambas especies.

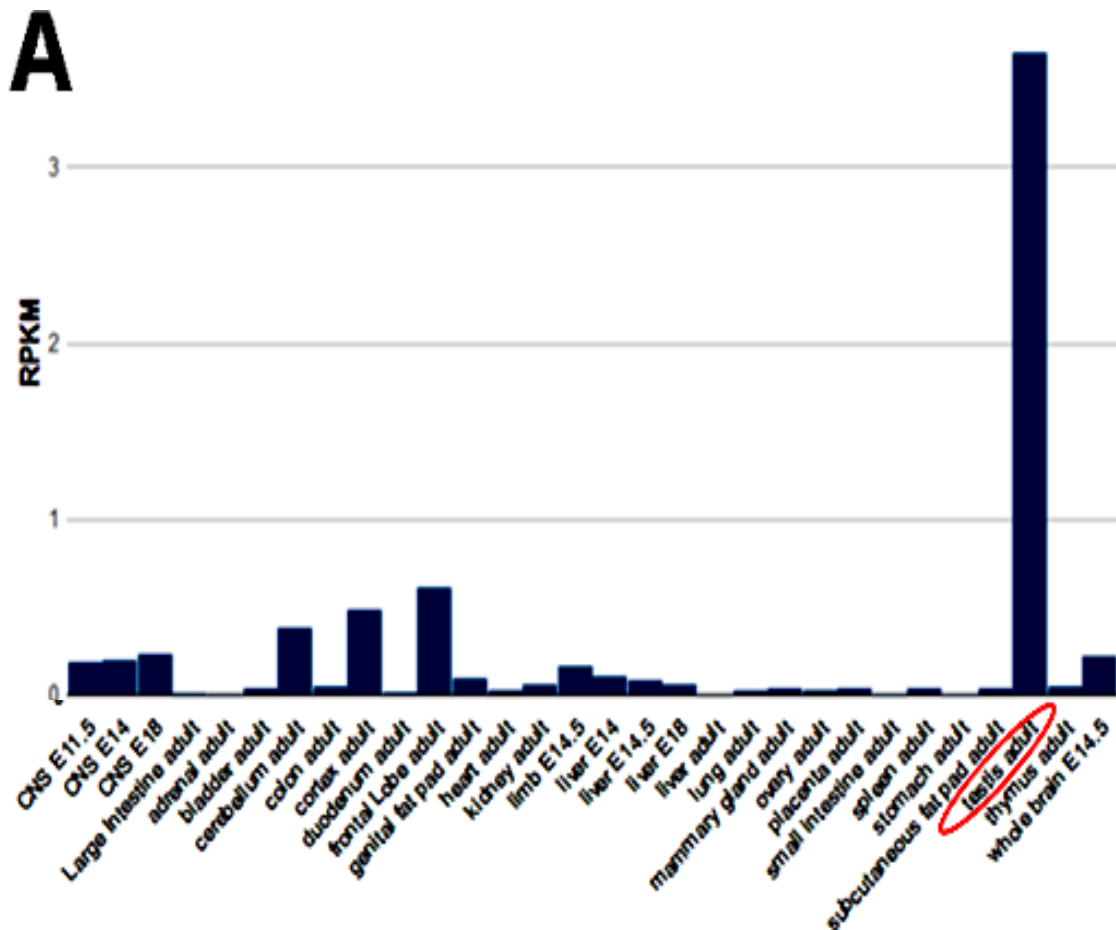
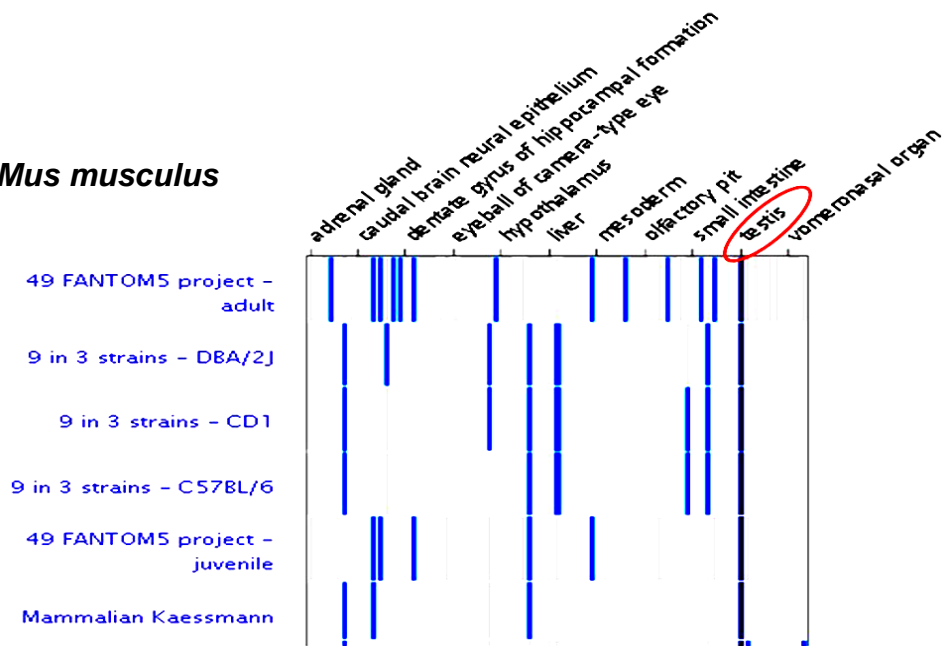


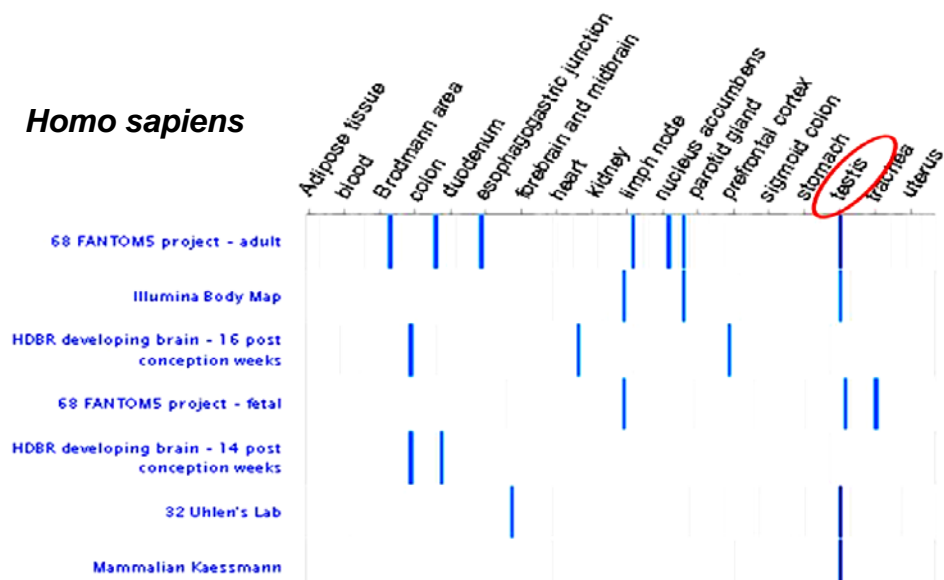
Figura IV.4. A. Patrón de expresión de *Spats1* en distintos tejidos del ratón obtenido mediante ensayos de transcriptómica. Fuente: Mouse ENCODE Project. Las barras del gráfico representan RPKM (*Reads Per Kilobase per Million mapped reads*). Se destaca testículo con un óvalo rojo. **B** (página siguiente). Patrón de expresión tisular de *Spats1* en distintas especies, identificado mediante el buscador Ensembl. Las especies mostradas son *Mus musculus*, *Rattus norvegicus*, *Homo sapiens*, *Ovis aries* (oveja), *Equus caballus*, y *Opposum* (zarigüeya, marsupial). La columna correspondiente a testículo se destaca, con un óvalo rojo.

B

Mus musculus



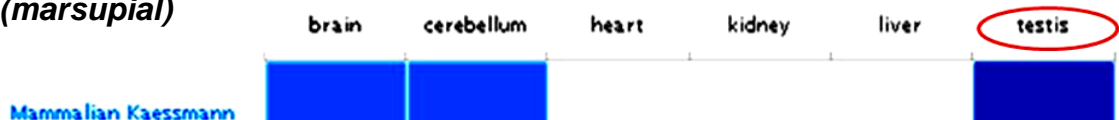
Homo sapiens



Equus caballus



Opossum (marsupial)



1.C. Similitudes con otras proteínas, y dominios proteicos

Para estos estudios nos basamos en la secuencia de SPATS1 de *M. musculus*. La búsqueda de similitudes de secuencia con otras proteínas en bases de datos nos indicó que SPATS1 no sería parte de una familia proteica, ya que no presenta similitudes importantes con ninguna proteína conocida, por lo cual no podemos inferir función a partir de similitudes con otras proteínas.

El dato más llamativo, surgido a partir de los análisis efectuados con la herramienta de software *Conserved Domain Architecture Retrieval Tool* contenida en el portal NCBI, fue la homología parcial con la proteína CDC5L (*cyclin dependent kinase 5-like*), una proteína presente en todos los eucariotas e involucrada en la regulación del ciclo celular (ver Figura IV.5A). Se ha visto que dicha proteína constituye parte del ensamblaje proteico del espliceosoma (Boudres *et al.*, 2000), exhibe un dominio central rico en prolina que actúa como activador transcripcional, es fundamental para la progresión del procesamiento del pre-ARNm e ingreso en mitosis, y presenta similitud significativa con la proteína CDC5 de *Schizosaccharomyces pombe*, importante regulador de la salida de G2 e ingreso en mitosis en la levadura (Ganech *et al.*, 2011).

Curiosamente, en todos los genomas de mamíferos pertenecientes a diversos órdenes que hemos investigado así como en otros vertebrados, *Spats1* y *Cdc5l* son genes contiguos, encontrándose siempre en el mismo cromosoma (Figura IV.5B y Tabla IV.2). Es más: en los transcriptomas de al menos dos de las especies analizadas, *Cricetulus barabensis* (hámster chino), y *Echinops telfairi* (erizo de tierra), los dos genes se encuentran fusionados expresándose como una única unidad transcripcional (Figuras IV.5C y D).

Ignoramos el significado de este hallazgo, y en particular de que ambos genes compartan una región con similitud de secuencias, pero el hecho de que estos genes segreguen juntos a lo largo de la evolución de los mamíferos y de otros vertebrados podría eventualmente sugerir algún tipo de relación funcional.

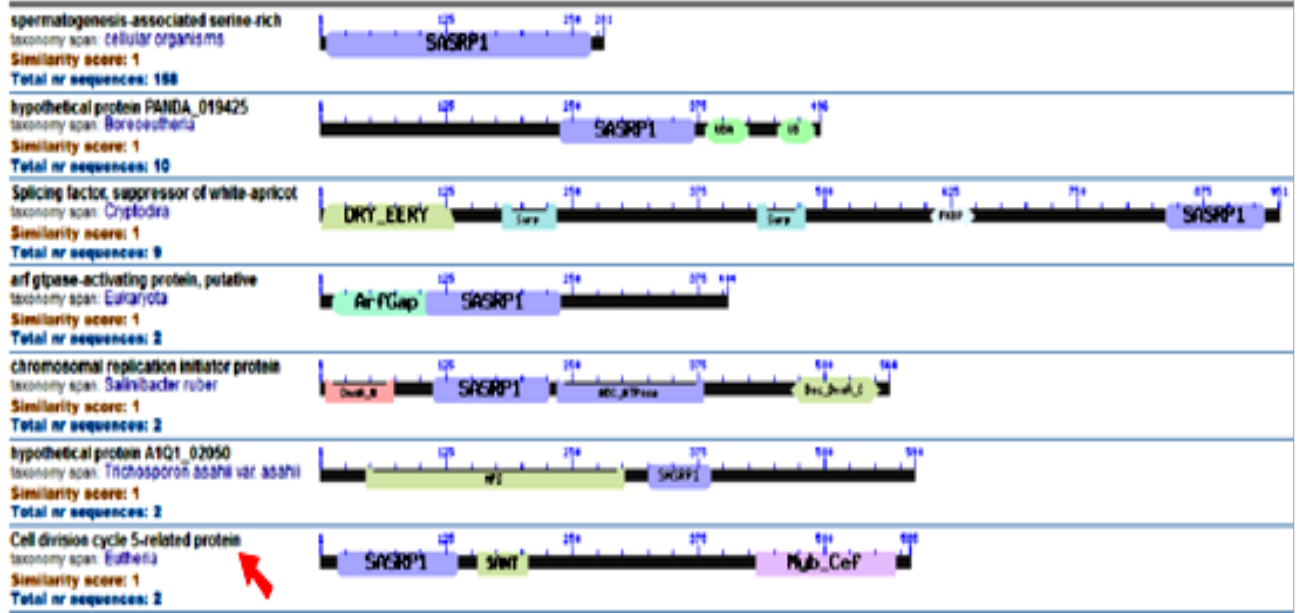
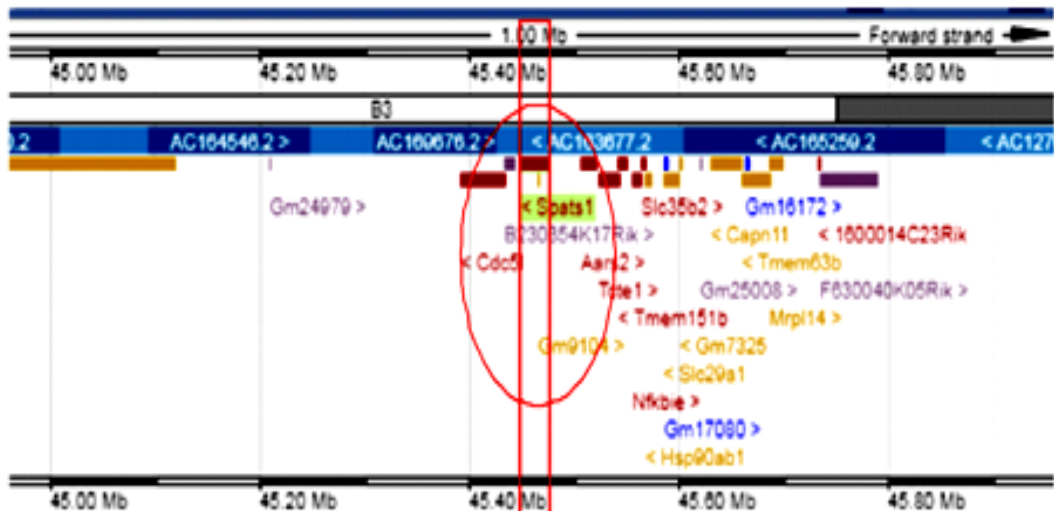
A**B**

Figura IV.5. A. Resultados obtenidos del análisis de búsqueda de proteínas con homología de dominios proteicos con SPATS1. Las barras violetas (SASRP1: *spermatogenesis-associated serine-rich protein 1*) representan distintos fragmentos de la secuencia de SPATS1 encontrados en las otras proteínas representadas, que podrían, eventualmente, tener homología funcional. Entre ellas se encuentra la proteína CDC5L (flecha roja). **B.** Se muestra un ejemplo de cómo *Spats1* y *Cdc5l* son genes contiguos en ratón (círculo rojo). **C (página siguiente).** Secuencias de ARNm de *Cdc5l* de hámster chino (gi|344245234|gb|EGW01338.1|) y *Spats1* de *M. musculus* (gi|259013563|ref|NM_145026.3|) traducidas conceptualmente, alineadas. En el recuadro se puede observar la región de SPATS1 de hámster chino que alinea con SPATS1 de *M. musculus*, y que en el hámster chino el gen *Spats1* está fusionado con el gen *Cdc5l*. Los asteriscos marcan las identidades aminoacídicas. **D (página siguiente).** Alineamiento de las secuencias proteicas (ARNm traducido conceptualmente) de CDC5L de erizo de tierra (gi|507682399|ref|XM_004710878|) con SPATS1 de *M. musculus* (gi|259013563|ref|NM_145026.3|). Se puede observar que, al igual que en el hámster chino, el ARNm del erizo tiene los dos transcritos fusionados. En el recuadro se muestra la región de SPATS1 encontrada dentro de CDC5L del erizo. Los asteriscos marcan las identidades aminoacídicas.

C

CDC5L hamster -----HTVTRAG-----YDLALVTR----- 16
 SPATS1 ratón KTSSTSSSSSSSSSSSSPSSSSSAQANRSLKVSLPEIQKEKYPEEFSLKKS 50
 : * : : *

```

----DCHRPEMTFYPRFSSNIHTYHTGKQCFFSCVFRGNRKSVAESTVDKS 63
QTTDGCQRPENTFYPRFSSNIHTYHVCKQCFFNGVFRGNRKSVAERTVDKS 100
*:*****:

LGRKKYDIDPRNGIPRLTPGDNPYHFPEQSKCFKAGATLPPVNFSL---- 110
LGKKKYDIDPRNGIPKLTGDNPYHFPEQSKCFKAGATLPPVNFSLGPY 150
*:*****:

-----LPFLEKFKANNLSNEIKEVEELDSWQASSPFL 142
EKKFDTFIPLEPLPQIPNLPFWKFKANNLKNEIKEVEDLDNWQAMPFL 200
***:*****:*****:*****:*****:

SSFFSSGRYEWDPSIKKTEUSREEEKLHLAKLHNPQWRTIAP IIGRT 192
HGFLSTAN-----RT 210
*:*****:
  
```

```

AAQCLEHYEFLLDKTAQRDNEEETTDDPKLKPGEIDPNPETKPARPDP I 242
ITTCDCQKV----- 218
: * : :
  
```

```

DMEDELEHLSERARLANTQCKKAKKAREKQLEEARHEKEGRDKKDK 292
-----
  
```

```

QHLKRRKESDLPSAILQTSQVSEFTKPKSKLVLPAQISDAELQEWKVG 342
-----
  
```

```

QASEVARQTAEESGITNSASSTLLSEYNVTNNSIALRTPRTPASQDRILQ 392
-----
  
```

D

SPATS1 ratón MEAARDAQHSDVLESKGLASRTSSHQNRPASLSSDGTGLRVTDAPGLPR 50
 CDC5L erizo -----

```

VMTPSDTASGLGQKTSSTSSSSSSSSSSPSSSSSAQANRSLKVSLPEIQ 100
-----MHQSSPSSSSSSSSRTESSEP-----ALPEIQ 26
*:*****: : * : :
KEKYPEEFSLKKSQTDDGQRPENTFYPRFSSNIHTYHVCKQCFFNGVFRG 150
RDKSAENFSLKKSQTRDQRPENTFYPRFSSNIHTYHVCKQCFFNGVFLG 76
*: * : :*****:*****:*****:*****:
NRKSVAERTVDKSLGKKKYDIDPRNGIPKLTGDNPYHFPEQSKCFKAG 200
NRRSQSETRVQDKLGRKKYGDIDPRNGIPKLTGDKPYHYPEQSKDFHVQ 126
*: * : :*****:*****:*****:*****:
ATLPPVNFSLGPHYEKKFDTFIPLEPLPQIPNLPFWKFKANNLKNEIKEV 250
STLPSVKFSIVPYEKKFDTFIPLEPLPQIPSLPFWKFKANNLKNEIREV 176
*: * : :*****:*****:*****:*****:
EDLDNWQAMPFLHGFLS----- 266
EALDNWQPAVSLIPTVLSPEILKAAVKYGNQWSRIASLLHKSAKQCK 226
* *****: : : : *
  
```

```

-----TANRTIT-----TCDQKV 261
ARWYEWDPSIKKTEUSREEEKLHLAKLHNPQWRTIAP IIGRTAAQCL 276
* * * * : * * :
  
```

```

-----
EHYEFLLDKAAQDNDEEETTDDLKPKLKPGEIDPNPETKPARPDP IDHDED 326
-----
  
```

```

-----
ELEHLSERARLANTQCKKAKKAREKQLEEARRLAALQKRRERAAQIE 376
-----
  
```

```

-----
IQKRRKRRKGVQVYNAEIPFEKPPALGPFYDTSSENYQALDADFKKLRQDDL 426
-----
  
```

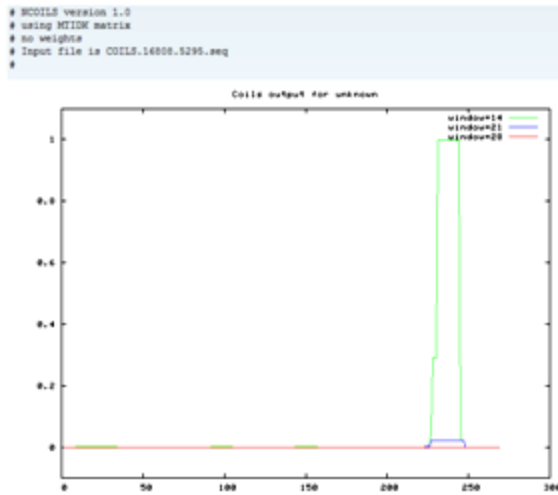
Tabla IV.2. Ejemplos de la ubicación en el genoma de distintos vertebrados, de los genes *Spats1* y *Cdc5l*. Obsérvese que tanto entre los mamíferos como en *Xenopus* están en el mismo cromosoma, no así en el pez cebra.

Nombre común	Locus <i>Spats1</i>	Locus <i>Cdc5l</i>
<i>Mus musculus</i>	Chromosome 17: 45,448,937-45,474,938	Chromosome17: 45,391,892-45,433,707
<i>Bos taurus</i> (vaca)	Chromosome 23, 17681089-17726266	Chromosome 23: 17,731,040-17,771,515
<i>Homo sapiens</i>	Chromosome 6: 44,342,660-44,377,167	Chromosome 6: 44,387,525-44,450,426
<i>Pan troglodytes</i> (chimpancé)	Chromosome 6: 45,003,811-45,038,524	Chromosome 6: 45,049,174-45,109,342
<i>Eqqus caballus</i>	Chromosome 20: 43,204,803-43,229,366	Chromosome 20: 43,237,277-43,285,465
<i>Delphinus delphis</i> (delfín)	GeneScaffold_1482:154290-177978	GeneScaffold_1482: 183,660-226,589
<i>Xenopus laevis</i>	Chromosome 5: NC_030681.1 141783374..141801829	Chromosome 5, NC_030681.1 143865412-143889586
<i>Danio rerio</i> (pez cebra)	Chromosome 20: 36220508..36232917	Chromosome 17: NC_007128.7 5061135..5105925

A continuación se realizó la búsqueda de dominios conocidos en la proteína SPATS1 mediante diversas herramientas bioinformáticas, y empleando para ello la secuencia de la proteína de *M. musculus*. Además de la región rica en serinas y la señal de localización nuclear previamente reportadas (Capoano *et al.*, 2010), estudios realizados en paralelo empleando los programas *Coils*, *Marcoil*, *NPS* y *Predictor of coiled-coil regions* indicaron la presencia de un motivo de tipo coiled-coil en la región C-terminal, entre los residuos 229/230 y 242/243 de la proteína (Figuras IV.6A y B). Los coiled-coils son motivos que suelen mediar interacciones proteína-proteína, ya sea homotípicas o heterotípicas (e.g. Fraune *et al.*, 2012b). Muchas proteínas estructurales, así como también proteínas participantes en la regulación de la expresión génica, presentan motivos de tipo coiled-coil (e.g. Fraune *et al.*, 2012b; Terawaki *et al.*, 2017). Varias proteínas implicadas en la unión intercelular también poseen motivos de este tipo (e.g. Sarrouilhe *et al.*, 2006, Schofield y Bernard, 2013; Xu *et al.*, 2017).

A

MESSKDTQHGDALSKSCLAN**RTSSRQNKRTSLSSSDGTGPRVTE**SLGLP 50
RVLTPSDTAAELGQKT**SSSSSSSSSS**SAQSNRSSKVSLEIPKEKYPEEFS 100
 LLNSQTEDGQRPEWTFYPRFSSNIHTYHIGKQCFNGVFRGNRRSVAERT 150
 VDNSLGKKKYDIDPRNGIPKLTPGDNPYMFPEQSKEFFKAGATLPPVNF 200
 LGPYEKKFDTFIPLEPLPKIPNLPFWEKE**KANL**LKNE**I**KEVEE**L**DNWQVP 250
 MPFLHGFFSTGASNF**S**RQQ

B**a****b**

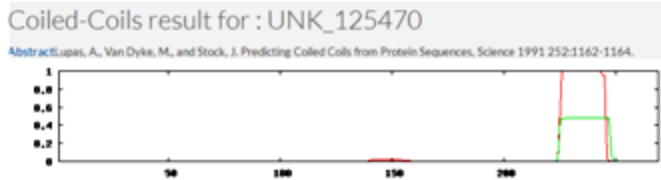
1. SUMMARY OF COILED-COIL DOMAINS
 AT DIFFERENT LEVELS OF STRINGENCY

PREDICTED DOMAINS AT THRESHOLD 1% :
 1. from 226 to 247 (length = 22) with max = 57.4%

PREDICTED DOMAINS AT THRESHOLD 10% :
 1. from 227 to 244 (length = 18) with max = 57.4%

PREDICTED DOMAINS AT THRESHOLD 50% :
 1. from 230 to 242 (length = 13) with max = 57.4%

state:	a	b	c	d	e	f	g	cc(mm)	CC-ss	ph	st
221P	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.04%	0.00%	0.00%	0.05%	e	0	
222N	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.12%	0.00%	0.12%	f	0	
223L	0.01%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.16%	0.17%	g	0	
224P	0.21%	0.01%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.23%	a	0	
225F	0.00%	0.64%	0.01%	0.00%	0.00%	0.01%	0.00%	0.67%	b	0	
226W	0.00%	0.00%	3.20%	0.03%	0.00%	0.01%	0.04%	3.28%	c	0	
227E	0.26%	0.00%	0.01%	15.72%	0.05%	0.00%	0.21%	16.26%	d	0	
228K	0.27%	0.79%	0.00%	0.01%	35.16%	0.06%	0.00%	36.30%	e	0	
229E	0.00%	0.32%	1.05%	0.00%	0.01%	45.63%	0.06%	47.08%	f	0	
230K	0.06%	0.00%	0.34%	1.13%	0.00%	0.01%	49.64%	51.20%	g	0	
231A	51.46%	0.06%	0.00%	0.35%	1.32%	0.00%	0.01%	53.20%	a	0	
232N	0.01%	52.88%	0.06%	0.00%	0.35%	1.61%	0.00%	54.92%	b	0	
233N	0.00%	0.01%	53.96%	0.05%	0.00%	0.35%	1.78%	56.18%	c	0	
234L	1.97%	0.00%	0.01%	54.75%	0.05%	0.01%	0.35%	57.15%	d	0	
235K	0.35%	2.04%	0.00%	0.01%	54.91%	0.05%	0.01%	57.38%	e	0	
236N	0.01%	0.35%	2.08%	0.00%	0.01%	54.94%	0.05%	57.44%	f	0	
237E	0.05%	0.01%	0.35%	2.09%	0.00%	0.01%	54.92%	57.43%	g	0	
238I	54.81%	0.05%	0.00%	0.33%	2.11%	0.00%	0.01%	57.32%	a	0	
239K	0.01%	54.51%	0.05%	0.00%	0.31%	2.12%	0.00%	57.02%	b	0	
240E	0.00%	0.01%	53.88%	0.06%	0.00%	0.27%	2.13%	56.35%	c	0	
241V	2.13%	0.00%	0.01%	51.97%	0.06%	0.00%	0.16%	54.34%	d	0	
242E	0.12%	2.12%	0.00%	0.01%	49.96%	0.07%	0.00%	52.28%	e	0	
243E	0.00%	0.10%	2.08%	0.00%	0.01%	41.75%	0.08%	44.02%	f	0	
244L	0.08%	0.00%	0.05%	1.95%	0.00%	0.01%	20.33%	22.42%	g	0	
245D	5.02%	0.06%	0.00%	0.02%	1.39%	0.00%	0.01%	6.52%	a	0	
246N	0.00%	3.24%	0.07%	0.00%	0.01%	0.96%	0.00%	4.28%	b	0	
247W	0.00%	0.00%	0.98%	0.05%	0.00%	0.01%	0.19%	1.23%	c	0	
248Q	0.09%	0.00%	0.00%	0.52%	0.04%	0.00%	0.00%	0.66%	d	0	
249V	0.00%	0.03%	0.00%	0.00%	0.17%	0.02%	0.00%	0.23%	e	0	

c**d**

```

SEQ: MESSKDTQHGDALSKSCLANRTSSRQNKRTSLSSSDGTGPRVTESLGLPRVLTPSDTAAELGQKTSSSSSSSSSSSAQSNRSSKVSLEIPKEKYPEEFSLLNSQTEDGQRPEWTFYPRFSS
FRD: .....

.....

NINITYHIGKQCFNGVFRGNRRSVAERTVDNSLGKKKYDIDPRNGIPKLTPGDNPYMFPEQSKEFFKAGATLPPVNFSGPYEKKFDTFIPLEPLPKIPNLPFWEKEKANLLKNEIKEVEELDNWQVP
.....
HHHHHHHHHHHHHHH.....

.....

MPFLHGFFSTGASNFSRQQ

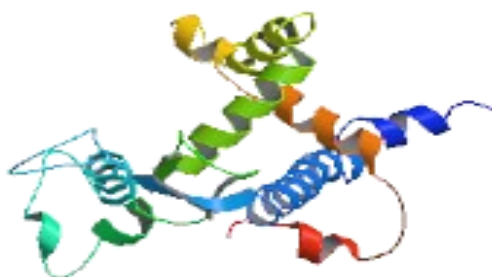
```

Figura IV.6.A. Secuencia de aminoácidos de la proteína SPATS1 de *M. musculus*. Se señalan el tramo rico en serinas (verde), la señal bipartita putativa de localización nuclear (rojo) y el motivo coiled-coil predicho (azul). **B.** Predicción de motivo coiled-coil en la secuencia de SPATS1, realizada mediante los programas *Coils* (a), *Marcoil* (b), *NPS* (c) y *Predictor of coiled-coil regions* (d). El recuadro rojo en b comprende las probabilidades de formar coiled-coil, para cada uno de los aminoácidos señalados. En d la región correspondiente al coiled-coil está individualizada con una secuencia de Hs.

1.D. Predicción de estructura proteica (MODbase Database)

En el pasado, no habíamos conseguido modelar la proteína SPATS1 por falta de estructuras cristalinas documentadas para proteínas, que fueran lo suficientemente similares como para permitir su uso como base para el modelado. En esta instancia y con la incorporación creciente de estructuras cristalinas de diferentes proteínas en las bases de datos, se realizó la modelización teórica de la proteína SPATS1 de *M. musculus*. En la Figura IV.7 se observa la estructura proteica estimada, predicha por el programa MODbase.

A



B

```
MSPSMLTGNSPRGCRLPSISSTTCGRQLEKVPEKRDSGMTEVERTYSANCSDFLESKGC  
ANTTPSGKSVSSSSSVETGPSVSEPPGLPRVSAYVDTTADLDRKLSFSDHSSEMSLPE  
VQDKYPEEFSLKLQTKDGHPEWTFYPRFSSNIHTYHVGKQCFNNGVFLGNKRSLSER  
TVDKCFGRKKYDIDPRNGIPKLTGDNPMYPEQSKGFHKAGSMLPPVNF SIVPYEKKFD  
TFIPLLEPLPQIPNLPFVWKEKANSLKNEIQEVEELDNWQPAVPLMHMLHLSGALDFPRQS
```

Figura IV.7. Modelización de la proteína SPATS1 de MODBase. **A.** Estructura teórica predicha por el *software* de modelización Modbase. **B.** Secuencia proteica predicha de SPATS1 de ratón. En rojo se observa la región de la proteína utilizada por el programa para la modelización.

El molde cristalino más cercano encontrado en la base de datos, y que utilizó el *software* para modelar a SPATS1, corresponde a la proteína 2RI9_A, con una identidad de secuencia del 37%. Se trata de una proteína de 475 aminoácidos llamada alpha-1,2-manosidasa, perteneciente a *Penicillium citrinum*.

Del análisis del modelo de la estructura predicha se desprende que SPATS1 es una proteína hidrofílica, con hojas alpha y beta, sin estructuras internas hidrofóbicas o globulares. Esto indica que SPATS1 sería una proteína fácilmente accesible por fosfatasa, kinasa u otras proteínas. Destacamos que en todas las especies analizadas SPATS1 presenta un tramo de serinas de longitud variable que en el ratón está constituido por una treonina y

diez serinas consecutivas, que constituye un probable blanco de fosforilación por serín/treonínquinasas. En este sentido, previamente habíamos demostrado que la proteína SPATS1 de *Rattus norvegicus* es altamente fosforilable, y que dicha fosforilación probablemente ocurre en su tramo de serinas (Capoano *et al.*, 2010). Por otra parte, el *software* también sugiere que SPATS1 no presentaría sitios de unión a ADN. Nuevamente, en este caso el modelo tridimensional de la proteína no contribuye a permitirnos inferir función.

1.V.E. Predicción de interacciones proteína-proteína

Se realizaron búsquedas de información disponible acerca de posibles proteínas que pudieran interactuar con SPATS1, empleando la base de datos de interacciones moleculares IntAct, que provee una base de datos y un conjunto de herramientas de análisis de acceso libre para estudio de interacciones moleculares, basándose tanto en la literatura como en información subida directamente por usuarios. Las búsquedas mediante este recurso arrojaron información correspondiente a estudios empíricos de doble híbrido de levadura (no publicados), que mostraron siete posibles interactores para SPATS1 (ver Tabla IV.3):

- **Alpha catenina (CTNNA3):** Proteína de los complejos de adhesión celular, de unión a actina, β -catenina y cadherina (ver Introducción). También conocida como alpha T-catenina (testicular), ha sido reportada como una proteína tejido-específica expresada predominantemente en las células mioides peritubulares del testículo, y en el corazón (Janssens *et al.*, 2001). Su interacción con la vía Wnt ha sido reportada (Busby *et al.*, 2004).
- **Zinc finger protein ZIC1:** activador transcripcional involucrado en neurogénesis, que promueve la migración de ciertas neuronas hacia territorios localizados ipsilateralmente en el cerebelo (Yokota *et al.*, 1996). Información reciente sugiere que ZIC1 podría desempeñar un rol en el cáncer de ovario (Du *et al.*, 2015).
- **GPHN (gephirina):** Proteína citoesquelética asociada a microtúbulos, involucrada en interacciones entre el citoesqueleto de actina y proteínas de membrana. En el sistema nervioso, se cree que ancla el receptor inhibitorio de glicina a microtúbulos subsinápticos. En tejidos no neurales, participa también en la biosíntesis del cofactor molibdeno (Climer *et al.*, 2015).
- **MISP (Mitotic interactor and substrate of PLK1):** Proteína con múltiples sitios de unión a actina, que participaría, entre otras cosas, en la orientación del huso y progresión

mitótica. Ligaría los microtúbulos al citoesqueleto de actina y las adhesiones focales. Co-localiza parcialmente con actina-F, y se ha propuesto como un efector en la reorganización de la actina, específico de tipo celular (Kumeta *et al.*, 2014).

- **KCTD9**, BTB/POZ *domain-containing protein*: Proteína participante en las vías de ubiquitinación de proteínas, para su degradación por el proteasoma (Ji *et al.*, 2016).
- **CFLAR** (*Casp8 and FADD-like apoptosis regulator*). Inhibidor de la apoptosis, expresado predominantemente en el testículo (Ming-Xiao *et al.*, 2013). Interactúa con FLICE, caspasa 8, caspasa 10, MAP2K1, TRAF y DED (Wang *et al.*, 2017).
- **SPG7** (*Spastic paraplegin-7*). Metaloproteasa ATP-dependiente, que se localiza en la mitocondria (Shanmughapriya *et al.*, 2015). Un marco abierto de lectura situado en el extremo 3'-UTR del ARNm de *Spg7* ha sido identificado como un regulador de la adhesión celular, si bien no existe evidencia experimental de la producción endógena de dicha proteína (<http://www.uniprot.org/uniprot/Q9UQ90>).

Si bien es cierto que los estudios de doble híbrido suelen dar numerosos falsos positivos, y por lo general los resultados deben ser corroborados por otro método, resulta llamativo que una importante proporción de las interacciones identificadas por los ensayos de doble híbrido corresponden a proteínas citoesqueléticas, de interacción con actina.

Tabla IV.3. Resultados de la búsqueda de interacciones proteína – proteína, obtenidos mediante IntAct.

Molecule 'A'	Links 'A'	Molecule 'B'	Links 'B'	Interaction Detection Method	Interaction AC	Source Database
SPATS1	Q496A3 EBI-3923692	CTNNA3	Q9UI47-2 EBI-11962928	two hybrid array	EBI-14817746 imex : IM-25472-66276	IntAct
				two hybrid prey pooling approach	EBI-14817735 imex : IM-25472-66275	IntAct
SPATS1	Q496A3 EBI-3923692	ZIC1	Q15915 EBI-11963196	two hybrid prey pooling approach	EBI-14296728 imex : IM-25472-20475	IntAct
				two hybrid array	EBI-14296739 imex : IM-25472-20476	IntAct
SPATS1	Q496A3 EBI-3923692	GPHN	Q9NQX3 EBI-2371891	two hybrid array	EBI-3925081 imex : IM-15364-1752	IntAct
SPATS1	Q496A3 EBI-3923692	MISP	Q8IVT2 EBI-2555085	two hybrid prey pooling approach	EBI-14298312 imex : IM-25472-20615	IntAct
				two hybrid array	EBI-14298323 imex : IM-25472-20616	IntAct
SPATS1	Q496A3 EBI-3923692	KCTD9	Q7L273 EBI-4397613	two hybrid prey pooling approach	EBI-14202605 imex : IM-25472-12173	IntAct
				two hybrid array	EBI-14202616 imex : IM-25472-12174	IntAct
SPATS1	Q496A3 EBI-3923692	CFLAR	O15519 EBI-514941	two hybrid array	EBI-3923709 imex : IM-15364-1636	IntAct
SPATS1	Q496A3 EBI-3923692	SPG7	Q9UQ90 EBI-717201	two hybrid array	EBI-3923699 imex : IM-15364-1635	IntAct

2. GENERACIÓN DE RATONES *KNOCKOUT* DEL GEN *Spats1*

Los análisis bioinformáticos no arrojan ideas claras acerca de la posible función de SPATS1 en relación con la espermatogénesis. Con el objeto de intentar conocer la función de esta proteína, se procedió a la generación de ratones *knockout* (KO) para el gen *Spats1*. Dado que no existían antecedentes de la generación de ratones KO en el Uruguay, desarrollar la tecnología de producción de ratones KO en nuestro país constituyó un objetivo en sí mismo, más allá del objetivo específico en relación a la caracterización funcional de la proteína SPATS1.

2.A. Utilización del método *Recombineering* para la generación de ratones KO

En primera instancia se decidió abordar la construcción del ratón KO mediante la técnica de *Recombineering*, técnica que al momento de iniciarse este proyecto se describía como revolucionaria y de mucho mayor eficiencia que las preexistentes (Liu *et al.*, 2003; Chan *et al.*, 2007). Como se explicó anteriormente (ver Introducción), el sistema requiere la generación de un vector direccionador (*targeting vector*), lo que involucra varios pasos de construcción molecular hasta su obtención. Los pasos involucrados en la construcción del vector direccionador se detallan en Materiales y Métodos. Brevemente, el primer paso es subclonar aproximadamente 13 kb del BAC *Spats1* en un “plásmido aceptor” PL253. El segundo paso sería recombinar un casete de resistencia a neomicina (Neo^r) de 1,9 Kb, de manera que interrumpiera el exón 2 de la secuencia de *Spats1* subclonada en el plásmido aceptor.

En primer lugar, se adquirió un BAC conteniendo la secuencia de *Spats1* de *M. musculus*. A continuación, se amplificó por PCR el casete Neo^r a partir del plásmido pL452 (no mostrado). Luego, se consiguió amplificar por PCR y ligar los dos brazos de homología al BAC *Spats1* (“PCR arms”, de 450 pb cada uno) en el vector PL253, consiguiéndose así el “plásmido aceptor” (Figura IV.8), como requiere la técnica.

Posteriormente, células SW102 fueron incubadas a 42°C por 15 minutos para activar la expresión de las recombinasas, y se les electroporó el plásmido aceptor linealizado (conteniendo los brazos de homología).

De este experimento esperábamos obtener colonias recombinantes que contuvieran el plásmido direccionador, con 13 kb de *Spats1* subclonadas desde el BAC, mediante el método de *gap repair*. El resultado del experimento fue que crecieron miles de colonias

transformantes resistentes a ampicilina (marcador de selección presente en el plásmido PL253), pero carentes del plásmido. Es decir, la recombinación se produjo de tal modo que el plásmido aceptor quedó inserto en el BAC, en vez de subclonarse los 13 kb de *Spats1* del BAC en el plásmido aceptor, que era el último paso para la obtención del vector direccionador.

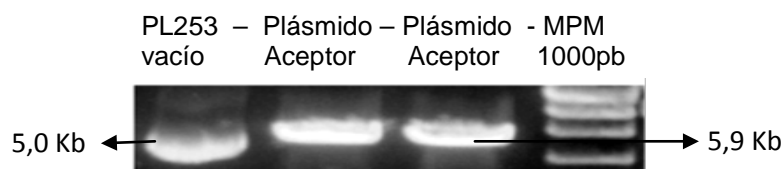


Figura IV.8. Se muestra un gel de electroforesis en agarosa al 1%, donde se corrieron el plásmido PL253 control (vacío) y los plásmidos aceptores lineales (PL253 + “PCR arms” ligados).

Luego de varios meses de intentos, y dada la aparición de algunos trabajos reportando que este era uno de los problemas que podían presentarse en el uso de esta técnica (Lee *et al.*, 2009), se decidió discontinuar los experimentos e intentarlo por el método de *gene trap*.

2.B. Utilización del método de *gene trap*

El primer paso fue realizar una búsqueda en la base de datos del portal del *Knockout Mouse Project* (<https://www.komp.org>), para averiguar si ya existía algún ratón KO para *Spats1* desarrollado disponible, o células madre que ya hubieran sido mutadas en el gen *Spats1* mediante la técnica de *gene trap*. Con respecto a la disponibilidad de ratones KO para *Spats1*, el resultado fue que hasta el momento no se hallaba publicado o reportado en bases de datos ningún ratón KO para este gen. Por otro lado, se encontraron cientos de clones de células ES que contenían *gene traps* en el gen *Spats1*.

Luego de un exhaustivo análisis de secuencia de los clones de trampa génica de *Spats1* disponibles, finalmente seleccionamos tres líneas celulares que contenían el *gene trap* en el intrón 1, entre los exones 1 y 2 (Figura IV.9), de modo que el casete estuviera interrumpiendo el gen al inicio del mismo (ver Introducción, Figura I.6B), y maximizando así las posibilidades de que la proteína aberrante obtenida fuera no funcional. El motivo para haber elegido tres líneas es que no es infrecuente que algunas de estas líneas celulares puedan contener defectos cromosómicos como aneuploidías, o defectos epigenéticos

(Carstea *et al.*, 2009), y por lo tanto no prosperen, por lo cual se recomienda elegir más de una.

Las tres líneas de células ES Lex3.13 (de ratones negros, cepa C57BL/6N) mutadas seleccionadas, fueron los clones IST13143D8, IST10765G4 e IST15080B12 (ver Figura IV.9). Estas células fueron microinyectadas en blastocistos o mórulas de ratones de la cepa de laboratorio BALB/cJ (albinos), y los embriones se transfirieron a hembras pseudopreñadas.

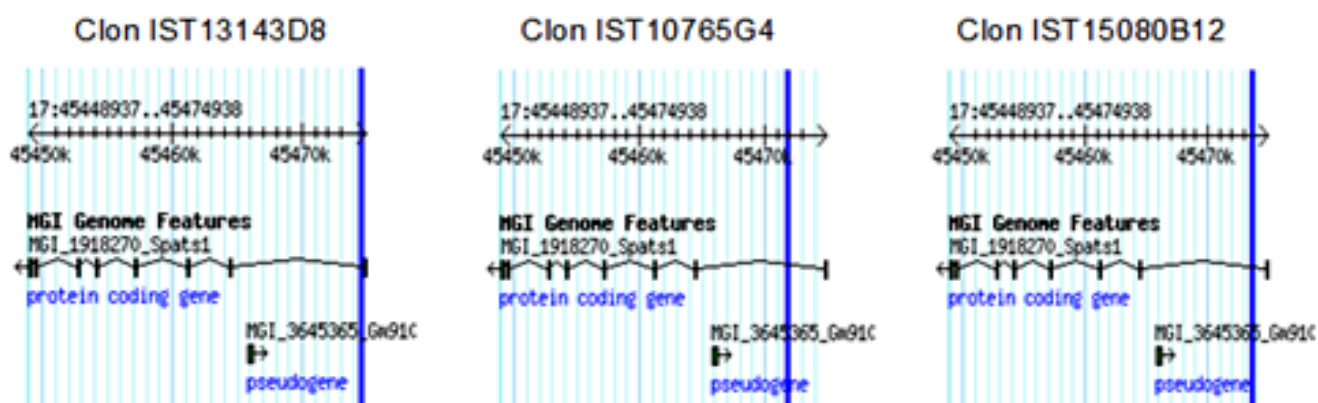


Figura IV.9. Se muestra el sitio donde está interrumpido el gen *Spats1* en cada uno de los tres clones de células ES seleccionados. En cada caso, las líneas negras verticales representan exones mientras que las líneas horizontales entre exones representan intrones. Las rectas verticales azules indican la zona donde se insertó el casete de trampa génica en cada caso. En los 3 clones el *gene trap* se insertó en el intrón 1 (entre el exón 1 y el 2). Tómese en cuenta que *Spats1* en el ratón estaría codificado a partir de la hebra complementaria a la secuenciada, por lo cual el extremo 5' del gen aparece a la derecha y el 3' a la izquierda (ver punta de flecha, indicando la dirección de la transcripción).

En particular, empleando el clon IST13143D8, a partir de 24 sesiones de microinyección y 1130 embriones microinyectados, se obtuvieron tres quimeras. Si bien el porcentaje de transgénesis fue bajo (0,3%), las tres quimeras mostraron >50% de quimerismo cada una, lo que se puede apreciar fácilmente en el grado de aparición de células oscuras en el ratón blanco mostrado en la Figura IV.10.

Se efectuaron cruzamientos hasta obtener al menos 100 crías de cada una de las tres quimeras, pero todas las crías resultaron de color blanco, es decir, que ninguna tuvo descendencia portando la mutación. Este hecho no es inusual, y puede estar relacionado con la cepa de ratones en que se han generado los *gene traps*, dado que se ha reportado que en esta cepa en el mejor de los casos sólo aproximadamente un 30% de las mutaciones son transmitidas a la línea germinal, como se discutirá más adelante (ver Discusión).



Figura IV.10. Imagen de uno de los tres ratones quiméricos para el gen *Spats1* obtenidos por el método de *Genetrap*, donde se observa el alto grado de quimerismo.

En la tabla IV.4 se consignan el número de sesiones de microinyección realizadas, tasa de supervivencia, número de pupas modificadas, porcentaje de pupas mutantes sobre el total de embriones microinyectados, y número de madres dadoras y receptoras.

Tabla IV.4. Datos de microinyección de células ES y resultados obtenidos.

Técnica	Microinyecciones				Nº de animales usados		
	Nº sesiones	% supervivencia de embriones microinyectados	Ratones modificados obtenidos	% Transgénesis total	Donantes Hembra	Madres receptoras	Transmisión a la línea germinal
ES Cell: Genetrap	24	87.6 (990/1130)	3	0.3 (3/1130)	280	60	0%

2.C. Utilización de la tecnología CRISPR/Cas9

Debido a que no se obtuvieron descendientes nulos *Spats1* de los ratones quiméricos generados mediante la microinyección de células madre embrionarias, se decidió ensayar la metodología de CRISPR/Cas9, cuya aplicación en ese momento había sido recientemente publicada, y de la que aún no existían antecedentes de su uso para la generación de ratones KO en el Uruguay.

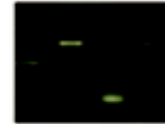
Para ello, se diseñaron y adquirieron las construcciones moleculares para la modificación genética de los embriones de ratón, según se describe en Materiales y Métodos. Brevemente, el esquema de trabajo realizado se representa en la Figura IV.11.

Procedimiento seguido en la generación del KO

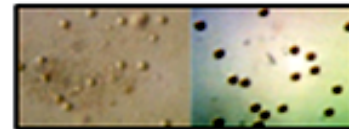
1. Diseño de ARNg CRISPR.



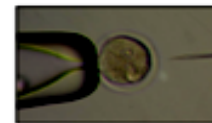
2. Síntesis de ARNg. Testeo *in vitro*



3. Aislamiento de embriones de ratón de una célula.



4. Microinyección de embriones con componentes ARNg- CRISPR/Cas9 en embriones.



5. Transferencia de embriones a hembras pseudopreñadas receptoras.



NHEJ

F0



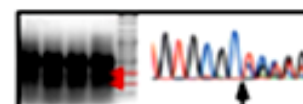
6. Genotipificación de la descendencia.



7. Cruzamientos



8. Genotipificación de la descendencia



9. Cruzamientos a homocigosis



10. Genotipificación de la descendencia

Figura IV.11. Esquema de trabajo para la obtención de un ratón KO por el método CRISPR/Cas9.

2.C.a. ARN guía

Como se mencionó en la Introducción, el primer paso para la generación de ratones KO mediante el sistema CRISPR/Cas requiere el diseño de una sonda de ARN llamada ARN guía (ARNg).

Las figuras IV.12A y B muestran las secuencias para potenciales ARNg obtenidas mediante análisis con los programas CHOP-CHOP y *Custom gRNA*, respectivamente. Para la selección de la secuencia a utilizar como ARNg de entre dichas listas, se tomaron como criterios:

- que la secuencia candidata a ARNg estuviera lo más cercana posible al inicio de la secuencia codificante de modo de incrementar las posibilidades de que el producto obtenido fuera no funcional, y
- que la secuencia seleccionada tuviera el menor número posible de *off-targets*, es decir, secuencias que debido a complementariedad parcial de bases con el ARNg, pudieran oficiar de potenciales blancos no deseados (Jinek *et al.*, 2012).

Como se observa en la figura IV.12C, en el ratón el gen *Spats1* presenta 8 exones (cada exón anotado con un color diferente sobre la secuencia del ARNm). El exón 1 sólo codifica para cinco aminoácidos, en tanto el exón 2 no presentó secuencias que resultaran buenas candidatas para el diseño del ARNg según el programa *Custom gRNA*.

Por lo tanto, estableciendo un compromiso entre ambos criterios señalados más arriba, se seleccionó el ARNg *Spats1.2* (*Custom gRNA*, ver Figura IV.12B) como secuencia para la construcción del ARNg (TTCGCTGCCTGAAATCCCAA**AGG**, donde en negrita se destaca la secuencia PAM), que dirige la mutación al tercer exón de *Spats1* (ver Figura IV.12C). Esta secuencia está localizada entre las posiciones 45.461.226 y 45.461.204 del cromosoma 17, y no encuentra complementariedad en ninguna otra región del genoma. Además, es la secuencia que tiene el menor número de secuencias similares con tres diferencias nucleotídicas, no encontrándose en el genoma otras secuencias complementarias con menos de tres diferencias (ver Figura IV.12B), por lo que la probabilidad de unión a blancos parecidos en el genoma sería muy baja (Cong *et al.*, 2013).

Una vez obtenido el ARNg, testamos la eficiencia del mismo en cultivo *in vitro* de células NIH 3T3 (fibroblastos de ratón), empleando el método indicado en el *Cleavage Kit* (Invitrogen), según se describe en Materiales y Métodos. Brevemente, el sistema se basa en realizar una PCR del exón afectado, desnaturalizar, re-hibridar las cadenas de ADN y digerir los productos resultantes con una enzima de restricción que reconoce errores de apareamiento. Usualmente se habrá mutado uno solo de los alelos, y aún en caso de haberse mutado ambos, las alteraciones que éstos porten serán seguramente diferentes. Dado que al re-hibridar se producirán heterodúplexes, luego de la digestión esperamos observar dos fragmentos de menor tamaño. Como se aprecia en la Figura IV.13, se detectó una muy buena eficiencia de interrupción del gen, superior al 20% según lo estimado de acuerdo con la información proporcionada por el fabricante del kit.

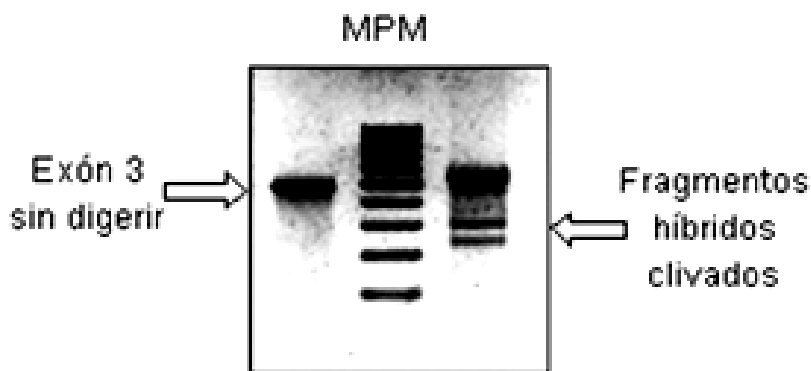


Figura IV.13. Gel de poliacrilamida 12% donde se muestra a la izquierda el producto de PCR del exón 3 de *Spats1*. A la derecha se observa el mismo producto luego de desnaturalizar, re-hibridar las hebras de ADN y digerir los productos resultantes con una enzima de restricción que reconoce *mismatches*, produciendo dos fragmentos de menor tamaño. El carril del medio (MPM) corresponde al marcador de peso molecular, consistente en una escalera de 100pb (Fermentas).

2.C.b. Generación del ratón KO por método CRISPR/Cas9

Una vez confirmada la eficiencia del ARNg, se procedió a realizar las microinyecciones del ARNm codificante para Cas9 y el ARNg en el citoplasma de cigotos de ratones de la cepa B6D2/F2. Esta cepa es una cruce de ratones hembra B6 con machos DBA/2J (D2), y es un contexto genético ampliamente utilizado para la generación de ratones KO (<https://www.jax.org/strain/100006>). Las microinyecciones se realizaron en las instalaciones de la Unidad de Animales Transgénicos y de Experimentación (UATE) del IPMont, según lo descrito en Materiales y Métodos.

En primera instancia, se implantaron 99 cigotos microinyectados en 4 madres pseudo-preñadas. De estos ensayos nacieron 46 crías, las cuales fueron genotipificadas por secuenciación Sanger a partir de la amplificación por PCR del exón 3 del gen *Spats1*, secuenciando las dos hebras del ADN y por duplicado. Los resultados de la genotipificación nos confirmaron la obtención de 16 ratones modificados genéticamente, lo que representa un 16% de eficiencia (ver Tabla IV.5). De esas 16 crías, 9 fueron hembras (individuos 0, 1, 2, 23, 26, 27, 28, 43 y 44), y 7 machos (individuos 9, 32, 37,38, 39, 40, 41,).

Tabla IV.5. Datos de microinyección con la tecnología CRISPR y resultados obtenidos.

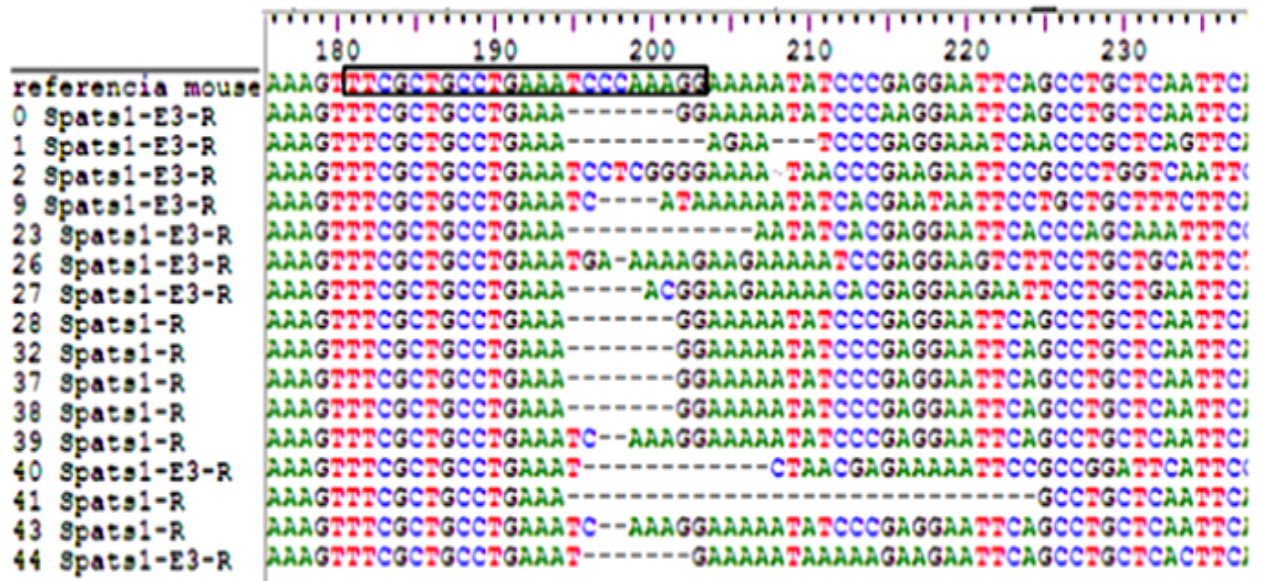
Técnica	Microinyecciones				Nº de animales usados		
	Nº sesiones	% sobrevivida de embriones microinyectados	Ratones modificados obtenidos	% Transgénesis total	Donantes Hembra	Madres receptoras	Transmisión a la línea germinal
CRISPR	1	46 (46/99)	16	16 (16/99)	31	8	100%

De los 16 ratones modificados obtenidos, 12 resultaron ser heterocigotas para la mutación y 4 fueron dobles mutantes con mutaciones diferentes en ambos alelos. Las mutaciones consistieron en inserciones, deleciones, o “indels” (inserciones y deleciones al mismo tiempo; ver Figura IV.14A).

En realidad, el análisis detallado de las secuencias nos mostró que 6 de esos ratones mutantes eran mosaicos (portadores de tres o más genotipos diferentes), donde los genotipos suplementarios pasaban desapercibidos en primera instancia por ser minoritarios (es decir, presentes en un número menor de células). Naturalmente, la secuencia leída habitualmente por los equipos de secuenciación es o la mayoritaria, en caso de mosaicos, o una mezcla de ambos alelos, en caso de heterocigotas (ver ejemplo ilustrativo en la Figura IV.14B), por lo cual cada una de las secuencias obtenidas debió ser analizada manualmente.

Dada la gran variedad de mutaciones que se suele obtener en este tipo de experimentos, es necesario realizar una serie de cruzamientos hasta obtener líneas homocigotas puras, es decir, con la misma mutación en ambos cromosomas. Con este objetivo, se seleccionaron 4 de los animales modificados genéticamente (F0: machos 9, 38 y 41 y hembra 26; ver Figura 4.14A), para continuar con los cruzamientos.

A



B

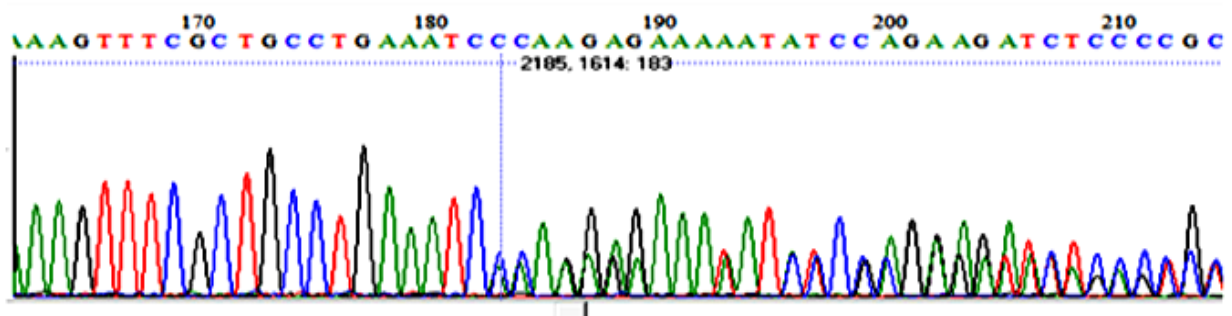


Figura IV.14. A. Se muestra la región del gen *Spats1* afectada por el ARNg en los ratones nacidos de los primeros experimentos de microinyección. En la línea superior se observa la secuencia de referencia (enmarcada se muestra la secuencia del ARNg), y debajo algunos de los mutantes obtenidos, a modo de ejemplo. Como puede apreciarse, la modificación producida por la reparación con errores de las rupturas de doble hebra, es diferente en cada caso. **B.** Cromatograma obtenido de la reacción de secuenciación de la zona afectada en el mutante 9, a modo de ejemplo. Como se observa, a partir del sitio de la mutación (base 183, indicado con línea vertical azul) se observan dos picos que se superponen, evidenciando la existencia de diferencias entre ambos alelos.

Los animales seleccionados se cruzaron con ratones *wild type* (WT) para obtener ratones heterocigotas (F1) para cada mutación, es decir, que cada descendiente de estos cruces portara un alelo normal y en el otro, una única modificación. En la tabla IV.6 se aprecian los resultados de la primera tanda de cruzamientos realizada para obtener animales heterocigotas (+/-) para cada modificación aislada. De estos cruzamientos se obtuvieron 8 genotipos heterocigotas, evidenciando que los 4 ratones mutantes

seleccionados de la F0 eran dobles mutantes, y presentaban mutaciones diferentes en ambas hebras.

Tabla IV.6. Resultado del primer cruzamiento de ratones F0 vs WT, y modificaciones encontradas en el exón 3. En amarillo se señalan las mutaciones que finalmente se seleccionaron para continuar con los experimentos.

Ratón (F0)	Número de crías (F1)	Heterocigotas: Mutación específica exón 3	Efecto resultante
9	4 (2♂, 2♀)	Delección de 7 bases	Corrimiento de marco de lectura
	4 (2♂, 2♀)	Delección de 2 bases	Corrimiento de marco de lectura
26	3 (2♂, 1♀)	2 ins + 1 sustitución	Sin corrimiento de marco de lectura
	2 (1♂, 1♀)	3 sustituciones	Sin corrimiento de marco de lectura
38	2 (1♂, 1♀)	Delección de 2 bases	Corrimiento de marco de lectura
	4 (2♂, 2♀)	Indel de 9 bases	Sin corrimiento de marco de lectura
41	3 (2♂, 1♀)	Delección de 1 base	Corrimiento de marco de lectura
	6 (3♂, 3♀)	Delección de 30 bases	Delección de 10 aminoácidos, sin corrimiento de marco de lectura

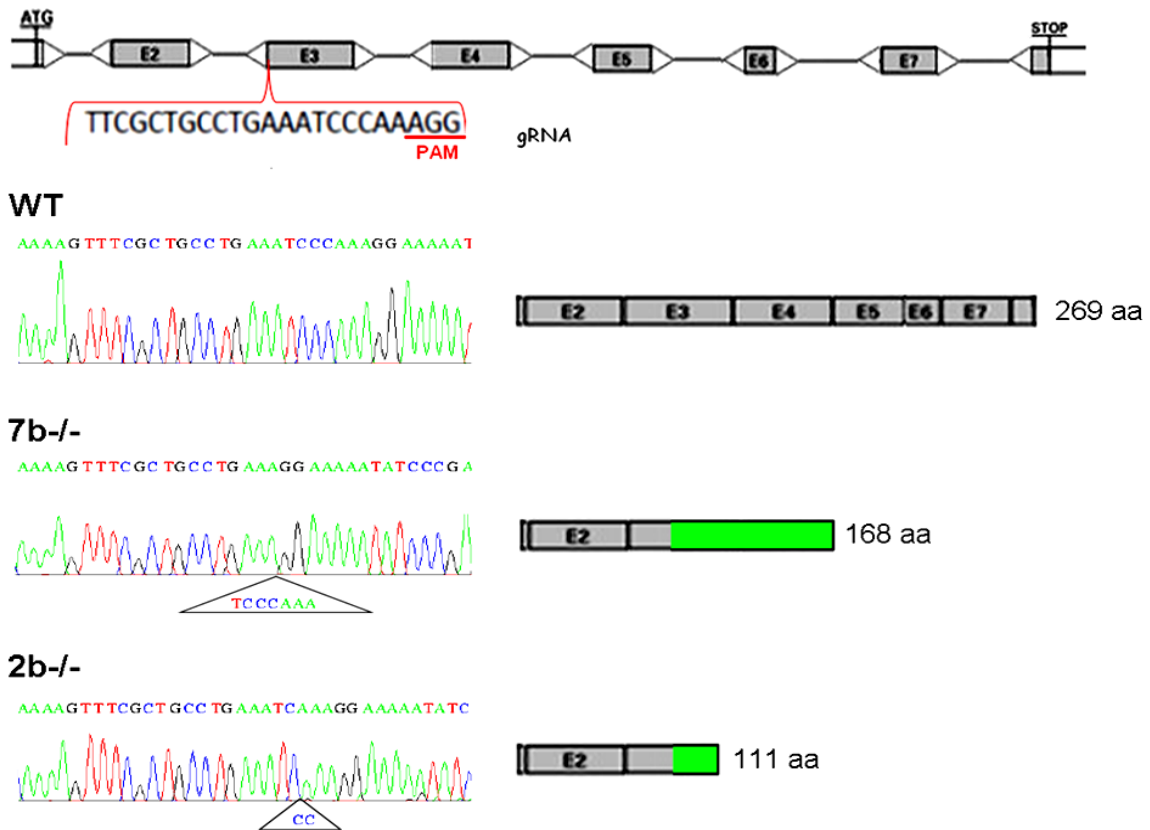
2.C.c. Mutaciones seleccionadas

De la gran cantidad de animales genéticamente modificados obtenidos, con diversos tipos de modificaciones en el exón 3 del gen *Spats1* (deleciones, inserciones, ambas combinadas), decidimos seleccionar algunos de ellos para continuar con los experimentos. En particular, se buscó seleccionar ratones en los que la modificación produjera cambios en el marco de lectura y codones *STOP* prematuros, de modo de asegurarnos que la proteína producto fuera notoriamente diferente de la proteína WT. Finalmente, se seleccionaron dos mutaciones a las que se designó con el nombre de 7b y 2b, por tratarse de deleciones de 7 bases y 2 bases respectivamente (Figura IV.15). Para el caso del clon 2b, el cambio en el marco de lectura se produce a continuación del aminoácido 90, generándose como producto una proteína aberrante de 111 aminoácidos. Para el clon 7b, el cambio de marco de lectura se produce a continuación del aminoácido 89, y el producto obtenido es una proteína aberrante de 168 aminoácidos (Figura IV.16).

Spats1 WT TCGTTCCTCAAAAAGT **TTTCGCTGCCTGAAATCCCAAAGG** AAAAAATATCCCGAGGAATTCAGCCTGCTCAATTCAC
Spats1 2b TCGTTCCTCAAAAAGT **TTTCGCTGCCTGAAATC** --AAAGGAAAAATATCCCGAGGAATTCAGCCTGCTCAATTCAC
Spats1 7b TCGTTCCTCAAAAAGT **TTTCGCTGCCTGAAA** -----GGAAAAATATCCCGAGGAATTCAGCCTGCTCAATTCAC

Figura IV.15. Secuencias de ADN del gen *Spats1* referencia (WT) y de los clones 2b y 7b. El recuadro en la secuencia de referencia muestra la región blanco del ARNg. Se pueden observar las modificaciones encontradas en ambos ratones mutantes.

A



B

SPATS1 WT: 269 aa

HESSKDTQHGDALLESKSLANRTSSRQNKRTSLSSSDGTGPRVTESLGLPRVLTSPSDTAAELGQKTSSSSSSSSSSSA
 QSNRSSKVSLEIPKEKYPEEFLLNSQTE DGQRPEUTFYPRFSSNIHTYHIGKQCFNGVFRGNRRSVAERTVDNS
 LGKKKYDIDPRNGIPKLT PGDNPYMFPEQSKEFFKAGATLPPVNFSLGPYEKKFDTFIPLEPLPKIPNLPFWEKEKA
 NNLKNEIKEVEELDNWQVPHPF LHGFFSTGASNFSRQQ

del 7b: 168 aa

HESSKDTQHGDALLESKSLANRTSSRQNKRTSLSSSDGTGPRVTESLGLPRVLTSPSDTAAELGQKTSSSSSSSSSSSA
 QSNRSSKVSLEIPRKNIPRNSACS IHRQKMGSVLSGHFIQGSAASTPTTLESSASSHGSSGATGGLWQRGQNTTASG
 RRNTILIPEMESP stop

del 2b: 111aa

HESSKDTQHGDALLESKSLANRTSSRQNKRTSLSSSDGTGPRVTESLGLPRVLTSPSDTAAELGQKTSSSSSSSSSSSA
 QSNRSSKVSLEIPR **RKISRGIQPAQFTDRRWAAS** stop

Figura IV.16. Proteína SPATS1 WT y proteínas truncas codificadas por los mutantes 7b y 2b. **A**. En la parte superior se observa la estructura del gen con sus exones (rectángulos grises) e intrones (líneas horizontales rectas), y la zona de complementariedad del ARNg (gRNA). Debajo se muestra la secuencia de la región afectada en ambos mutantes (la región deletada aparece encerrada en un triángulo debajo de cada una de las secuencias), y un esquema de cómo sería la proteína mutante en ambos casos, en comparación con la WT. En

verde se aprecian las regiones aberrantes, causadas por el cambio de marco de lectura. **B.** Se muestra la secuencia de aminoácidos de referencia de SPATS1 de *M. musculus*. En negro y azul alternadamente se indican los exones de la proteína. Debajo se presenta la traducción conceptual de la secuencia de ambos mutantes. Las secciones sombreadas en verde corresponden a las regiones aberrantes.

Se reiteraron los cruzamientos para los fundadores seleccionados (9 y 38) y se genotipificó la descendencia, de modo de incrementar el número de individuos de ambos sexos heterocigotas para las mutaciones 7b y 2b. A continuación se procedió a cruzar los hermanos de cada camada de los ratones 7b por un lado y 2b por otro, para obtener animales homocigotas para cada mutación, es decir, verdaderos dobles mutantes nulos (F2). Los cruzamientos se realizaron en cada caso con harenes de un macho y dos hembras, según lo indicado en la tabla IV.7.

De aquí en adelante, los animales se cruzaron entre hermanos para obtener más animales KO *Spats1*^{-/-} para la realización de los diversos experimentos, así como para el mantenimiento de la progenie. Si bien en los cruzamientos mostrados en la tabla IV.7 el número de individuos por camada fue notoriamente menor para los animales portadores de la mutación 2b, estos resultados no se reprodujeron de manera evidente en los cruzamientos posteriores entre homocigotas nulos, por lo cual no atribuimos un significado a esta diferencia. Además, como se verá más adelante, no observamos diferencias fenotípicas entre los ratones portadores de una u otra mutación.

Tabla IV.7. Cruzamientos realizados para obtención de mutantes nulos *Spats1* 7b y 2b.

Primer cruzamiento:

Cruzamiento (F1)	Número de individuos obtenidos (F2)		
	+/+	+/-	-/- (7b)
1 ♂ 7b +/- x 2 ♀ 7b +/-	6	8	2 (2♂, 0♀)
Cruzamiento (F1)	Número de individuos obtenidos (F2)		
	+/+	+/-	-/- (2b)
1 ♂ 2b +/- x 2 ♀ 2b +/-	3	1	2 (2♂, 0♀)

Segundo cruzamiento:

Cruzamiento (F1)	Número de individuos obtenidos (F2)		
	+/+	+/-	-/- (7b)
1 ♂ 7b +/- x 2 ♀ 7b +/-	7	6	4 (3♂, 1♀)
Cruzamiento (F1)	Número de individuos obtenidos (F2)		
	+/+	+/-	-/- (2b)
1 ♂ 2b +/- x 2 ♀ 2b +/-	1	2	2 (1♂, 1♀)

2.C.d. Evaluación de la presencia de proteína salvaje y ARNm de *Spats1* en los ratones KO

Con el objeto de confirmar que los ratones KO no producían proteína SPATS1 nativa, se realizó un experimento de Western blot en extractos proteicos de testículo de ratones WT y KO de 30 días de edad, utilizando un anticuerpo que reconoce la región central de SPATS1 desde el aminoácido 186 en adelante.

En la figura IV.17 se observa que el anticuerpo anti-SPATS1 no detectó la proteína SPATS1 en ninguno de los dos mutantes seleccionados (7b^{-/-} y 2b^{-/-}), pero sí en extractos de testículo de ratones WT. Si bien no conseguimos un anticuerpo comercial que detectara la proteína completa o la región N-terminal de la misma y por lo tanto no pudimos determinar la presencia o no de las proteínas truncas, sí demostramos que no existe proteína SPATS1 WT en ninguno de los dos mutantes.

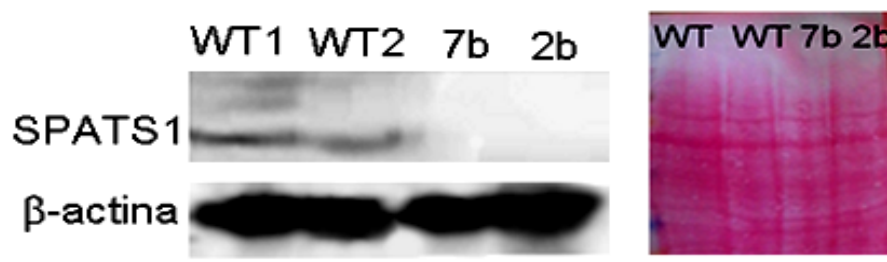


Figura IV.17. Ensayo de Western blot con anticuerpo anti-SPATS1, en extractos de testículo de dos ratones WT de 30 días y dos ratones KO de la misma edad portadores de distintas mutaciones. En la parte inferior se observa un Western blot con anticuerpo anti-β actina como control de carga. En la parte derecha de la figura se aprecia la membrana de transferencia teñida con Rojo Ponceau, que evidencia similar concentración de proteína en los cuatro carriles del gel.

Con respecto a la secuencia de ARNm de los mutantes 7b y 2b, ambos eran potenciales candidatos a degradación por la vía de *Nonsense mediated decay* (NMD) (Figura IV.18). Ésta consiste en un mecanismo de protección de la célula contra la producción de transcritos aberrantes, cuya señal para degradación es la presencia de un codón *STOP* prematuro localizado 50-55 nucleótidos corriente arriba del último sitio de empalme de exones (Hug *et al.*, 2014; Miller y Pearce, 2014). Por lo tanto, habiéndose determinado que ninguno de los dos mutantes producía proteína salvaje, nos propusimos investigar si los transcritos estaban presentes, o si eran degradados por la vía de NMD. Con ese fin, realizamos una cuantificación mediante qRT-PCR para los transcritos *Spats1* a partir de ARN de testículo de ambos mutantes y de ratones WT como control, empleando en cada caso tres réplicas biológicas.

Como genes control para la normalización se utilizaron los genes *Ppp1cc* (*protein phosphatase 1, catalytic subunit, gamma isozyme*; ver Anexos, capítulo VIII.2) y *Tax1bp1* (*human T-cell leukemia virus type I-binding protein 1*), genes de uso doméstico que ya habíamos empleado con éxito como controles para normalización en un trabajo anterior (Da Cruz et al., 2016).

No se observaron diferencias significativas en los niveles de expresión de *Spats1* entre ratones WT y KO (Figura IV.19). Ello indica que el ARNm de ninguno de los dos mutantes sería degradado preferencialmente a niveles detectables en el KO. Podemos por lo tanto concluir que la proteína aberrante posiblemente se produzca en los ratones KO, si bien no es posible sacar conclusiones acerca de la estabilidad de la misma.

del 7b:

```

ATGGAGTCTTCCAAGGATACCCAGCACGGTGTGCTCTAGAATCTAAAAGTTCCTTGGCTAACAGGAGCTCTCTCTGTGAGAACAAAAGGACCAGCC
TCTCTCTCTTCTGACGGAACAGGTCGAGAGTCACTGAGTCCCTAGGCCTTCCAGGGTGTGACTCCTCTGACACCGCTCGGAGCTGGCTCAGAA
GACCTCCTCTCTCTTCGTCTTCCCTCTTCCCTCTCTGCTCAGTCTAATCGTTCCTCAAAAGTTTCGCTGCCGAAA-----GGAAAAATATCCCGAG
GAAATTCAGCCTGCTCAATTCACAGACAGAAGATGGGACGCTCCGAGTGGACATTTATCCAAAGTTTCAGCAGCAACATCCACACTACCCACATTG
GAAAGCAGTCTCTTCAATGGGCTTCCCGGGCAACAGGAGCTTGTCCAGAGAGGACAGTCCACACAGCCTCCGGAAGAAGAAATACCATAT
TGATCCAGAAAAGGAAATCCCAATTCACCAAGGGGATAATCCGACATGTTCCAGAACAGAGTAAAGAGTTCTTCAAAGCGGAGCAACTTTG
CCTCCCGTGAACCTCTACTGGGACCTTACGAGAAAAAATTCAGACATTTATCCACTTGAGCCACTTCCAAAAATCCCAATCTCCCTTCTCGG
AGAAGGAAAAAGCCAACATTTGAAGAACGAGATAAAGAAAGTCCAGGAGCTTGACAACTGGCAGGTCCGATGCCCTTCCATCATGGTTCTCTC
CACTGCTCTCCAACTTTTCAAGACAACAATGA
  
```

del 2b:

```

ATGGAGTCTTCCAAGGATACCCAGCACGGTGTGCTCTAGAATCTAAAAGTTCCTTGGCTAACAGGAGCTCTCTCTGTGAGAACAAAAGGACCAGCC
TCTCTCTCTTCTGACGGAACAGGTCGAGAGTCACTGAGTCCCTAGGCCTTCCAGGGTGTGACTCCTCTGACACCGCTCGGAGCTGGCTCAGAA
GACCTCCTCTCTCTTCGTCTTCCCTCTTCCCTCTCTGCTCAGTCTAATCGTTCCTCAAAAGTTTCGCTGCCGAAAATC--AAAGGAAAAATATCCC
GAGGAATTCAGCCTGCTCAATTCACAGACAGAAGATGGGACGCTCTGAGTGGACATTTATCCAAAGTTTCAGCAGCAACATCCACACTACCCACA
TTGGAAAGCAGTCTCTTCAATGGGCTTCCCGGGCAACAGGAGCTTGTGGCAGAGAGGACAGTGGACAAAGCCTCCGGAAGAAGAAATACCA
TATTCATCCAGAAATGGAAATCCCAATTCACACAGGGGATAATCCGACATGTTCCAGAACAGAGTAAAGAGTTCTTCAAAGCGGAGCAACT
TTGCCCTCCGGTGAACCTCTACTGGGACCTTACGAGAAAAAATTCAGACATTTATCCACTTGAGCCACTTCCAAAAATCCCAATCTCCCTTCT
GGGAGAAAGAAAAGCCAACATTTGAAGAACGAGATAAAGAAAGTCCAGGAGCTTGACAACTGGCAGGTCCGATGCCCTTCCATCATGGTTCTCT
CTCCACTGCTCTCCAACTTTTCAAGACAACAATGA
  
```

Figura IV.18. Secuencia codificante de los mutantes 7b y 2b. En rojo aparece la secuencia del tercer exón, al cual se dirigió la mutación. Señalada con guiones en el exón 3, se identifica en ambos casos la secuencia deletada. En negrita y subrayada se muestra en cada uno de los casos la secuencia del codón *STOP* prematuro generado.

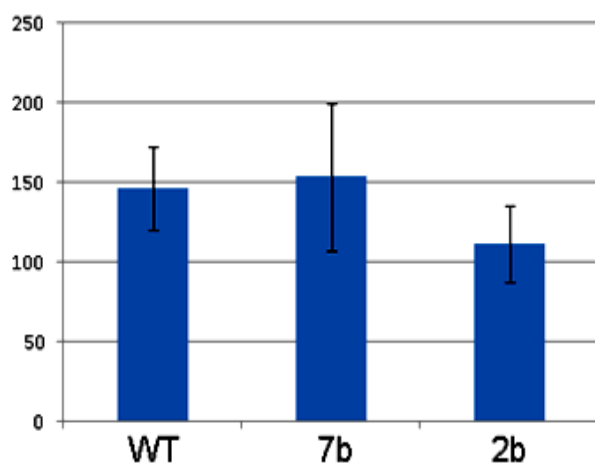


Figura IV.19. Representación de los niveles de expresión de *Spats1* analizados mediante qRT-PCR en experimentos por triplicado, y normalizados con el gen de referencia *Ppp1cc*. Los datos están expresados en unidades arbitrarias, como valores absolutos de expresión normalizados (\pm SD). Las diferencias en los valores de expresión entre el WT y ambos KO no son significativas ($p > 0.05$). Se obtuvo resultado similar empleando *Tax1bp1* como gen de referencia (no mostrado).

3. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LOS RATONES KO *Spats1*

3.A. Análisis de ratones KO adultos jóvenes

Una vez obtenidos los ratones KO se procedió a su caracterización fenotípica, según lo establecido en el objetivo específico 2.3. Para ello se utilizaron ratones adultos jóvenes de aproximadamente dos meses de edad (45 dpp a algo más de dos meses, dependiendo del experimento). En todos los casos, los ratones KO empleados se utilizaron en paralelo con ratones B6 WT de la misma edad exacta y criados en idénticas condiciones, los que fueron empleados como control. Todos los estudios se realizaron por triplicado (tres animales de cada tipo), a menos que esté específicamente indicado.

3.A.a. Observación macroscópica

Una inspección a simple vista de los ratones KO mostró que los mismos no tenían ninguna deformación ni deficiencia aparente (Figura IV.20A). No presentaron tendencia al desarrollo de tumores ni enfermedades observables a simple vista. Se alimentaron y crecieron normalmente. Con respecto a las gónadas, no presentan alteraciones, ni los machos (Figura IV.20B) ni las hembras KO (datos no mostrados). Tampoco se detectaron diferencias significativas en el peso corporal entre los ratones WT, heterocigotas (+/-) y mutantes nulos (-/-) para cualquiera de las dos mutaciones, ni diferencias en el tamaño y peso testicular (Tabla IV.8).

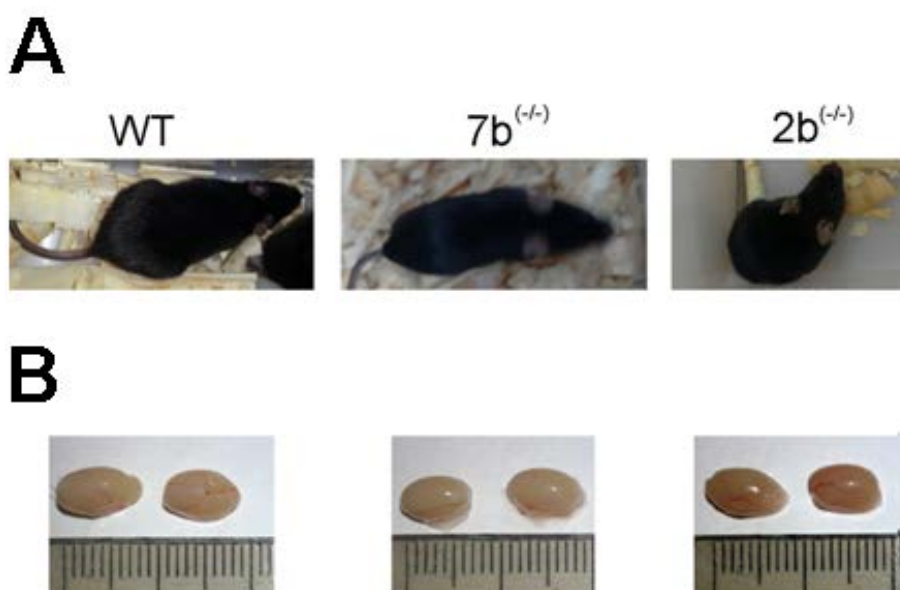


Figura IV.20. Observación macroscópica de los ratones mutantes y su comparación con el fenotipo WT. **A.** Comparación de los ratones WT, 7b^(-/-) y 2b^(-/-). **B.** comparación de los testículos de los mismos ratones.

Tabla IV.8. Comparación del peso de animales WT, mutantes *Spats1* heterocigotas y mutantes homocigotas, y de su tamaño y peso testicular^a.

Genotipo	Peso del animal (gr)	Peso Testicular (gr) ^b	Diámetro testicular (mm)
WT (+/+)	21.5 ± 1.5	0.09 ± 0.01	7.3 ± 0.3
Hetero 7b (+/-)	20.05 ± 0.45	0.09 ± 0.01	7.4 ± 0.4
Hetero 2b (+/-)	22.5 ± 0.5	0.10 ± 0.01	7.5 ± 0.3
Homo 7b (-/-)	22.5 ± 1.5	0.09 ± 0.01	7.4 ± 0.3
Homo 2b (-/-)	21.7 ± 0.5	0.09 ± 0.01	7.8 ± 0.3

^a Los datos corresponden al análisis de tres animales de 45 dpp en cada caso.

^b Corresponde al peso testicular sin la túnica albugínea.

3.A.b. Test de Fertilidad

Para determinar si el gen *Spats1* era esencial para la reproducción efectuamos tests de fertilidad, de modo de evaluar si los ratones nulos eran fértiles, infértiles, o tal vez sub fértiles.

Para este experimento se armaron harenes conteniendo cada uno un macho KO^(-/-) de 2 meses de edad para cada una de las mutaciones, y hembras WT. Recíprocamente, se armaron harenes con hembras KO^(-/-) y machos WT de la misma edad. En paralelo, se armaron harenes con individuos WT de ambos géneros, los que se utilizaron como control. Los harenes se dejaron por aproximadamente 7 días. Tanto los machos como las hembras KO fueron capaces de reproducirse, y produjeron un número de crías similar al de los ratones control (Tabla IV.9), lo que indicaría que el gen *Spats1*, al menos por sí solo, no es imprescindible para la reproducción en ninguno de los dos sexos.

Luego del destete se disecaron tanto las hembras WT como las KO y se contaron los sitios de implantación. El número de sitios de implantación coincidió en todos los casos con el número de crías nacidas (ver tabla IV.9), lo que descarta la ocurrencia de abortos *in utero*.

Finalmente, con el objeto de evaluar si la mutación podría afectar la fertilidad en caso de que tanto el macho como la hembra fueran ambos mutantes, se cruzaron entre sí machos KO^(-/-) con hembras KO^(-/-) para la mutación 2b. También en este caso el tamaño promedio de camada fue similar al observado para los individuos WT, y no se observaron abortos *in utero* (ver tabla IV.9). La proporción de machos y hembras nacidas fue en todos los casos cercana al 50% para cada sexo, mostrando que no existe en el KO tendencia a afectarse selectivamente ninguno de los dos sexos.

Tabla IV.9. Cruzamientos realizados en los tests de fertilidad.

Cruzamiento	Tamaño promedio de camada \pm SD	Sitios de implantación	Sexo de la Descendencia	Número de camadas
♂ WT X ♀ WT	6,66 \pm 1,15%	6,66 \pm 1,15%	♂ 50% ♀ 50%	3
♂2b ^{-/-} X ♀ WT	6,33 \pm 1,53%	6,33 \pm 1,53%	♂ 50% ♀ 50%	3
♂7b ^{-/-} X ♀ WT	6 \pm 0	6 \pm 0	♂ 50% ♀ 50%	3
♀2b ^{-/-} X ♂ WT	6 \pm 0	6 \pm 0	♂ 50% ♀ 50%	2
♀7b ^{-/-} X ♂ WT	6 \pm 0	6 \pm 0	♂ 33% ♀ 66%	2
♂2b ^{-/-} X ♀ 2b ^{-/-}	6 \pm 1	6 \pm 1	♂ 50% ♀ 50%	3

3.A.c. Representatividad de las distintas poblaciones celulares en el testículo

Como se mencionó anteriormente, en el testículo se encuentran una gran variedad de tipos celulares diferentes. Estos distintos tipos celulares poseen diferente contenido de ADN. Las células basales dentro de los túbulos seminíferos (células de Sertoli, de sostén, así como las espermatogonias) tienen un contenido de ADN de 2C, al igual que las células mioideas peritubulares, las presentes en el estroma del tejido testicular (células de Leydig, fibroblastos, linfocitos, etc.), y los espermatozoides II. Las células en profase meiótica I (espermatozoides I) son 4C en contenido de ADN, y las espermatogonias y espermatocitos tienen un contenido C de ADN. Cada población es capaz de incorporar en su ADN diferentes cantidades del fluoróforo yoduro de propidio (IP) en función de la cantidad de ADN que posee. El citómetro de flujo mide la intensidad de señal fluorescente de estas células, y según su cantidad de luz las clasifica y cuantifica. A su vez, los espermatozoides, a pesar de ser C en contenido de ADN al igual que las espermatogonias redondas, se discriminan como un pico sub-haploide por citometría de flujo. Esto refleja la mayor compactación de la cromatina por su unión con protaminas en reemplazo de las histonas, dado que la cromatina más compacta disminuye la cantidad de sitios disponibles para la unión del fluoróforo (Spanò y Evenson, 1993) (Figura IV.21A).

En el presente trabajo se analizaron suspensiones celulares de testículo teñidas con IP de ratones de 45 días de edad WT, heterocigotas (+/-) y homocigotas (-/-) para ambas mutaciones por citometría de flujo, de modo de obtener datos cuantitativos acerca de cada una de las poblaciones testiculares. El objetivo era averiguar si a pesar de que los ratones eran fértiles lo que indicaba la existencia de espermatogénesis completa y, por ende, de

espermatozoides , alguna de las poblaciones celulares se hallaba numéricamente disminuida en los ratones KO (por ejemplo, que hubiera un menor número de espermátidas o espermatozoides) con respecto a los WT. Estos experimentos se realizaron por triplicado (tres individuos por experimento) en todos los casos.

No se observaron diferencias evidentes en los perfiles citométricos de las suspensiones testiculares de los ratones KO en relación con los WT (Figura IV.21B y C). Destacamos que si bien no es posible discriminar los espermatozoides de los detritos celulares en estos gráficos, todas las muestras fueron procesadas del mismo modo y las suspensiones celulares se prepararon de modo idéntico y siguiendo un protocolo altamente reproducible (ver Materiales y Métodos). En consecuencia, no existe razón para sospechar que la proporción de detritos pudiera haber sido significativamente mayor en una preparación que en otra, y por lo tanto no debería afectar el resultado.

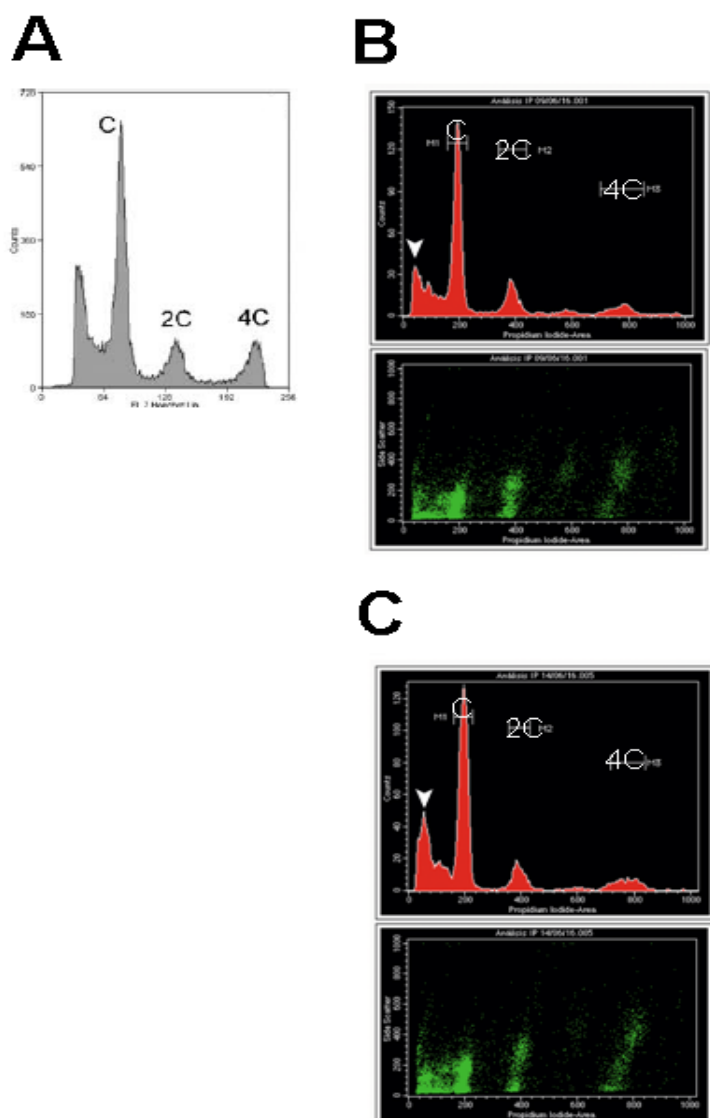


Figura IV.21. Análisis de la representación de poblaciones con distinto contenido de ADN en los testículos de los ratones KO *Spats1* y WT mediante citometría de flujo. **A.** Histograma mostrando el perfil esperado en los análisis citométricos de suspensiones celulares de testículo normal de ratón adulto. Fuente: [Rodríguez Casuriaga et al., 2009](#). **B, C.** Ejemplos representativos de histograma y diagrama de puntos de experimentos de análisis según contenido de ADN por citometría de flujo con tinción con IP, de las suspensiones celulares de testículo de los ratones WT (B) y KO^(-/-) (C). Se indican en cada histograma las poblaciones con contenido de ADN 4C, 2C y C. Las puntas de flecha señalan la población sub-haploide.

A su vez, los análisis cuantitativos no arrojaron diferencias significativas en las proporciones relativas de ninguna de las poblaciones celulares de los ratones KO con respecto a los ratones WT (Tabla IV.10 y Figura IV.22).

Tabla IV.10. Resultados de la cuantificación de poblaciones celulares de acuerdo al contenido de ADN por citometría de flujo, para suspensiones celulares de testículo de ratón teñidas con IP. Se analizaron individuos WT, heterocigotas y homocigotas nulos para las mutaciones 7b y 2b. Se muestran los promedios de tres réplicas para cada población (\pm SD).

Genotipo	C*	2C*	4C*
WT +/+	43.9 \pm 3.9	11.1 \pm 2.1	6.47 \pm 0.4
Hetero 7b +/-	42.7 \pm 0.5	11.3 \pm 0.5	6.52 \pm 1.0
Hetero 2b +/-	38.9 \pm 0.1	11.3 \pm 2.1	6.08 \pm 1.2
Homo7b -/-	43.5 \pm 3.1	9.3 \pm 1.0	8.4 \pm 1.6
Homo 2b -/-	41.4 \pm 0.4	8.5 \pm 1.9	6.6 \pm 0.9

*Nótese que no se incluye en la tabla el pico sub-haploide (además de agregados celulares, etc.), por lo cual los porcentajes no suman 100%.

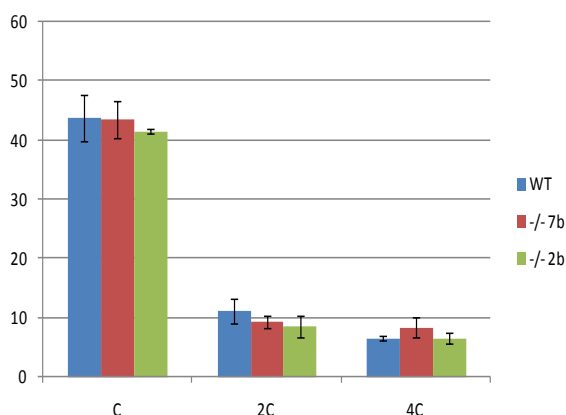


Figura IV.22. Representación gráfica de los datos presentados en la tabla IV.10 para los ratones WT y KO 7b y 2b respectivamente (\pm SD).

3.A.d. Motilidad espermática

Más allá de la presencia de espermatozoides, evidenciada en los gráficos citométricos y en el hecho de que los ratones mutantes no tenían afectada la fertilidad, nos planteamos la posibilidad de que la mutación de *Spats1* en el ratón pudiera afectar la calidad de los espermatozoides produciendo una mayor proporción de espermatozoides anómalos, aunque el efecto no fuera suficiente como para alterar la fertilidad.

Con el objeto de chequear esta hipótesis, se hicieron estudios de motilidad espermática utilizando el *software* CASA (*computer assisted sperm analysis*; Amann *et al.*, 2014), partiendo de ratones KO de 50 días de edad, y de ratones WT de la misma edad como

control, y haciendo todos los estudios por triplicado (3 animales en cada caso). Dado que hasta este punto los ratones KO portadores de ambas mutaciones se habían comportado de idéntico modo (así como también en los análisis histológicos, como se verá más adelante), para estos estudios se empleó únicamente el mutante 2b. Los experimentos se realizaron empleando espermatozoides extraídos de colas de epidídimo, las que fueron procesadas según lo indicado en Materiales y Métodos.

En la tabla IV.11 se muestran los valores promedio (valores absolutos y porcentaje) de espermatozoides progresivos rápidos, progresivos lentos, no progresivos, e inmóviles, según la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS). Se consignan además las concentraciones, tanto en millones/ml como en la suspensión total.

La OMS da como valores de referencia para muestras normales de semen humano la existencia de al menos un 40% de espermatozoides mótils (motilidad progresiva + motilidad no progresiva), o al menos un 32% de espermatozoides con motilidad progresiva (NICE, 2013). Aunque no hemos logrado encontrar que existan valores de referencia para semen de ratón, y si bien la variabilidad individual tanto dentro de los ratones WT como de los KO es grande y no permite obtener conclusiones precisas, resulta obvio que los ratones KO no presentaron diferencias importantes ni en la motilidad de los espermatozoides ni en su concentración, con respecto a los WT (ver tabla IV.11).

Tabla IV.11. Resultados del análisis de motilidad espermática (CASA) en ratones WT y KO de 50 dpp, para espermatozoides sin capacitar.

WT – clasificación		Total	Porcentaje	CONCENTRACIÓN	
según la O.M.S				(%)	millones por ml
Progresivo rápido	(tipo a)	210 ± 40	20,1 ± 3,7	5,8 ± 4,2	29,0 ± 21,4
Progresivo lento	(tipo b)	382 ± 46	36,6 ± 4,1	10,9 ± 8,9	54,8 ± 44,3
No progresivo	(tipo c)	160 ± 54	15,3 ± 5,4	5,6 ± 6,2	28,0 ± 31,2
Inmóvil	(tipo d)	293 ± 79	28 ± 7,9	8,6 ± 7,9	42,8 ± 39,7
KO 2b – clasificación		Total	Porcentaje	CONCENTRACIÓN	
según la O.M.S				(%)	millones por ml
Progresivo rápido	(tipo a)	214 ± 140	19,4 ± 11,0	5,7 ± 5,7	28,7 ± 28,6
Progresivo lento	(tipo b)	385 ± 112	35,6 ± 7,6	9,5 ± 6,1	47,6 ± 30,6
No progresivo	(tipo c)	171 ± 31	16,2 ± 3,8	4,0 ± 1,5	20,2 ± 7,6
Inmóvil	(tipo d)	300 ± 140	28,9 ± 15,0	6,4 ± 2,3	31,9 ± 11,5

3.A.e. Análisis de defectos de capacitación

Luego de la eyaculación, los espermatozoides no poseen aún capacidad fecundante. Esta se adquiere durante su trayecto por el tracto genital femenino, en que sufren una serie de cambios que se conocen colectivamente como capacitación. La capacitación consiste básicamente en cambios en el patrón de movimiento (hiperactivación), cambios en la fluidez de la membrana plasmática, y adquisición de la capacidad de iniciar la reacción acrosómica, procesos necesarios para la fecundación (Suarez, 2008).

En particular, en relación a la hiperactivación, luego de la eyaculación el patrón de movimiento de los espermatozoides se caracteriza por trayectorias rectilíneas asociadas a ondas flagelares de alta frecuencia, baja amplitud y simétricas (Mortimer, 1997), que le brindan la propulsión necesaria para atravesar el mucus cervical.

Tabla IV.12. Resultados del análisis de motilidad espermática (CASA) en ratones WT y KO de 50 dpp, para espermatozoides capacitados *in vitro*.

WT – clasificación según la O.M.S		Total	Porcentaje (%)	CONCENTRACIÓN	
				millones por ml	en suspensión total
Progresivo rápido	(tipo a)	79 ± 28	7,7 ± 2,6	1,7 ± 1,1	8,6 ± 5,3
Progresivo lento	(tipo b)	273 ± 103	26,6 ± 9,7	5,9 ± 3,8	29,6 ± 18,9
No progresivo	(tipo c)	224 ± 18	21,9 ± 1,1	4,7 ± 2,2	23,6 ± 10,8
Inmóvil	(tipo d)	446 ± 130	43,8 ± 13,2	8,9 ± 4,3	44,6 ± 21,6
KO 2b - clasificación según la O.M.S		Total	Porcentaje (%)	CONCENTRACIÓN	
				millones por ml	en suspensión total
Progresivo rápido	(tipo a)	94 ± 66	9,1 ± 6,1	2,2 ± 2,1	10,8 ± 10,7
Progresivo lento	(tipo b)	225 ± 78	21,8 ± 8,0	4,5 ± 4,1	22,7 ± 20,7
No progresivo	(tipo c)	222 ± 52	21,4 ± 15,2	4,3 ± 3,2	21,3 ± 16,2
Inmóvil	(tipo d)	494 ± 192	47,7 ± 19,3	7,2 ± 3,0	36,1 ± 15,9

A medida que los espermatozoides ascienden por el tracto femenino, durante la capacitación, el movimiento deja de ser rectilíneo para transformarse en un movimiento oscilante provocado por fuertes impulsos de la cabeza hacia la derecha e izquierda (Stival *et al.*, 2016).

Como forma de analizar la posible existencia de diferencias en la habilidad para alcanzar la capacitación entre los ratones WT y KO, se tomó como indicio la hiperactivación. Con ese fin, en tanto la cola de uno de los epidídimos de cada uno de los ratones estudiados

se analizó según lo indicado en el punto anterior, la cola del otro epidídimo se sometió a un proceso de capacitación *in vitro* (ver Materiales y Métodos, punto 4D). A continuación se evaluaron los mismos parámetros que anteriormente, pero para espermatozoides capacitados *in vitro*. Nuevamente, más allá de las diferencias individuales, no se observaron diferencias importantes ni en los porcentajes de espermatozoides de cada tipo en relación a su motilidad, ni en la concentración de los mismos (Tabla IV.12).

3.A.f. Morfología espermática

Como modo de continuar investigando la hipótesis de que la mutación de *Spats1* pudiera producir una mayor proporción de espermatozoides anómalos, nos propusimos estudiar la morfología de las cabezas espermáticas de ratones WT y KO, y continuando para estos estudios con los ratones KO portadores de la mutación 2b.

Con este objetivo, espermatozoides fijados extraídos de cola de epidídimo fueron extendidos sobre portaobjetos, se dejaron secar al aire, y se evaluó la morfología mediante microscopía de contraste diferencial interferencial (DIC), de acuerdo con la categorización establecida en Materiales y Métodos (Figura 4.23A y B).

Para estos experimentos se emplearon 6 ratones de cada tipo (6 WT y 6 KO), y se analizaron como mínimo 200 espermatozoides por individuo.

Si bien se encontró una proporción ligeramente mayor de espermatozoides con morfología anómala en los ratones KO (Figura 4.23C), esta diferencia no fue significativa ($p > 0,05$). Por otra parte, con respecto a la representatividad de los distintos tipos de anomalías, lo más llamativo es que en tanto en los ratones WT la mayor parte de las anomalías fue por cuenta de los espermatozoides con “cabeza de hacha”, la incidencia ligeramente mayor de anomalías en los espermatozoides KO se explicaría por un aumento moderado de otro tipo de defectos, como la ausencia de gancho, entre otros (Figura 4.23D).

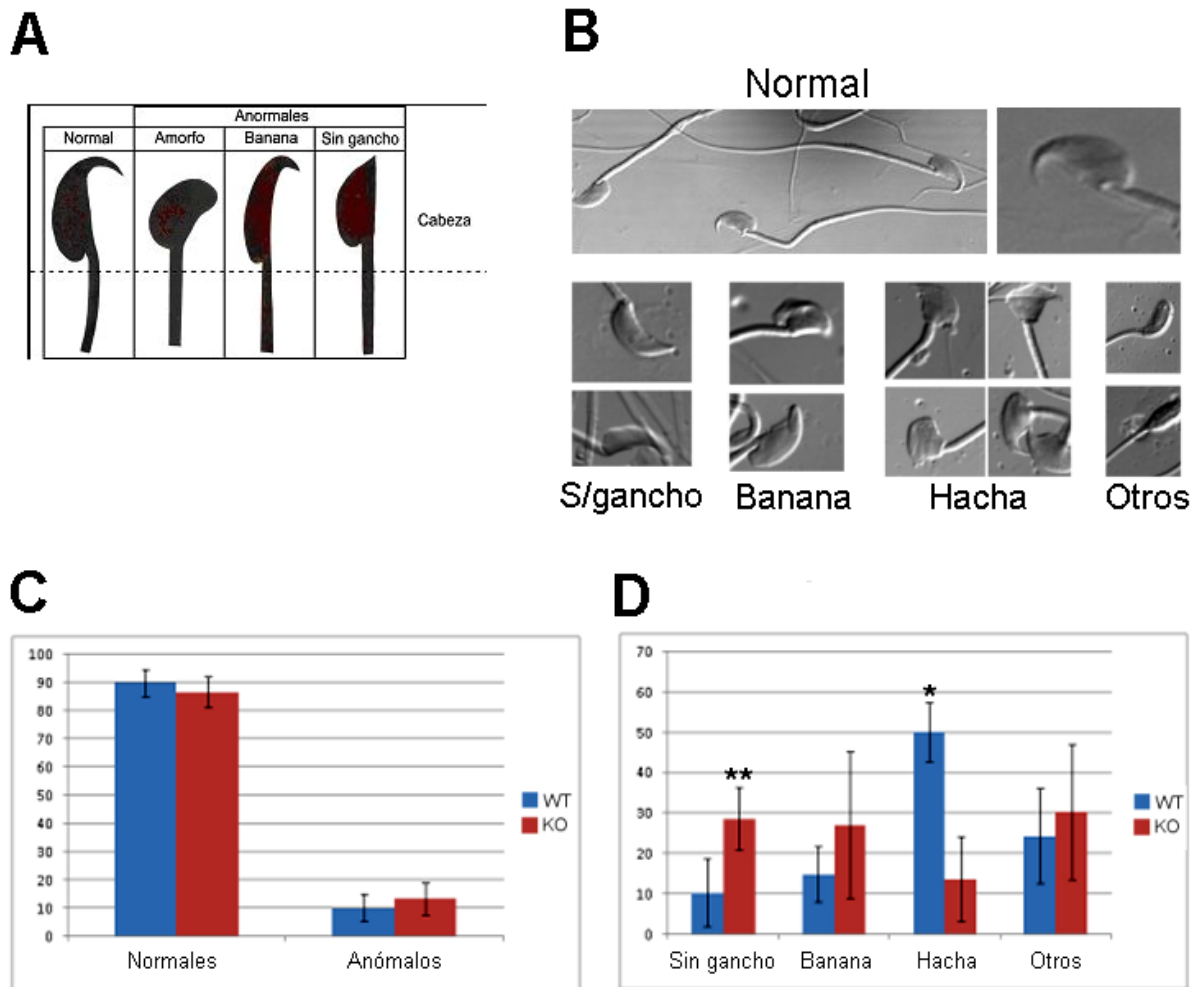


Figura IV.23. A. Esquema de las formas de cabezas espermáticas encontradas en el epidídimo de ratón (Fuente: Domínguez *et al.*, 2009). **B.** Imágenes mostrando diferentes morfologías de cabeza de espermatozoides obtenidas a partir de nuestras preparaciones de cola de epidídimo de ratones WT y KO, y observadas mediante DIC. **C.** Gráficos de barras de resultados del conteo de espermatozoides normales y anómalos a partir de ratones WT (n=6) vs KO *Spats1* (n=6) de 50dpp (% \pm SD). **D.** Gráficos de barras de resultados del conteo de diferentes tipos de anomalías de cabeza de espermatozoides a partir de ratones WT (n=6) vs KO *Spats1* (n=6) de 50dpp, considerando la población de espermatozoides anómalos como 100% (% \pm SD). * = $p < 5 \times 10^{-5}$; ** = $p < 0,01$.

3.A.g. Análisis histológico

A continuación se procedió a realizar estudios de microscopía en cortes histológicos, para lo cual se utilizaron testículos de ratones adultos de 55-60 días de edad KO^(-/-) y WT (como control), incluidos en resina epóxica y teñidos con azul de toluidina.

Como era esperable, en los cortes de testículos de ratones WT se observan túbulos seminíferos con una amplia luz en el medio (Figura IV.24). Muy raramente se observa algún túbulo con la luz obstruida (ver Figura IV.24, imagen inferior derecha).

En los cortes a mayor aumento se aprecia que los túbulos seminíferos contienen todos los estadios espermatogénicos, observándose gran cantidad de espermatozoides liberados a la luz de los túbulos (Figura IV.25).

Cuando analizamos los cortes histológicos de los testículos mutantes, observamos una obstrucción en la luz de la mayor parte de los túbulos seminíferos, los que se encontraban desde parcialmente hasta completamente obstruidos (Figura IV.26). Más allá de la obstrucción central, la pared en la mayoría de los túbulos seminíferos presentaba una apariencia normal; sin embargo, algunos túbulos presentaban evidentes desgarramientos en parte de la pared (ver Figura IV.26). Los estudios se efectuaron en paralelo para la mutación 7b y 2b pero no se detectó ninguna diferencia evidente entre los ratones correspondientes a ambas mutaciones, por lo cual no se muestran separadamente los resultados para cada mutación. Los conteos de túbulos abiertos vs obstruidos (ya sea total o parcialmente) indicaron que, en tanto los testículos de los ratones WT presentaban, en promedio, un 88,8% de los túbulos seminíferos con su luz desobstruida, los ratones KO presentaban obstrucciones en la luz en un 88,9% de sus túbulos (Tabla IV.13).

Tabla IV.13. Conteo de túbulos seminíferos con su luz abierta y obstruida (obstrucción parcial o total) en ratones WT y KO de 55 dpp.

Genotipo	Túbulos abiertos (%)	Túbulos obstruidos (%)
WT1	88,9	11,1
WT2	87,5	12,5
WT3	90	10
KO1	11,1	88,9
KO2	22,2	77,8
KO3	0	100

En los cortes de testículo de los animales KO observados a mayor aumento se observaron todos los tipos celulares incluyendo espermatozoides (lo cual era esperable, dados los resultados reportados más arriba) (Figura IV.27). Los diferentes túbulos presentaron distinto grado de obstrucción, desde túbulos conteniendo algunos acúmulos de células en el interior de la luz, hasta otros con la luz obstruida por completo (Figura IV.27, a-e). Sin embargo, aún en aquellos túbulos que presentaron un importante grado de obstrucción, la presencia de espermatozoides fue evidente (ver Figura IV.27, d y f).

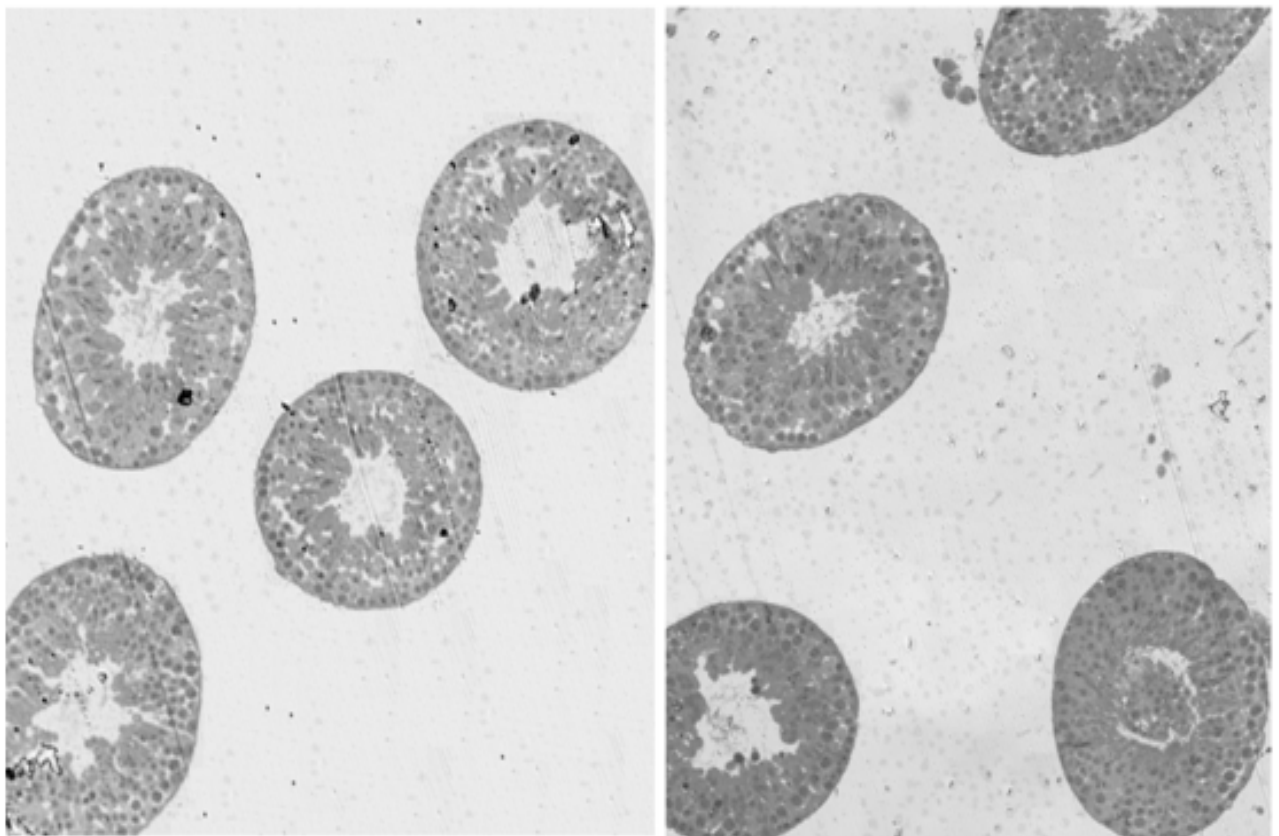
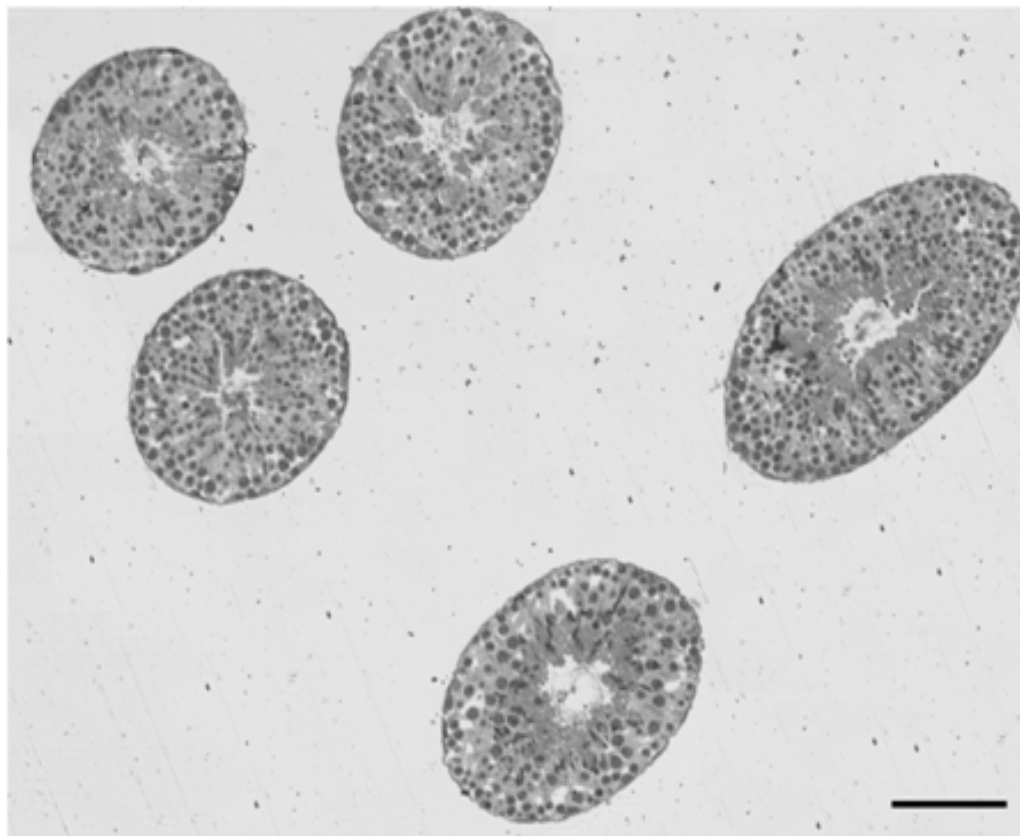


Figura IV.24. Cortes transversales de túbulos seminíferos de testículos de ratones WT de 55 días incluidos en Epon y teñidos con azul de toluidina. Barra: 100 μ m.

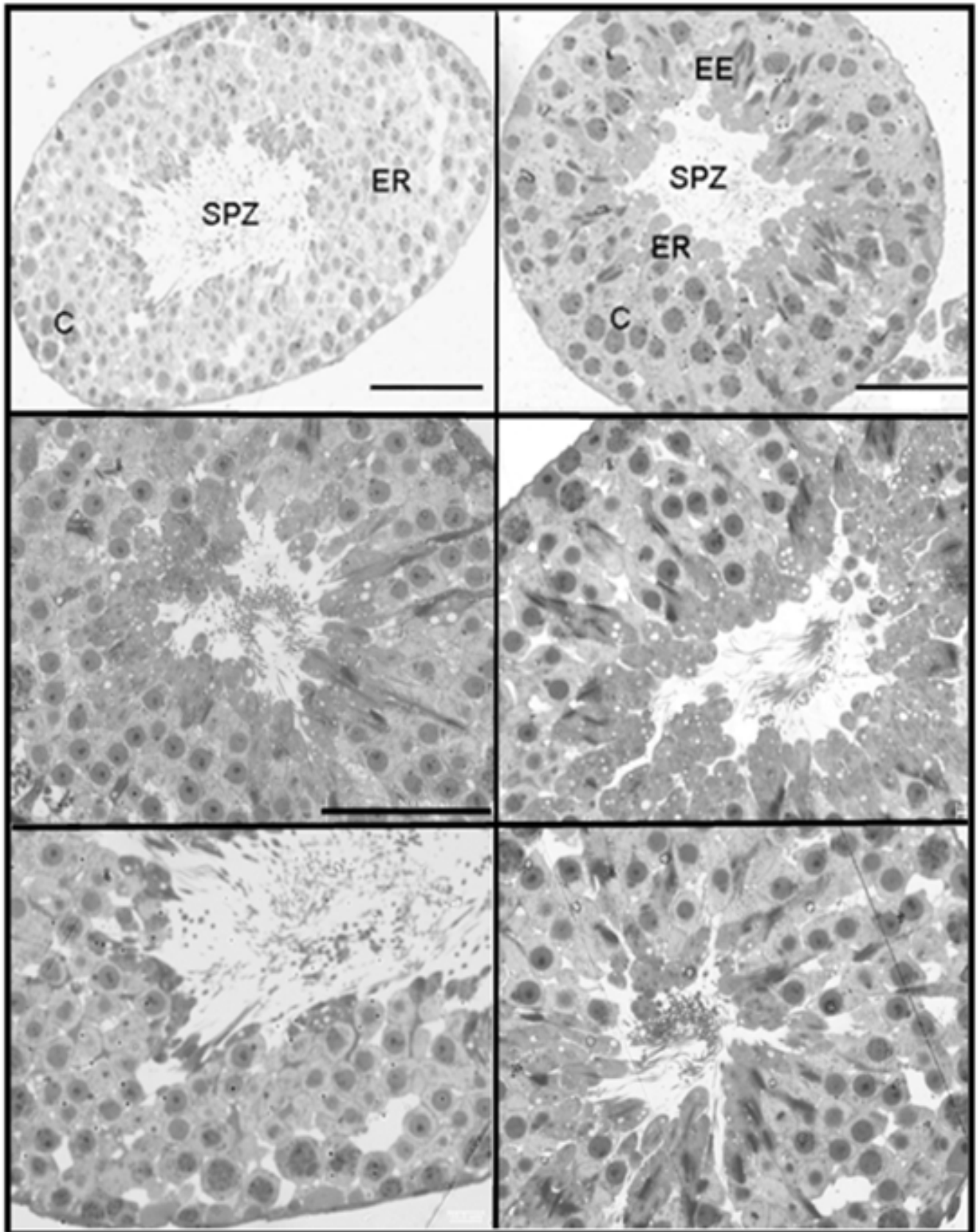


Figura IV.25. Se muestran, a mayor aumento, cortes transversales de túbulos seminíferos de testículos de ratones WT de 55 días incluidos en Epon y teñidos con azul de toluidina. Obsérvese que en la luz de los túbulos predominan los espermatozoides. C: espermaticitos; ER: espermátidas redondas; EE: espermátidas elongadas; SPZ: espermatozoides. Las barras corresponden a 50 μ m.

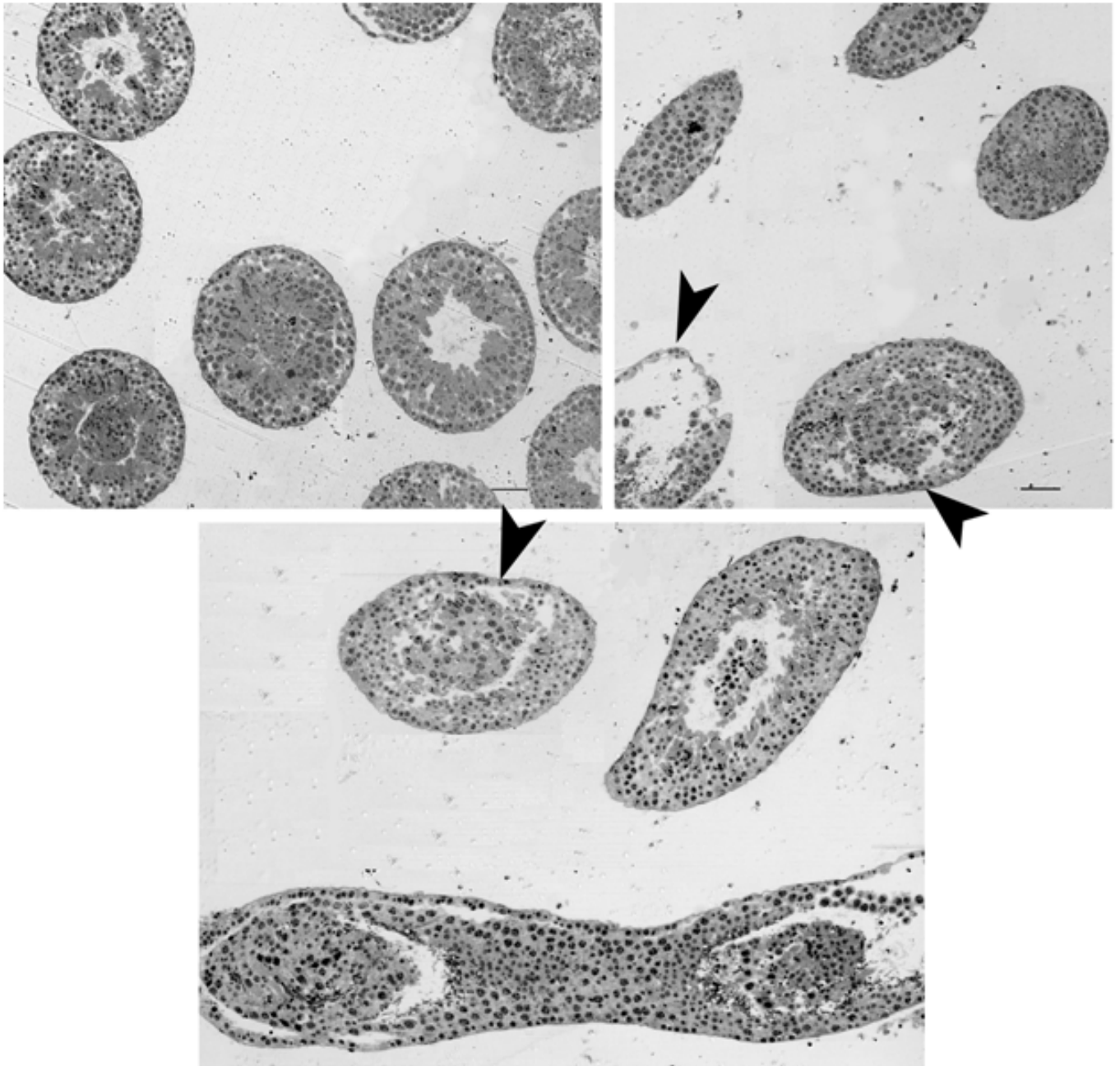


Figura IV.26. Cortes histológicos de bloques de testículos de ratones KO de 55 días, incluidos en Epon y teñidos con azul de toluidina. Obsérvese la presencia de acúmulos de células en la luz de los túbulos. En la imagen inferior se observa un corte semilongitudinal, en el que se aprecia que la obstrucción de la luz tendría lugar todo a lo largo del túbulo. Las puntas de flecha señalan túbulos seminíferos con evidentes desgarramientos en su pared. Barras: 100 μ m.

Con respecto a las células que se encontraron invadiendo la luz del túbulo, las mismas fueron desde células anucleadas (Figura IV.27, a), hasta células inmaduras en distintas etapas de la espermatogénesis, con aspecto normal. En particular, se observaron espermátidas redondas y elongadas (Figura IV.27, b-e), e incluso espermátocitos primarios en distintas etapas de la profase meiótica (Figura IV.27, e-g). Por otra parte, algunos túbulos, en que no se evidenció una obstrucción en su luz, mostraron un elevado número de células con núcleos degenerados, con evidente aspecto de células apoptóticas (Figura IV.27, h).

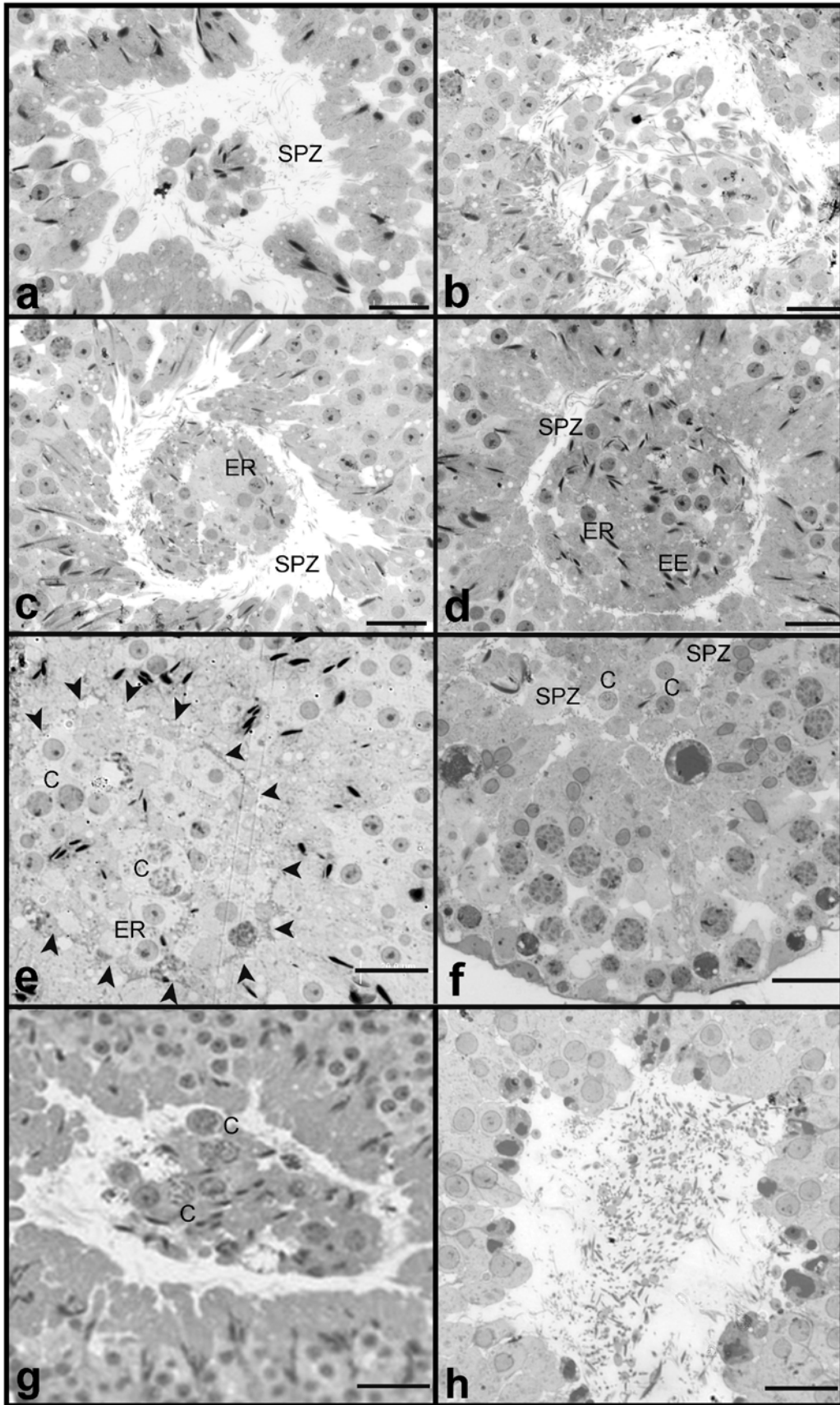


Figura IV.27. Cortes histológicos de bloques de testículos de ratones $KO^{(-/-)}$ de 55 días incluidos en Epon y teñidos con azul de toluidina. Obsérvese que la luz de los túbulos está obstruida con células en diferentes etapas de la espermatogénesis. C: espermatocitos; ER: espermátidas redondas; EE: espermátidas elongadas; SPZ: espermatozoides. Las puntas de flecha en el cuadro “e” delimitan el “tapón” de células obstruyendo la luz. Barras: 20 μ m.

3.B. Análisis de ratones KO envejecidos

No es infrecuente que los defectos en los ratones mutantes para proteínas vinculadas al testículo se manifiesten o se acentúen a medida que el individuo envejece. A modo de ejemplo, en un trabajo reportado por [Kumar et al., \(2016\)](#), la activación constitutiva de la β -catenina (como hemos visto, uno de los actores principales de la vía Wnt) específicamente en células de línea germinal masculina, no produjo defectos evidentes en ratones jóvenes. Sin embargo, a medida que los ratones envejecieron se observó un aumento progresivo de defectos en la espermatogénesis, con pérdida de células germinales y dificultades para el ingreso en meiosis, de modo que a las 75 semanas de edad más del 40% de los túbulos seminíferos carecía de células germinales maduras.

Con el objeto de evaluar si el fenotipo producido por la deficiencia de SPATS1 podría hacerse más extremo con el aumento de edad, tomamos dos ratones macho WT y dos KO (mutación 7b), los que se dejó llegar hasta el año de edad. Luego de transcurridos los 12 meses, se analizó el fenotipo de los ratones KO, en comparación con el de los individuos WT de la misma edad.

3.B.a. Observación macroscópica

Los ratones WT al año de edad no presentaron ninguna alteración morfológica evidente (Figura IV.28A), así como tampoco uno de los ratones KO (KO1). El otro ratón KO (KO2), sin embargo, desarrolló un tumor comprendiendo la zona del escroto y el perineo. Dicho tumor presentó ulceraciones, y se acompañó de alopecia en toda la región circundante al tumor (Figura 4.28B, a-d). El animal no presentó alteraciones en otras partes de su cuerpo, que mostraron aspecto normal (Figura IV.28B, e). Luego de la disección del animal, se observaron cuidadosamente los distintos órganos (incluyendo los contenidos dentro de la caja craneana), pero no se observaron tumores ni anomalías evidentes en ningún otro órgano además del tumor escrotal/perineal mencionado. Incluso ambos testículos presentaron aspecto aparentemente normal (Figura IV.28b, f).

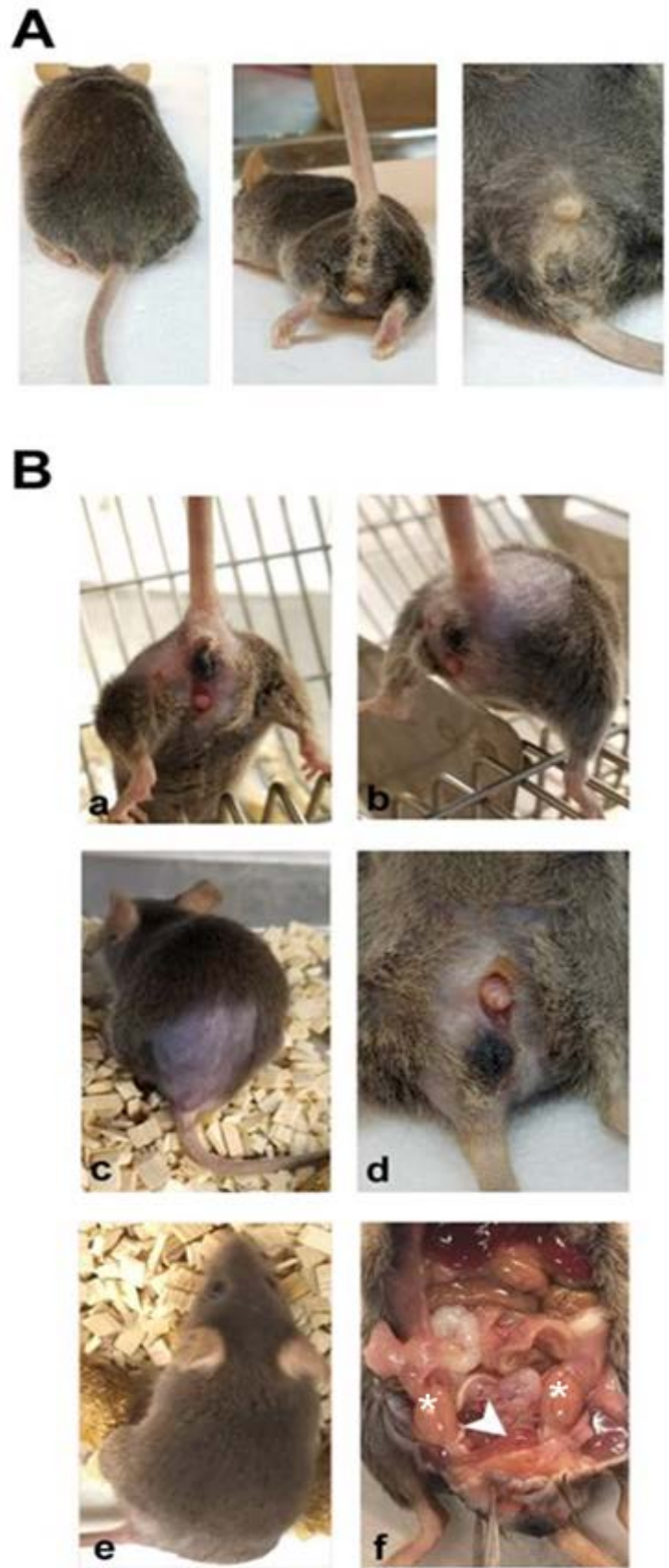
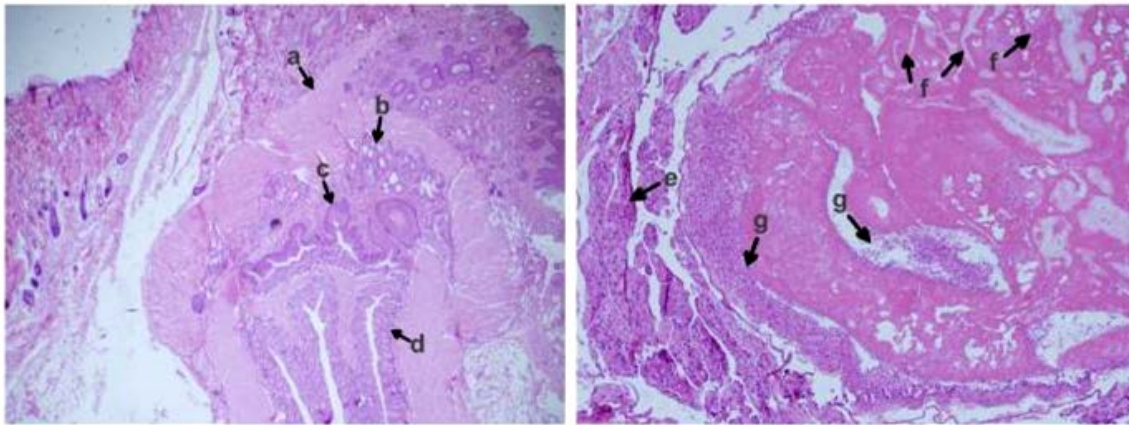


Figura IV.28. Caracterización morfológica de ratones macho WT y KO *Spats1* de 1 año de edad. **A.** Aspecto de los ratones WT. En las imágenes de la derecha se muestra detalle de su área genital. **B.** Aspecto del ratón KO2, que desarrolló un tumor. a-d: Imágenes del tumor y su zona circundante; e: Imagen general del ratón KO2; f: Disección del ratón KO2. Los asteriscos señalan los testículos. La punta de flecha blanca señala la masa tumoral.

3.B.b. Caracterización del tumor

Los estudios de anatomía patológica del tumor desarrollado por el ratón KO2 indicaron que se trataba de un teratoma. Los teratomas son tumores de células de línea germinal, que suelen contener varios tipos diferentes de tejidos derivados de las tres capas embrionarias. Su nombre (del griego, monstruo) se debe a su aspecto monstruoso dado por la aparición de gran variedad de tipos celulares, incluyendo ocasionalmente pelos, dientes, cartílago, etc. Son tumores raros, con una muy baja incidencia espontánea en general (*e.g. Ober et al., 2013*) así como también entre los roedores de laboratorio (*Jamadagni et al., 2013*).

A



B

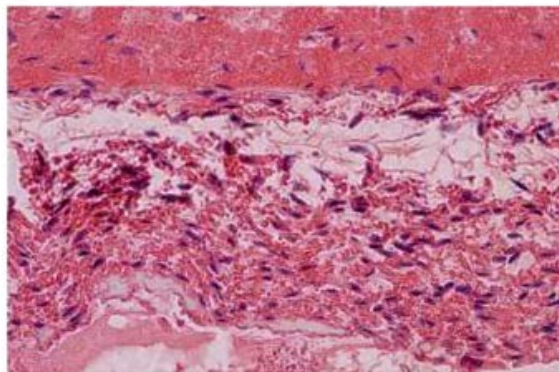


Figura IV.29. Anatomía patológica del tumor presente en el ratón KO2. **A.** Por debajo de la dermis y subcutánea (izquierda) se observa la presencia de diferentes tejidos que evidencian la presencia de un teratoma. a: haces musculares; b: glándulas dispersas; c: epitelio de tipo ectodérmico estratificado; d: epitelio endodérmico de tipo glandular coriónico; e: acinos glandulares; f: túbulos seminíferos necrosados con necrosis de tipo isquémica; g: espermatozoides maduros. Aumento: 4X. **B.** Imagen a mayor aumento (100X) de una región conteniendo espermatozoides maduros.

Al ser tumores de células germinales, los teratomas se presentan más comúnmente en las gónadas (ovarios o testículos) y la región sacrococcígea (por ejemplo, en el perineo). Pueden presentarse teratomas también en otros sitios como el mediastino, ya que células germinales primordiales se pueden asentar en otras áreas en su recorrido hacia la cresta genital. Los teratomas pueden ser benignos o malignos, y se clasifican en maduros o inmaduros de acuerdo con el grado de normalidad de las células observadas al microscopio (Howitt y Berney, 2015; Idrees *et al.*, 2017). En este caso, la anatomía patológica determinó que se trataba de un teratoma maduro (es decir que las células presentaban aspecto diferenciado), conteniendo haces musculares, glándulas dispersas, epitelio de tipo ectodérmico estratificado, epitelio endodérmico de tipo glandular coriónico, y acinos glandulares (Figura IV.29A). A su vez, adyacentes al tumor se visualizaron túbulos seminíferos necrosados con necrosis de tipo isquémica (Figura IV.29A, f), así como la presencia de espermatozoides maduros remanentes (Figura IV.29A, g, y IV.29B).

3.B.c. Conteos y morfología espermática

Con el objeto de evaluar la presencia de espermatozoides en los ratones KO envejecidos, se disecó cola de epidídimo y se procedió según lo descrito en Materiales y Métodos para el conteo de espermatozoides. Los conteos se realizaron por dos métodos: por un lado, se contaron espermatozoides en cámara de Neubauer, y por otro, se realizaron conteos de una dilución 1:5 sobre extendidos en portaobjetos, bajo observación microscópica.

Los conteos de espermatozoides realizados por ambos métodos mostraron una importante disminución de la concentración de espermatozoides en los ratones KO con respecto a los WT (Figura IV.30A). Además, esta diferencia fue muy evidente en las observaciones microscópicas (Figura IV.30B). Con respecto a los conteos de espermatozoides del ratón KO2, que presentó el tumor, los resultados obtenidos fueron bastante diferentes para ambos epidídimos. En tanto el conteo a partir del epidídimo derecho no difirió significativamente de lo observado para el KO1, el número de espermatozoides observados a partir de la cola del epidídimo izquierdo fue notablemente menor (ver Figura IV.30A). Llamativamente, la cantidad de eritrocitos en los preparados de las suspensiones obtenidas a partir de este epidídimo fue muy elevada, superando ampliamente a la cantidad de espermatozoides observados (Figura IV.30C). Suponemos que ello se debería a la infiltración del tumor en el epidídimo izquierdo (ver Figura IV.28B, f).

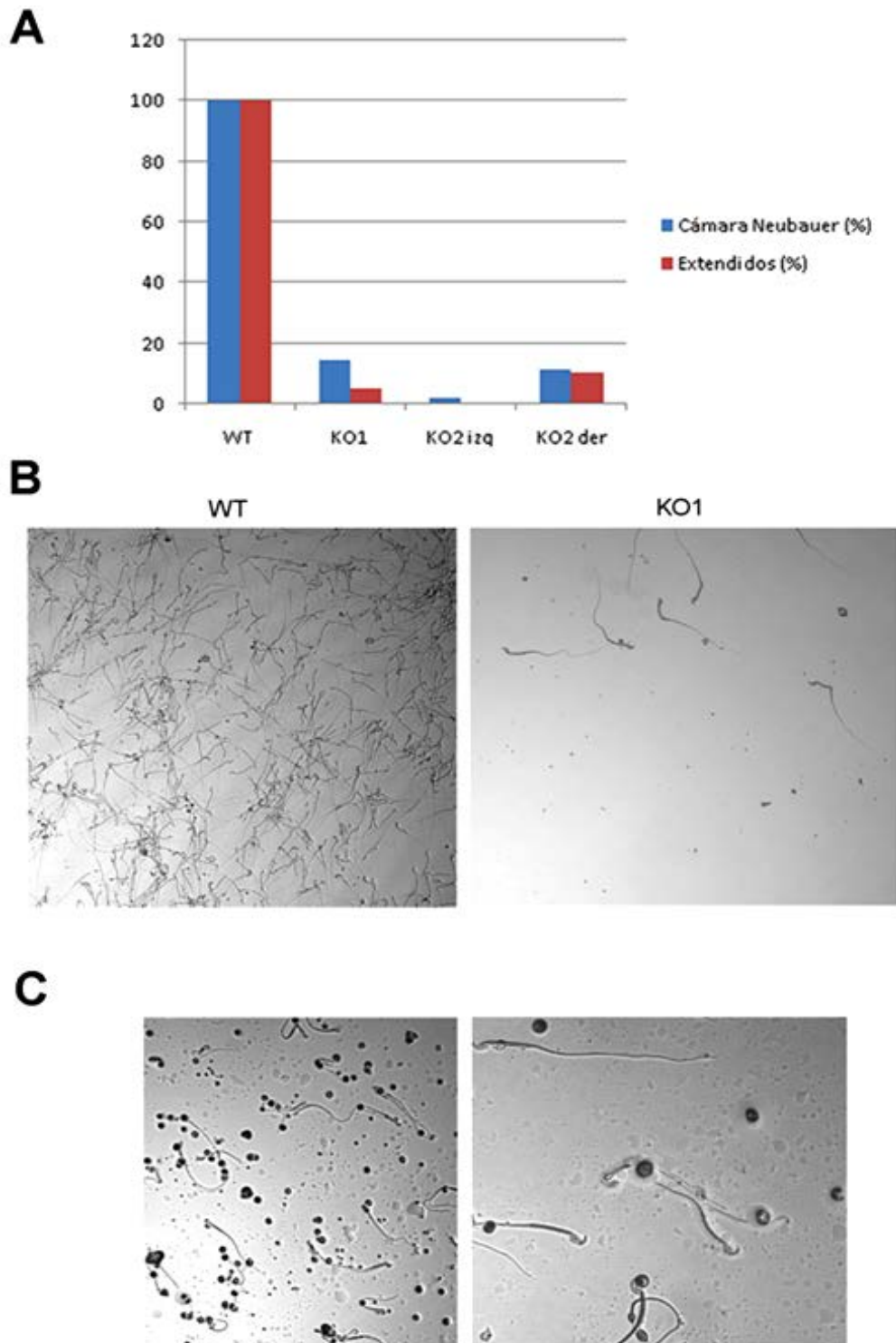


Figura IV.30. A. Conteo de espermatozoides a partir de cola de epidídimo de ratones KO vs WT de 1 año de edad, mediante dos métodos: conteo en cámara de Neubauer (azul) y en extendidos sobre portaobjetos (rojo). La cantidad de espermatozoides en los ratones KO está expresada como porcentaje del promedio del número de espermatozoides observado en los ratones WT. Los dos epidídimos del ratón KO2, portador del tumor, se procesaron separadamente. **B.** Observación microscópica bajo óptica de DIC de espermatozoides a partir de colas de epidídimos de ratones WT y KO (preparados a partir de diluciones 1:5). La imagen de la derecha corresponde al KO1, que no presentó tumor. **C.** Imagen microscópica de la suspensión de espermatozoides obtenida a partir del epidídimo izquierdo del ratón KO2. En este caso el preparado se realizó a partir de la suspensión sin diluir, ya que en la diluida el número de espermatozoides observados era muy escaso. En la imagen de la derecha se observa una sección a mayor aumento, donde se aprecia con claridad que las células contaminantes son eritrocitos.

En relación a la evaluación de anomalías morfológicas en las cabezas de los espermatozoides, no se observaron diferencias significativas entre los ratones WT y KO, a excepción del epidídimo izquierdo del ratón KO2, que presentó más del doble de espermatozoides con cabezas anómalas en comparación con los demás (datos no mostrados).

Debido a que se disponía de un número muy limitado de animales envejecidos, y a la cantidad de estudios realizados con los mismos, en esta oportunidad no se efectuaron estudios de motilidad espermática.

3.B.d. Test de Fertilidad

Una vez alcanzado el año de edad, y previo a la disección, los machos WT y KO se cruzaron cada uno con tres hembras B6 WT. Más allá de la notoria reducción en el conteo espermático, los machos KO fueron fértiles, como se observa en la Tabla IV.14. Si bien el macho KO2, portador del tumor, sólo preñó a una de las tres hembras, podemos suponer que esto podría deberse a que el animal tenía un evidente sufrimiento a causa del tumor ya que, como hemos visto, el conteo de espermatozoides en su epidídimo derecho no difería significativamente del conteo para el KO1.

Tabla IV.14. Cruzamientos realizados en los tests de fertilidad de ratones WT y KO *Spats1* de 1 año de edad.

Cruzamiento	Número de cruzamientos	Número de crías
♂ WT1 X ♀ WT	3	♀1: 7 ♀2: 7 ♀3: 8
♂ WT2 X ♀ WT	3	♀1: 7 ♀2: 8 ♀3: 4
♂ KO1 ^{-/-} X ♀ WT	3	♀1: 6 ♀2: 5 ♀3: 6
♀KO2 ^{-/-} X ♂ WT	3	♀1: 6 ♀2: 0 ♀3: 0

3.B.e. Análisis histológico

Los estudios de microscopía en cortes histológicos de testículos de ratones WT de 1 año de edad incluidos en Epon y teñidos con azul de toluidina, mostraron que una buena parte de los túbulos seminíferos se encontraban con su luz ocupada por estadios inmaduros de la espermatogénesis. Esto estaría de acuerdo con reportes previos que muestran una degeneración en los túbulos seminíferos asociada con el envejecimiento, y evidenciada por una obliteración del lumen tubular, entre otras alteraciones (Wang *et al.*, 1993).

Curiosamente, el aspecto de los túbulos seminíferos en los testículos de los ratones WT al año de edad recordó al observado para los ratones KO de 55 dpp (Figura IV.31). En ese sentido, es como si los ratones KO adultos jóvenes presentaran un aspecto “envejecido” en sus túbulos seminíferos, con un nivel de degeneración comparable al que ocurre normalmente en los individuos de mayor edad. No observamos diferencias que llamaran nuestra atención entre el aspecto de los túbulos seminíferos de ratones WT y KO de 1 año en los cortes (no mostrado), ya que en ambos casos la mayoría de los túbulos presentaba su luz total o parcialmente obliterada.

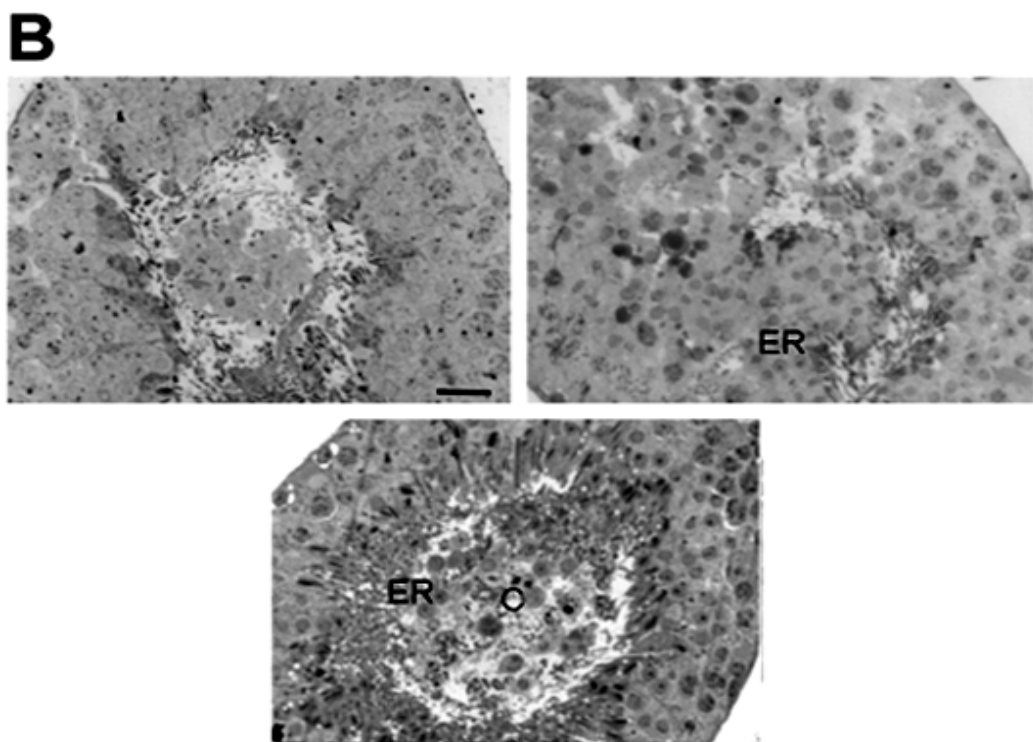
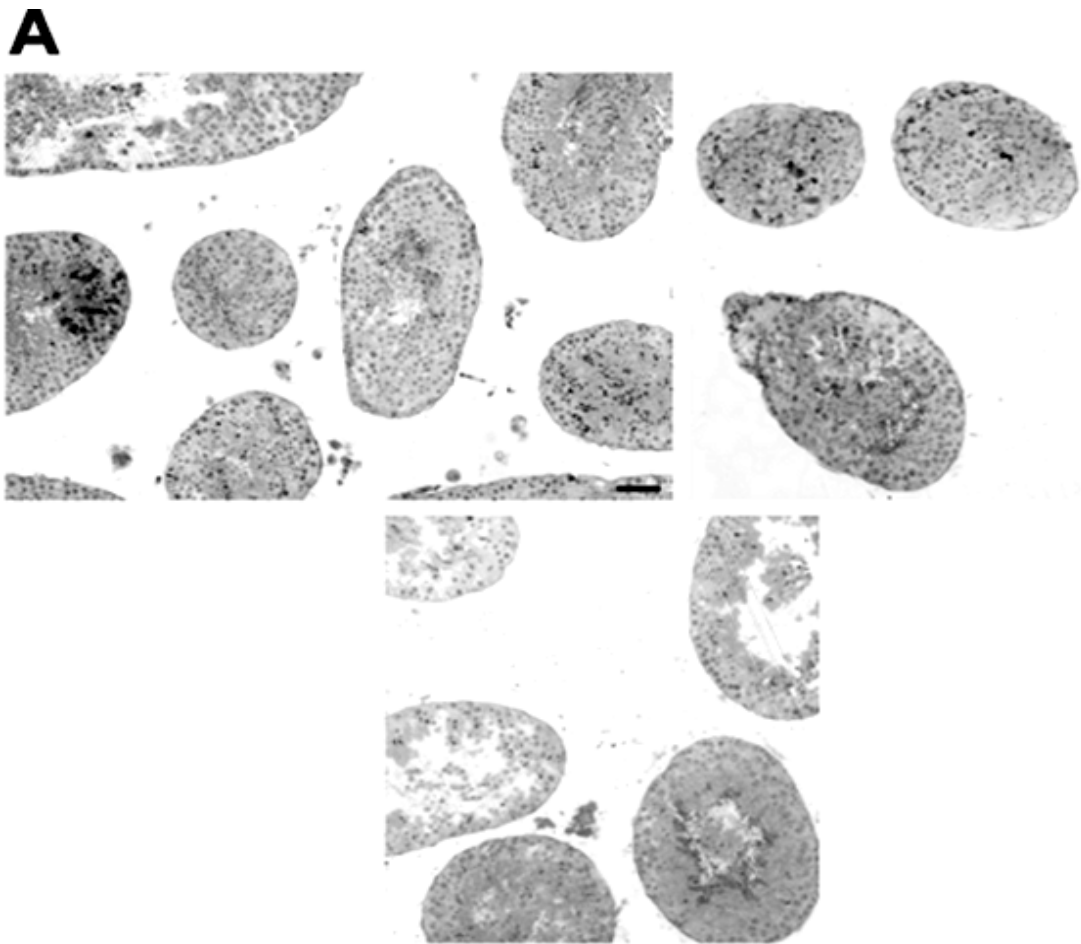


Figura IV.31. A. Cortes histológicas de bloques de testículos de ratones WT de 1 año de edad, incluidos en Epon y teñidos con azul de toluidina. Obsérvese que una buena proporción de los túbulos se encuentra cerrada, o presenta obstrucciones en la luz. Barra: 50 μ m. **B.** Imagen de algunos túbulos a mayor aumento. C: espermatozoides; ER: espermátidas redondas. Barra: 20 μ m.

3.C. Estudios de expresión génica en ratones *Spats1* KO vs WT

Como se mencionó en la Introducción (ver Capítulo I, Sección 2B), un trabajo previo había sugerido una vinculación de SPATS1 con la vía Wnt, proponiendo que SPATS1 sería un represor de dicha vía (Zhang *et al.*, 2010). Si así fuera, especulamos con que los ratones KO para el gen *Spats1* podrían ser defectuosos en su capacidad de inhibir la vía Wnt en el testículo, lo que eventualmente redundaría en una sobreexpresión de genes blanco de esta vía.

Como forma de testar esta hipótesis, decidimos realizar estudios de expresión génica absoluta en el testículo mediante qRT-PCR en tiempo real de genes blanco de la vía Wnt, seleccionando para ello cuatro genes conocidos como blancos de dicha vía: *Lef-1*, *Tcf1*, *ciclina D1* y *c-Myc*. Además, incluimos en las reacciones a otros genes de la vía Wnt: *Wnt4* [considerado como desempeñante de un rol central en la diferenciación hacia ovario, y represor del desarrollo hacia testículo (Tevosian y Manuylov, 2008)], *Ctnnb1* (efector con rol central en la vía Wnt; ver Introducción), *Dvl1* y *Dvl2* [reguladores positivos de la vía Wnt (*e.g.* Gao y Chen, 2010)]. En particular, como hemos mencionado (ver Introducción) SPATS1 ha sido propuesto como un interactor con DVL2 (Zhang *et al.*, 2010).

Adicionalmente, se incluyeron iniciadores para *Cldn11* (claudina 11), que codifica para un componente de las uniones ocluyentes. La inclusión de este gen se basó en un antecedente de la literatura, en el cual en espermatoцитos paquiténicos de rata se había observado una cierta disminución en los niveles de expresión de genes correspondientes a algunas proteínas de adhesión celular, entre ellas la claudina 11, a medida que los animales envejecían (Paul y Robaire, 2013).

Otro grupo de genes incluido en este estudio fueron 4 genes marcadores de diferentes etapas de la espermatogénesis:

- *Sycp3*, un marcador específico de espermatoцитos meióticos (Alzheimer *et al.*, 2010);
- *Dazl* (Deleted in azoospermia-like gen), gen cuya alteración está asociada a pacientes humanos con azoospermia severa (Zhu *et al.*, 2014);
- *Spa17*, gen cuyo producto proteico se encuentra en los espermatozoides maduros, participante en la unión del ovocito con la zona pelúcida. Su sobreexpresión está asociada a varios tipos de cáncer (Chiriva-Internati *et al.*, 2011);
- *Prm1* (Protamina 1), codificante para una proteína de unión a la cromatina, que produce su hipercompactación en la cabeza del espermatozoide durante el proceso de espermiogénesis (Gázquez *et al.*, 2008).

Estos genes marcadores de tipos celulares se analizaron para determinar si existía alguna alteración en la expresión de alguno de ellos en los ratones KO, de modo de asociar esta alteración con la deficiencia de *Spats1*.

También se incluyó uno de los genes, cuya proteína en los análisis *in silico* había surgido como posible interactuante con SPATS1 en ensayos de doble híbrido de levadura (ver Resultados, Capítulo IV, Sección 1.5.E): *Cflar*, codificante para un inhibidor de la apoptosis expresado predominantemente en el testículo (Ming-Xiao et al, 2013).

Finalmente, se incluyó al gen *Cdc5l*, codificante para una proteína presente en todos los eucariotas e involucrada en la regulación del ciclo celular, para el cual los estudios bioinformáticos nos mostraron su segregación conjunta con *Spats1* en todos los mamíferos (ver Capítulo IV, Sección 1.C).

Todos los estudios de expresión génica por qRT-PCR en tiempo real fueron efectuados por triplicado para ratones de 55 dpp (3 réplicas biológicas de los ratones KO, 2b y 7b, vs ratones control C57BL). Se realizaron también análisis por qRT-PCR para los ratones de 1 año de edad, aunque en este caso los experimentos únicamente pudieron efectuarse por duplicado, ya que de momento no contábamos con mayor número de animales de esa edad. Como gen control normalizador, se tomó la expresión del gen de uso doméstico *Ppp1cc*, el cual también se utilizó para la construcción de la curva de calibración (ver Anexos, Figura VIII.4), y se realizó verificación cruzada empleando un segundo gen calibrador, *Tax1bp1*.

En la tabla IV.15 se listan los genes analizados, su función asociada, y los resultados obtenidos.

No se registraron diferencias significativas en los niveles de expresión entre los ratones WT y KO para los genes seleccionados, con la única excepción de gen *Cldn11*, en cuyo caso para los ratones de 55 dpp se observó una disminución cercana al 60% en los niveles de expresión en los animales KO con respecto a los animales control (Figura IV.32).

Como era esperable, no encontramos expresión de *Wnt4* en el testículo; tampoco se expresó en los ratones KO. No detectamos tampoco expresión de *Dvl2* que es el interactante de SPATS1 que había sido detectado *in vitro* (Zhang et al., 2010), pero sí detectamos expresión de *Dvl1*; como hemos mencionado, los 3 genes *Dvl* están muy relacionados, y codifican para proteínas con dominios conservados (ver Introducción).

Tabla IV.15. Resultados de estudios de expresión de genes por qRT-PCR.

A. Expresión absoluta normalizada en ARN de testículos de ratones WT vs KO de 55 - 60 días de edad.

Nombre del gen	Función asociada	Promedio expresión en testículo total (copias)		
		Control	KO <i>Spats1</i>	
		WT	2b	7b
<i>Ccnd1</i>	Regulador del ciclo celular (oncogén) activado por la vía Wnt/ β -catenina	151 \pm 47	226 \pm 29	232 \pm 36
<i>Lef1</i>	Factor de transcripción activado por la vía Wnt/ β -catenina	1109 \pm 176	741 \pm 87	811 \pm 61
<i>Tcf1</i>	Factor de transcripción activado por la vía Wnt/ β -catenina	140 \pm 12	141 \pm 39	146 \pm 32
<i>c-Myc</i>	Regulador del ciclo celular (oncogén) activado por la vía Wnt/ β -catenina	0	0	0
<i>Wnt4</i>	Regulador pro-ovario	0	0	0
<i>Ctnnb1</i>	β -catenina, efector de la vía Wnt	62 \pm 1	57 \pm 9	62 \pm 7
<i>Dvl1</i>	Regulador positivo de la vía Wnt	181 \pm 31	144 \pm 22	156 \pm 29
<i>Dvl2</i>	Regulador positivo de la vía Wnt	0	0	0
<i>Cldn11*</i>	Proteína de adhesión celular	327 \pm 35	201 \pm 2	191 \pm 12
<i>Sycp3</i>	Meiosis - complejo sinaptonémico	1415 \pm 178	1322 \pm 121	1316 \pm 89
<i>Prm1</i>	Protamina1, sustituto de histonas en espermatogénesis	4649 \pm 388	4744 \pm 277	5023 \pm 394
<i>Dazl</i>	RNA binding protein, asociada a azoospermia severa	1676 \pm 174	1504 \pm 136	1675 \pm 271
<i>Spa17</i>	Proteína de unión a zona pelúcida	2151 \pm 142	2226 \pm 185	2401 \pm 253
<i>Cflar</i>	Regulador de apoptosis	0	0	0
<i>Cdc5l</i>	Regulador ciclo celular	212 \pm 52	244 \pm 37	256 \pm 60
<i>Ppp1c</i>	Gen housekeeping	1735 \pm 65	1736 \pm 73	1750 \pm 113
<i>Tax1bp</i>	Gen housekeeping	1463 \pm 62	1596 \pm 97	1610 \pm 80

*En amarillo se destaca el resultado obtenido para el gen *Cldn11*, que fue el único que dio diferencias significativas entre los ratones WT y KO.

B. Expresión absoluta normalizada en ratones WT vs KO de 1 año de edad.

Nombre del gen	Función asociada	Promedio expresión en testículo total (copias)	
		Control	KO <i>Spats1</i>
		WT	
<i>Ccnd1</i>	Regulador del ciclo celular (oncogén) activado por la vía Wnt/ β -catenina	170 \pm 42	197 \pm 36
<i>Lef1</i>	Factor de transcripción activado por la vía Wnt/ β -catenina	1024 \pm 323	1130 \pm 220
<i>Tcf1</i>	Factor de transcripción activado por la vía Wnt/ β -catenina	195 \pm 39	233 \pm 67
<i>c-Myc</i>	Regulador del ciclo celular (oncogén) activado por la vía Wnt/ β -catenina	0	0
<i>Cldn11</i>	Proteína de adhesión celular	250 \pm 47	257 \pm 57
<i>Ppp1c</i>	Gen housekeeping	1635 \pm 236	1308 \pm 177

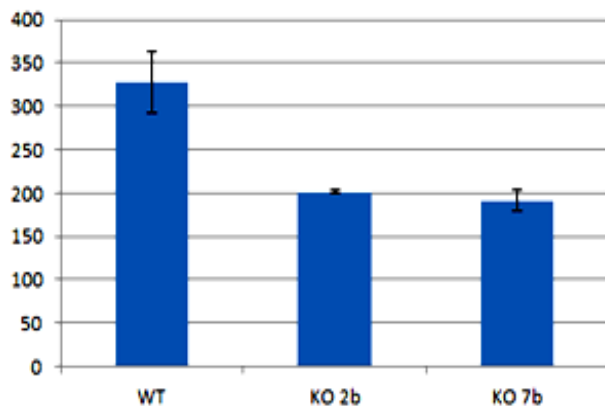


Figura IV.32. Representación de los niveles de expresión de *Cldn1* en testículos de ratones de 55 dpp analizados mediante qRT-PCR en experimentos por triplicado, y normalizados con el gen de referencia *Ppp1cc*. Los datos están expresados en unidades arbitrarias, como valores absolutos de expresión normalizados (\pm SD); ($p < 0,05$).

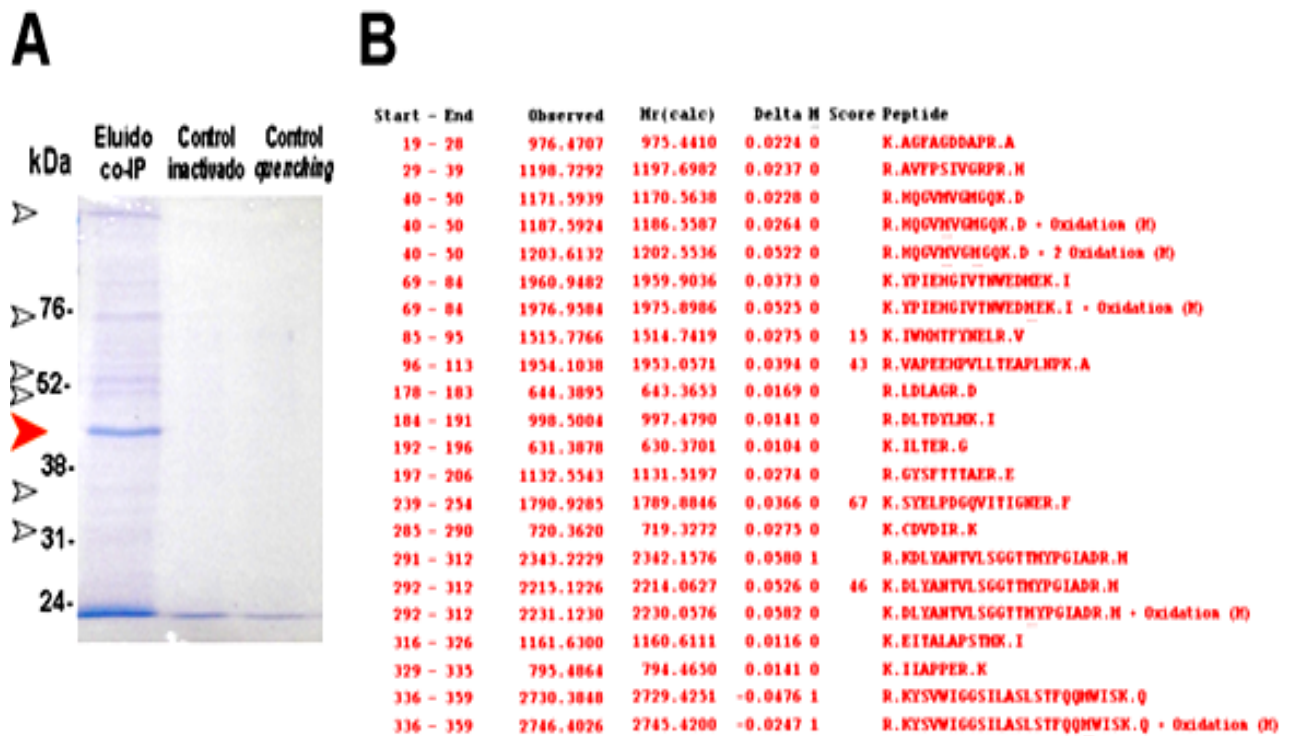
No se identificaron diferencias en la expresión de los marcadores de distintos procesos de la espermatogénesis escogidos (ver tabla 11), lo que era esperable dado que la ausencia de *Spats1* no altera la progresión normal de la espermatogénesis en ninguna de sus etapas.

Por otra parte, no se detectó expresión de *Cflar* en el testículo ni de los ratones WT ni KO, lo que descarta la posibilidad de que esta proteína interactúe con SPATS1 como sugerían los estudios de doble híbrido de levadura (ver Resultados, Capítulo IV Sección 1.V.E). Finalmente, se registra expresión testicular de *Cdc5l*, por lo que no se descarta la idea de que pudiera existir algún tipo de relación entre la expresión de este gen y la de *Spats1*, aunque no hay diferencia significativa entre la expresión en los ratones KO y los WT.

4. ESTUDIOS DE INTERACCIÓN PROTEÍNA-PROTEÍNA

4.A. Ensayos de co-inmunoprecipitación

Otra estrategia que utilizamos con el fin de contribuir a la elucidación del rol de SPATS1 en el testículo, fue la búsqueda de posibles proteínas interactoras con ésta. Con ese fin, realizamos ensayos de co-inmunoprecipitación con un anticuerpo comercial anti-SPATS1, en lisados de testículo de ratón. Para estos ensayos se emplearon individuos machos WT de la cepa CD1-Swiss (que es la cepa disponible en el bioterio del IIBCE) de 17 días, y se procedió según lo descrito en Materiales y Métodos. Los ensayos se realizaron por duplicado partiendo de diferentes individuos, y los resultados obtenidos fueron similares en ambos ensayos. En la figura IV.33A se observa un gel de poliacrilamida con el resultado de uno de los ensayos de co-inmunoprecipitación, a modo de ejemplo.



Protein sequence coverage: 51%

```

1  HSDIIALLV INGSQCKAG FAGDDAPRAV FPSIVGRPRH QGVNIVGIGQK
51  DSTVGSBEAGS KRGILTLYKP IENGIVTWWE DNEKIWHTFY YHELVAPEE
101 NPVLLTEAPL NPKANREKNT QINFETFTNP ANVVAIQAVL SLYASGRITG
151 IVNDSGDQVY HTVPIYEGYA LPNAILRLDL AGRDLTDYLM KILTERGYSF
201 TTTAEREIVR DIKELKCYVA LDFEQENATA ADRSSLEKSY ELPDGQVITI
251 GHERFRCPFA LPQPSFLGME SGGINHTFTN SINKCVDIR KDLYANTVLS
301 GGTHTYPIA DRMQKITAL APSTKIKII APPERKYSVW IGGSSILASL
351 TFQQHWISKQ EYDEGSPSIV HNKCF

```

Figura IV.33. A. Gel de poliacrilamida al 15% de eluidos de las columnas de co-inmunoprecipitación, teñido con azul de Coomassie. En las dos columnas de la derecha se observan los controles efectuados para eliminar interacciones inespecíficas: control de resina sin activar y control de resina 100% bloqueada. Como se aprecia, no se detectaron bandas en ninguno de los dos controles. Las puntas de flecha a la izquierda del gel identifican todas las bandas que se cortaron del gel para su análisis por MALDI-TOF. La punta de flecha roja señala la banda mayoritaria, de 44 kDa. **B.** Resultado del análisis por MALDI-TOF de la banda mayoritaria, de 44 kDa. En la parte superior se observa la lista de péptidos identificados que correspondieron a actina, con sus masas observadas y calculadas. En la columna *Score* se presentan los péptidos que fueron seleccionados para digestión trípica. En la parte inferior se observa la secuencia de la actina de *M. musculus*, donde los péptidos identificados en la banda escindida del gel aparecen en rojo.

4.B. Identificación de péptidos por espectrometría de masas MALDI-TOF

Las bandas eluidas se sometieron a análisis de espectrometría de masas MALDI-TOF para identificación de proteínas por mapeo peptídico. Utilizando el programa Mascot y datos de ms y ms/ms, se identificaron, en total, las proteínas que se observan en la Tabla IV.16.

Como se observa, más allá de pequeñas cantidades de proteínas típicamente contaminantes (i.e queratina) o presentes en los sueros y soluciones de bloqueo (caseína, albúmina), la banda que fue notoriamente mayoritaria en experimentos realizados por duplicado, correspondió a la proteína actina de *Mus musculus* (Figura IV.33B). Si bien se trata de una proteína muy abundante que podría co-inmunoprecipitar “por arrastre”, parece improbable que una banda tan prominente corresponda a una interacción inespecífica. Además, este resultado se condice con los datos de análisis de interacciones proteicas de doble híbrido (ver IV.1.E), que sugieren que SPATS1 interactuaría con proteínas de unión a actina.

Tabla IV.16. Resultado del análisis por MALDI-TOF de las bandas escindidas del gel de poliacrilamida de la Figura IV.33. Sombreados en amarillo se muestran los resultados correspondientes a la banda mayoritaria, de 44 kDa.

Rótulo de la muestra*	Masa mol. aprox. en el gel (kDa)	Proteína identificada por EM	Masa mol. teórica (kDa)
B31	31	<i>alpha-S1-casein isoform X3, Bos taurus</i>	23.6
A36	36	Ninguna proteína estadísticamente significativa	-
B44	44	Actina, <i>Mus musculus</i>	41.7
A50	50	<i>Serum albumin, Bos taurus</i>	69
A54	54	<i>Queratin</i> (contaminante)	-
A75	75	<i>unnamed protein product, partial, Mus musculus</i>	68.4
A120	120	<i>Queratin</i> (contaminante)	-

*Corresponde al peso molecular estimado para cada banda.

V. DISCUSIÓN

En este trabajo de tesis se emplearon diversos abordajes tanto *in silico* como experimentales, con el objeto de aportar información acerca del rol de la proteína SPATS1 en el testículo. A continuación se discuten los resultados obtenidos durante el desarrollo de esta investigación.

1. GENERACIÓN DE RATONES KO

El método de *Recombineering* para generación de ratones KO falló en las etapas de gap repair, etapas que, según se ha descrito, pueden representar un cuello de botella de la técnica. Como consecuencia, no pudimos construir el vector de clonación (*targeting vector*) para microinyectar blastocistos, y por lo tanto no se produjeron animales KO. La aplicación de este método implicó un gran esfuerzo, tiempo y dinero. Nuestra conclusión es que se trata de un proceso extremadamente laborioso que exige numerosos pasos de clonado, manipulación de cepas especiales en diferentes condiciones, y muchas etapas que pueden fallar.

Con respecto a la técnica de *gene trap*, mediante esta metodología logramos conseguir tres clones de células madre de ratón con el gen *Spats1* anulado, los cuales fueron microinyectados en blastocistos e implantados en madres receptoras. Como primera conclusión podemos considerar que el método fue exitoso, ya que obtuvimos tres ratones quiméricos. Sin embargo, debemos señalar que se trata de una metodología de alto costo y que requiere de instalaciones con una capacidad importante, ya que para la obtención de los tres ratones quiméricos se necesitaron 24 sesiones de microinyección y 1130 embriones microinyectados. Por otra parte, si bien los tres ratones obtenidos presentaron un muy buen nivel de quimerismo (superior al 50%), no logramos obtener el ratón KO homocigota doble nulo, debido a que ninguna de las tres quimeras transmitió la mutación a sus descendientes, es decir, las células modificadas no llegaron a la línea germinal. Esto no es sorprendente; por el contrario, es una de las limitaciones del sistema ya que aproximadamente sólo un tercio de los ratones KO producidos por este método suelen transmitir los genes mutados a la línea germinal (Comunicación personal de la UATE, IPMont). Los bajos porcentajes de transmisión a la línea germinal podrían explicarse por la cepa escogida por el Consorcio IGTC para la generación de las líneas celulares de trampa génica, la C57BL. Si bien esta cepa endocriada posee numerosas ventajas que han motivado que la misma sea considerada por muchos científicos como el “*gold standard*” para la producción de ratones KO, como un buen

crecimiento, vida prolongada, tolerancia a buena parte de las mutaciones y baja susceptibilidad al desarrollo de tumores, es mala transmisora a la línea germinal (Rivera y Tessarollo, 2008; Carstea *et al.*, 2009). No obstante ello, la mayor parte de los ratones KO han sido producidos en esta cepa. Además, la producción de ratones en la cepa C57BL posee la ventaja adicional de que se trata de la cepa a la cual pertenecen los genomas secuenciados de *M. musculus*, por lo cual la producción de ratones KO en otra cepa requeriría el paso adicional del pasaje posterior a un contexto C57BL. En nuestro caso, si bien al inicio del proyecto estábamos al tanto de la posibilidad de que la mutación no fuera transmitida a la línea germinal, decidimos de todos modos correr el riesgo dado que no se disponía en ese momento de una mejor alternativa, y de hecho, existe una gran cantidad de antecedentes exitosos de obtención de ratones KO mediante *gene trapping*.

Durante el proceso de producción del KO *Spats1*, comenzó a popularizarse la tecnología CRISPR/Cas9 para edición genómica, que en ese momento constituía un novedoso abordaje recientemente publicado, por lo cual decidimos intentarlo por esta metodología. Mediante este método obtuvimos una gran cantidad de animales modificados genéticamente en el gen *Spats1* en sólo tres meses, de los cuales finalmente mediante cruzamientos selectivos logramos identificar 12 mutaciones diferentes; por razones de costo y espacio en el bioterio, continuamos con dos líneas de ratones KO (designadas 2b y 7b).

En suma, el método CRISPR/Cas9 nos permitió lograr una eficiencia muy superior a la de las otras tecnologías ensayadas. En particular, en comparación con *gene trap*, la diferencia fue muy significativa tanto en el número de sesiones de microinyección requeridas, número de hembras utilizadas (donantes y receptoras), así como porcentajes de transgénesis. Ello resulta evidente a partir de la tabla V.1 (fusión de las tablas IV.4 y IV.5), que presentamos unificada aquí a los efectos de facilitar la comparación directa. Adicionalmente, al efectuar la microinyección directamente en cigotos, no tuvimos el problema de eventual no transmisión a la línea germinal; de hecho, todos los ratones modificados lo hicieron.

Un paso clave radicó en el diseño del ARNg. Más allá del cuidado necesario en el diseño del mismo, y en que su sitio de complementariedad se encontrara lo más próximo posible al inicio del transcripto, fue muy importante la elección de un candidato que no contuviera sitios *off-target*, ya que ello simplificó el procedimiento al evitarnos la necesidad de realizar controles posteriores de eventual alteración en esos sitios.

El éxito obtenido, en conjunto con la importante reducción en el número de animales requeridos, evidenciaron que la metodología de CRISPR/Cas9 es la técnica de elección para servicios de transgénesis pequeños, como es el caso de la UATE del IPMont. Los ratones KO *Spats1* fueron los primeros ratones KO producidos en dicho Servicio, y en nuestro país. El éxito ha alentado al Servicio, que actualmente se encuentra abocado a la producción de varios ratones KO para distintos proyectos nacionales.

Tabla V.1. Comparación de las técnicas de transgénesis *gene trap* vs CRISPR/Cas9. Nótese la menor cantidad de animales utilizados, menor manipulación de embriones y el alto número de ratones modificados obtenidos con CRISPR.

Técnica	Microinyecciones				Nº de animales usados		
	Nº sesiones	% sobrevida de embriones microinyectados	Ratones modificados obtenidos	% Transgénesis total	Donantes Hembra	Madres receptoras	Transmisión a la línea germinal
ES Cell: Genetrap	24	87.6 (990/1130)	3	0.3 (3/1130)	280	60	0%
CRISPR	1	46 (46/99)	16	16 (16/99)	31	8	100%

2. HACIA EL ROL DE SPATS1...

2.A. SPATS1 y adhesión celular

El estudio macroscópico de los ratones KO *Spats1* no reveló ningún defecto en el desarrollo anatómico de los animales ni en su comportamiento, así como tampoco diferencias en peso ni tamaño, en comparación con los ratones WT control. Tampoco evidenciamos defectos en la capacidad reproductiva, ni en machos ni en hembras. Sin embargo, una observación más detallada de los cortes histológicos de los testículos de los ratones KO, reveló una característica particular: una obstrucción del lumen en prácticamente el 90% de los túbulos seminíferos, los que se encontraban desde parcialmente hasta completamente obstruidos. En los casos de obstrucción, se observaban en el lumen, además de espermatozoides, células en diferentes fases de la espermatogénesis, especialmente espermátidas redondas, espermátidas en elongación, y algunos espermatocitos I. La pared en la mayoría de los túbulos seminíferos presentaba una apariencia normal, sin afectar a las células de Sertoli, espermatogonias, y demás tipos celulares en la pared del túbulo; sin embargo, algunos túbulos presentaban evidentes desgarramientos en parte de la pared.

Es interesante destacar que este fenotipo se asemeja de modo notable a los observados en algunos estudios de ratones KO deficientes en genes codificantes para proteínas vinculadas a adhesión celular en el testículo. Tal es el caso de *Tslc1*, que codifica para un miembro de la superfamilia de las cadherinas (IgCAMs), donde se evidenció que el ratón KO para este gen fallaba en mantener a las espermátidas redondas adheridas a las células de Sertoli en el túbulo seminífero; estas células se desprendían y acumulaban hacia el lumen donde degeneraban por apoptosis, mientras que las espermatogonias y células intersticiales no sufrieron ningún efecto (e.g. Yamada et al., 2006). También se observó que algunos de estos ratones KO desarrollaron diferentes tipos de tumores en próstata, mama, pulmón y páncreas. Otro ejemplo es RAP1, una pequeña guanosín-trifosfatasa involucrada en los procesos de adhesión celular, donde el mutante KO también presentó liberación de espermátidas redondas hacia el lumen de los túbulos desde el epitelio seminífero, debido a una pérdida de los contactos de adhesión con las células de Sertoli (Aivatiadou et al., 2007). En ambos ejemplos mencionados el aspecto de los túbulos seminíferos presentó muchas similitudes con el observado en caso de los ratones KO *Spats1*, si bien estos últimos fueron fértiles, en tanto los otros resultaron severamente subfértiles. En la Figura V.1. se reproducen algunas imágenes extraídas de los trabajos anteriormente mencionados, con el objeto de ilustrar la similitud entre el aspecto de los túbulos seminíferos en dichos casos, y el observado para los mutantes *Spats1*.

Por otra parte, muchas sustancias químicas como por ejemplo el veneno de escorpión, producen también desprendimientos de tejido en la pared de los túbulos seminíferos (Penna-Videau et al., 2000). El fenotipo observado en los mutantes *Spats1* recuerda también a lo que ocurre en humanos en muchos casos de pacientes con patologías testiculares, en los que suele producirse liberación de estadios inmaduros de la espermatogénesis a la luz de los túbulos seminíferos (Prof. Agregado Dr. J.C. Scasso, Coordinador de Ginecología y Obstetricia del Hospital Británico, Montevideo, comunicación personal).

Estos antecedentes indican claramente que el fenotipo observado en los mutantes *Spats1* corresponde a procesos anómalos, y nos da una idea de un fenotipo de alteración en las uniones intercelulares donde si bien hay una evidente oclusión del lumen de los túbulos, el desprendimiento no es total ya que muchas de estas células continuarían su proceso normal generando altos números de espermatozoides maduros.

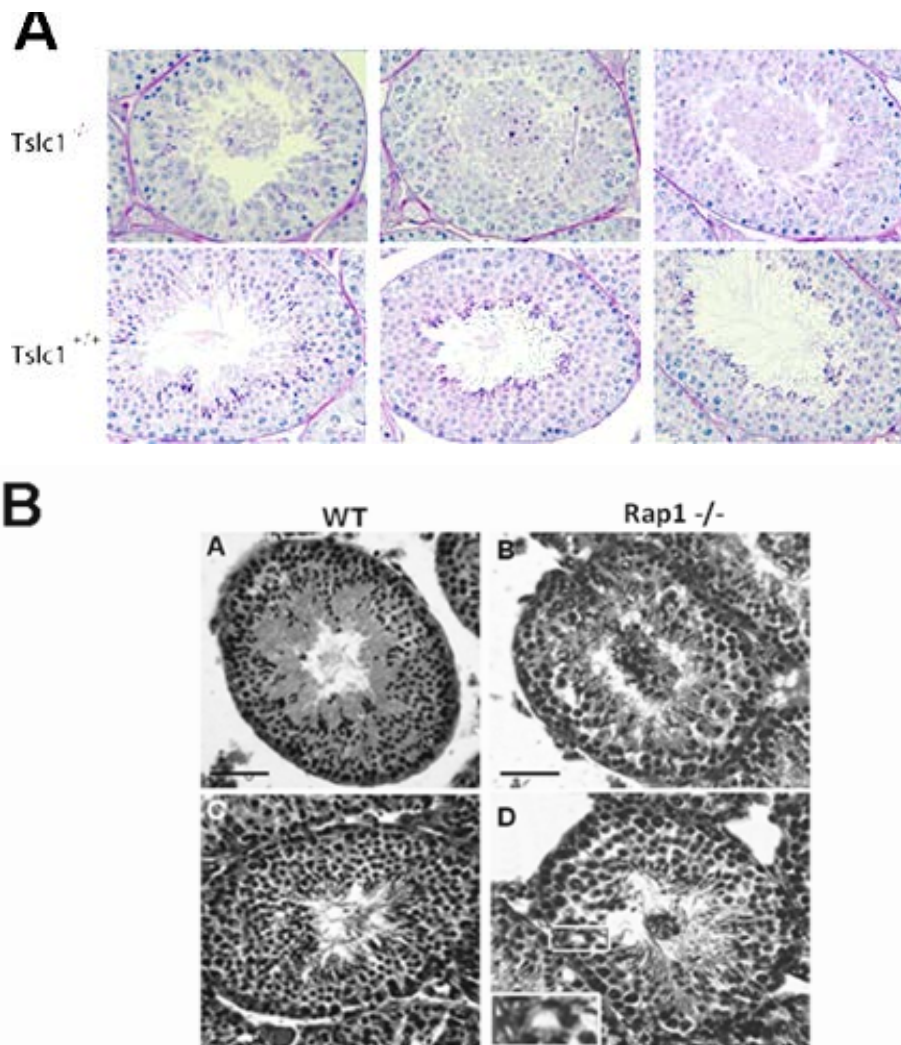


Figura V.1 Se muestran imágenes extraídas de algunos trabajos en los que se analizó el fenotipo testicular para el bloqueo de genes codificantes para proteínas de adhesión celular; como se aprecia, la similitud con las imágenes observadas en los cortes de los ratones KO *Spats1* son evidentes. **A.** Ratones KO *Tslc*^{-/-} (Tomado de Yamada *et al.*, 2006). **B.** Ratones KO *Rap1*^{-/-} (Tomado de Aivatiadou *et al.*, 2007).

Con respecto a los experimentos de co-inmunoprecipitación, se obtuvo una banda notoriamente mayoritaria que correspondió a la proteína actina. La banda identificada fue de gran intensidad, lo cual permite suponer que se trataría de una interacción específica. La actina participa en más interacciones proteína-proteína que cualquier otra proteína conocida (e.g. Dominguez R, 2004). Por otro lado, las búsquedas de interacciones moleculares mediante el recurso IntAct arrojaron información correspondiente a estudios empíricos de doble híbrido de levadura, que mostraron siete posibles interactores para SPATS1. Llama la atención que varios de estos interactores corresponden a proteínas de interacción con actina y adhesión celular. Aunque es cierto que los estudios de doble híbrido suelen dar numerosos falsos positivos y por lo general los resultados deben ser corroborados

por otro método, estos datos, sumados al resultado de nuestros experimentos de co-immunoprecipitación, y al fenotipo observado en los cortes histológicos de los ratones mutantes, permiten sospechar que SPATS1 sería una proteína vinculada a la adhesión celular, e interactuaría con actina. Si así fuera, su alteración podría provocar pérdida de adhesión entre los sincitios celulares en el túbulo seminífero, lo que redundaría en la invasión de la luz de los túbulos, e incluso la ocurrencia de desgarramientos en algunas regiones de los mismos. En este sentido, planeamos realizar experimentos de colocalización de SPATS1 en cortes histológicos al microscopio confocal, con actina (utilizando faloidina), así como también con proteínas de adhesión celular (como β -catenina y otras). Estos experimentos se llevarán a cabo utilizando un microscopio confocal Zeiss LSM 800 con módulo Airyscan, disponible en el IIBCE. Este microscopio, de muy alta resolución, podrá eventualmente permitirnos visualizar si SPATS1 colocaliza con proteínas de adhesión celular.

En cuanto a la estructura de la proteína predicha, los estudios de motivos coiled-coil y de modelación, ambos predicen que SPATS1 sería una proteína desplegada, con hojas α y β abiertas, hidrofílicas, en forma de horquilla. Estos motivos están frecuentemente presentes en proteínas que se unen al citoqueleto de actina (*e.g. Dominguez, 2004*).

Un trabajo previo ha vinculado a SPATS1 con la vía Wnt/ β -catenina (*Zhang et al., 2010*), como mencionamos en la Introducción. Es sabido actualmente que la β -catenina es una proteína con función dual, actuando por un lado como molécula de las uniones adherentes (*e.g. Boyer et al., 2008*), y por otro como regulador de la vía Wnt. Si como sugiere el mencionado trabajo, SPATS1 es un integrante de la vía Wnt, quizá podría también tener una función dual al igual que la β -catenina, participando a la vez en la vía Wnt (ver Sección V.C) y en la adhesión celular.

Con el objeto de evaluar si las alteraciones testiculares en los mutantes *Spats1* se incrementaban con la edad, dejamos a algunos de los ratones alcanzar el año de edad. Curiosamente, el aspecto de los túbulos seminíferos en los testículos de los ratones WT de 1 año de edad recordó al observado para los ratones KO de 55 dpp. Al año, tanto en los ratones WT como KO la mayoría de los túbulos presentaba su luz total o parcialmente obliterada, de modo que no observamos diferencias que llamaran nuestra atención entre el aspecto de los túbulos seminíferos en ratones de esa edad, entre ambos casos. Esto estaría de acuerdo con trabajos que muestran que a medida que los individuos envejecen, se produce degeneración en los túbulos seminíferos; es decir, que la progresiva degeneración

sería un proceso normal que ocurriría con la edad. Por ejemplo, en ratas envejecidas se ha descrito obliteración del lumen tubular (Wang *et al.*, 1993).

Por otro lado, resultados reportados por Paul y Robaire (2013) sugieren que en las ratas esa atrofia testicular que ocurre con la edad, estaría relacionada con la pérdida de proteínas de adhesión celular. Mediante ensayos de microarreglos, mostraron una disminución de alrededor del 50% en la expresión de genes codificantes para proteínas de unión intercelular como claudina 11, α -catenina, N-cadherina y otras proteínas de adhesión, en los espermatozoides paquiténicos de ratas envejecidas (18 meses de edad). También reportaron disminución en la expresión de genes para proteínas relacionadas con la regulación de la distribución de actina. Curiosamente, en experimentos de expresión génica realizados comparando ARN de testículo total de ratones KO *Spats1* vs WT, hemos registrado una disminución significativa cercana al 63% en la expresión del gen *Cldn11* [codificante para la proteína de las uniones estrechas claudina 11 (e.g. Brembeck *et al.*, 2005)], en los ratones KO *Spats1* adultos jóvenes en comparación con los ratones WT, no así en los envejecidos. Una hipótesis podría ser que la disminución de la expresión de claudina 11 (y muy posiblemente de otras proteínas de adhesión) producida directa o indirectamente por la ausencia de SPATS1, explicaría el defecto en la adhesión de las células al epitelio seminífero y el desprendimiento de parte de las células hacia el lumen del túbulo. Siguiendo con este razonamiento, podríamos suponer que la pérdida prematura de proteínas de adhesión celular en los ratones KO adultos jóvenes emularía la situación que se da normalmente a medida que los animales envejecen, contribuyendo a su vez a explicar el fenotipo “envejecido” que hemos observado en los túbulos seminíferos de los ratones KO de 55 dpp. Este hallazgo podría ser una pista importante sobre el rol molecular de SPATS1, por lo que en el futuro nos proponemos analizar la expresión de otras proteínas conocidas de adhesión, como las familias de las cadherinas y las integrinas.

En suma, nuestros resultados sugieren que la ausencia de SPATS1 ocasionaría un nivel de degeneración en los túbulos seminíferos de los individuos adultos jóvenes, que sería comparable al que usualmente se produce con el avance de la edad. En ese sentido, podemos decir que los testículos de los ratones KO *Spats1* adultos jóvenes presentarían un aspecto “envejecido” en sus túbulos seminíferos, tal vez causado por una alteración prematura de las uniones intercelulares.

2.B. SPATS1 y fertilidad

Los análisis de datos de estudios de expresión de genes por microarreglos publicados por [Shultz et al. \(2003\)](#), estiman que más de 2300 genes son expresados de manera preferencial o predominante en la línea germinal masculina del ratón, de los cuales para la gran mayoría no se conoce su función. Se han realizado cientos de estudios funcionales; de ellos, se conocen los de mayor relevancia para la reproducción mientras el resto se mantienen inexplorados o sin publicar. Históricamente, la obtención de un ratón KO es el “*gold standard*” para estudiar la función biológica de un gen; las vías genéticas están lo suficientemente conservadas entre ratón y humano, como para que la producción de ratones KO sea la mejor herramienta de que disponemos para el estudio de la función de los genes y su contribución al desarrollo de patologías humanas. Sin embargo, cuando el fenotipo es muy sutil o no se observa fenotipo aparente, raramente los datos son publicados.

En un trabajo publicado por [Miyata et al. \(2016\)](#), se seleccionaron 54 de los genes específicos de testículo más conservados en la evolución desde los primeros eucariotas hasta los humanos, y se estudió el fenotipo de ratones KO para todos ellos (algunos mutantes se generaron mediante la técnica CRISPR, otros habían sido generados previamente por otras metodologías). Se encontró que los 54 mutantes KO eran fértiles. Así, demostraron que genes altamente conservados en la evolución no eran individualmente fundamentales para la espermatogénesis o reproducción masculina. Entre estos genes, hay muchos que se creían esenciales para la fertilidad o que desarrollaban procesos críticos, como *Lyzl4*, *Spaca3*, *Spaca7*, y *Spata4*.

Otro ejemplo es el trabajo publicado por [Young et al. \(2015\)](#), en el cual se generaron ratones KO para tres genes relacionados con la familia de las dineínas (*Dnaic1*, *Wdr63* y *Ccdc63*), proteínas que forman el flagelo del espermatozoide en mamíferos. Si bien se esperaba que los tres KO fueran infértiles, los dos primeros no presentaron fenotipo y fueron fértiles. Sólo para el KO del gen *Ccdc63* se observó un fenotipo, en el cual los flagelos eran más cortos que en los ratones WT. Del mismo modo, SMCL1, una proteína específica de meiosis y esencial para la formación del cuerpo denso (una estructura típicamente meiótica), ha demostrado sin embargo ser prescindible para la fertilidad, ya que los ratones KO son fértiles ([Papanikos et al., 2016](#)).

En muchos de los casos en que no se detecta un fenotipo, posiblemente ello se deba a que se evalúan únicamente aspectos notorios como por ejemplo si los ratones KO son

fértiles o no, y no se efectúan análisis más detallados en busca de la eventual presencia de fenotipos más sutiles. Un ejemplo ilustrativo de ello es el caso de *Pkdrej*, un gen miembro de la familia de la policistina-1, cuyos ratones KO resultaron fértiles y no mostraron ningún fenotipo evidente en relación a peso y morfología testicular, conteo, morfología y motilidad espermática, tamaño de camada, etc. Sin embargo, un estudio detallado mostró que los machos KO presentaban una desventaja comparativa al competir contra machos WT, dado que eran más lentos que aquellos en el desarrollo de la reacción acrosómica (Sutton *et al.*, 2008). Es razonable suponer que la mayoría de los fenotipos sutiles como éste seguramente pasa desapercibida, y la conclusión es ausencia de fenotipo detectable.

Las posibles causas de ausencia de fenotipo, o presencia de fenotipos sutiles, son:

- Posible redundancia de función. La reproducción es la “función maestra”, y por lo tanto es probable que existan genes redundantes para una misma función, de modo de asegurar que la función se pueda cumplir satisfactoriamente (Miyata *et al.*, 2016). Por ejemplo, CAPN11 (calpaina) es una proteasa dependiente de calcio expresada predominantemente en los testículos, y juega un papel en la reacción acrosómica (Ben-Aharon *et al.*, 2005). Sin embargo, el ratón KO *Capn11* es fértil debido a que existen al menos dos proteasas parálogas que complementan el trabajo de CAPN11 en el acrosoma (CAPN1 y CAPN2). Otro ejemplo son los miembros de la familia de las glicósido-hidrolasas *Lyz1*, *Lyz4* y *Lyz6*. Los KO de estos genes son fértiles porque los tres genes se compensan entre sí (Sun *et al.*, 2011); esto brinda una explicación acerca de por qué el bloqueo de *Lyz4* en el trabajo de Miyata *et al.* (2016) mencionado más arriba, no mostró fenotipo. Este mismo ejemplo aplica para *Ubqln3* y *Ubqln1*, cuyos productos se encargan de marcar proteínas para degradación mediante ubiquitinación por el proteosoma. Para resolver este problema, habría que bloquear todos los genes parálogos para eliminar las chances de compensación.

- Dependencia de las condiciones ambientales. Es sabido que la capacidad reproductora es altamente sensible a los cambios ambientales. Tal vez algunos genes podrían no ser indispensables en las condiciones de laboratorio, donde los ratones son mantenidos en condiciones ideales de temperatura estable, alimentos y agua ad libitum, y ausencia de predadores. Sin embargo, es posible que en condiciones salvajes, en que los individuos están sometidos a un estrés mucho mayor, pudiera requerirse de un mayor número de genes para la misma función.

- Efecto combinado con otros genes. Cada vez más se habla de que la infertilidad en muchos casos sería una enfermedad poligénica (e.g. Massart *et al.*, 2012; Bilgin y Kovanci, 2015), o una combinación de factores genéticos y ambientales (Massart *et al.*, 2012). Por lo tanto, una mutación en un único gen, que es lo que habitualmente se realiza al producir ratones KO, podría no producir fenotipo. Sin embargo, su combinación con otras mutaciones preexistentes, o con determinadas condiciones ambientales, podría desencadenar un fenotipo detectable. Esto último estaría relacionado con lo mencionado anteriormente, ya que quizá un ratón crecido en condiciones controladas podría no desarrollar fenotipo (o desarrollar un fenotipo sutil), y en ciertas condiciones ambientales sí.

En algunos casos se ha visto que el fenotipo no se desarrolla hasta avanzada la edad del animal, de modo que en los juveniles no se detecta fenotipo pero a medida que avanza la edad, sí. Por ejemplo, en ratones KO para el gen de la proteína reguladora mCd59b, los animales fueron totalmente fértiles hasta los cinco meses de edad, en que comenzaron a sufrir pérdida progresiva de fertilidad y disminución en el conteo de espermatozoides (Qin *et al.*, 2003). Otro ejemplo en este sentido es el de mutantes sobre-expresantes para la vía Wnt, con expresión constitutiva de β -catenina en células de línea germinal: analizados a las 5 semanas de edad no se encontraron diferencias entre los testículos de los ratones WT y KO; a medida que avanzaba la edad comenzaba a observarse pérdida progresiva de células germinales en algunos túbulos mutantes, acompañada de una pérdida progresiva de peso testicular en los ratones mutantes. A las 75 semanas de edad, los testículos eran notoriamente más pequeños que los de los animales WT, y más del 40% de los túbulos seminíferos estaban desprovistos de células germinales (Kumar *et al.*, 2016).

En nuestro caso, los ratones KO tanto machos como hembras fueron fértiles y produjeron un número de crías similar al de los ratones control, lo que indicaría que el gen *Spats1*, al menos por sí solo, no es imprescindible para la reproducción en ninguno de los dos sexos.

En cambio, en los ratones KO de un año sí notamos una disminución importante en el número de espermatozoides con respecto a los ratones WT, si bien la fertilidad no se vio afectada de forma evidente. Esto tampoco es demasiado sorprendente, dado que existe algún reporte previo de mutaciones que producen disminución en el conteo de espermatozoides sin afectación del tamaño de camada (Wichman *et al.*, 2017). De todos modos, y en función de lo mencionado más arriba, podemos suponer que es posible que en condiciones salvajes, o en combinación con otras mutaciones o con determinadas

condiciones ambientales, la afectación del gen *Spats1* podría mostrar un impacto sobre la fertilidad, especialmente a medida que los ratones envejecen. En ese sentido, se ha visto que en los individuos de mayor edad, la alteración que suele ocurrir en la estructura de los túbulos seminíferos va usualmente acompañada de una disminución en la fertilidad (Wang *et al.*, 1993; Paul y Robaire, 2013).

La idea de que SPATS1 podría tener un rol en la fertilidad masculina humana, está apoyada por un par de trabajos de otros grupos. En uno de dichos trabajos, un estudio de microarreglos mostró una disminución de al menos 5 veces en los niveles de expresión de *Spats1* en biopsias humanas de pacientes con azoospermia no obstructiva que presentaban arresto severo de la espermatogénesis (en sus etapas tempranas), en comparación con pacientes control con espermatogénesis completa o cuya espermatogénesis estaba detenida en sus etapas finales (Malcher *et al.*, 2013). El otro trabajo consistió en un estudio de GWAS (*Genome-wide association study*), en el que se identificó un polimorfismo nucleotídico (SNP) en las proximidades de *Spats1*, y se lo señaló como posible marcador de baja calidad espermática en toros (Hering *et al.*, 2014).

Un aspecto a tener en cuenta es la existencia de diferencias intrínsecas entre especies. Si bien por razones obvias el ratón ha sido la especie modelo por excelencia para la generación de animales KO, los ratones son mucho más fértiles que los humanos. Como mencionamos anteriormente, la OMS da como valores de referencia para muestras normales de semen humano la existencia de al menos un 40% de espermatozoides móviles (motilidad progresiva + motilidad no progresiva), o al menos un 32% de espermatozoides con motilidad progresiva (NICE, 2013) y, de hecho, en los espermogramas de pacientes normales típicamente suelen encontrarse gran cantidad de espermatozoides con aspecto/motilidad anómalos. Si bien no hemos encontrado valores de referencia para ratón, basta una observación microscópica para comprobar que en los ratones normales la mayoría de los espermatozoides presenta aspecto normal. En consecuencia, podría haber una diferencia en cómo una mutación en un gen impacte en ambas especies, y tal vez mutaciones cuyo efecto fuera sutil en ratones, podrían tener un efecto más severo en humanos. Más aún, la presencia en ratones KO de un fenotipo menos severo que en humanos eventualmente se ha percibido también para otro tipo de patologías, no reproductivas, y se ha relacionado con el menor tiempo de vida del ratón, que en ciertos casos podría no ser suficiente para que se manifestaran todos los síntomas clínicos observados en humanos (Rivera y Tessarollo, 2008).

2.C. SPATS1, desarrollo de tumores y vía Wnt

De los dos ratones KO que se dejaron llegar al año de edad, uno de ellos desarrolló un tumor comprendiendo la zona del escroto y el perineo. Dicho tumor presentó ulceraciones, y se acompañó de alopecia en toda la región circundante al tumor. Obviamente, no podemos sacar conclusiones a partir de un solo caso. Sin embargo, la cepa de ratones utilizada no suele desarrollar tumores (Rivera y Tassarollo, 2008; <https://www.research.uky.edu/dlar/documents/CommonMouseResearchModels.pdf>), y el personal de los bioterios tanto del IPMont como del Instituto de Higiene (Facultad de Química, UDELAR) nos informó que nunca ha registrado un tumor en un roedor de laboratorio (ratones CD1 Swiss o C57BL, ratas Sprague-Dawley), ni aún en individuos envejecidos. Además, el animal en cuestión no presentó alteraciones ni desarrolló tumores evidentes en ninguna otra zona de su organismo, salvo el tumor mencionado.

El estudio de anatomía patológica del tumor indicó que se trataba de un teratoma, es decir, un tumor originado en células de la línea germinal. En particular, los teratomas suelen ser tumores muy raros, tanto en roedores de especies domésticas como de laboratorio, con la excepción de lo ocurrido en algunas sub-líneas de ratón de la cepa endocriada 129, que de por sí son susceptibles al desarrollo de tumores (Sündstrom *et al.*, 1999). Los únicos casos documentados que hemos encontrado en la literatura de teratomas o teratocarcinomas testiculares espontáneos en roedores no llegan a media docena, y ninguno de ellos en la cepa C57BL (Jamadagni *et al.*, 2013). Existe un único reporte de un teratoma perineal en un gato (Ober *et al.*, 2013), y los teratomas retrorectales son también muy raros en humanos (Boscà *et al.*, 2012).

Resulta interesante que un estudio de secuenciación de exoma de muestras de seminomas (cánceres de testículo originados en el epitelio germinal) humanos identificó una mutación en *Spats1*, entre otras mutaciones presentes en este tipo de tumores (Cutcutache *et al.*, 2015), si bien se trató de seminomas, y no de teratomas.

De todos modos, el hecho de que los tumores en la cepa de ratones utilizada sean tan raros (sumado a lo inusual de la aparición de teratomas en forma espontánea), que el ratón no desarrolló ningún otro tumor evidente en ninguna otra parte del organismo, y que existe un reporte en humanos sugiriendo una relación entre la inactivación de *Spats1* y el desarrollo de tumores (aunque en ese caso se tratara de seminomas), nos permite sospechar que el tumor desarrollado por el ratón KO podría estar relacionado con la inactivación de *Spats1*. Actualmente estamos dejando llegar más ratones WT y KO al año de edad para

evaluar esta hipótesis, y ver si la aparición de tumores se repite y confirma. Por otra parte, si la inactivación de *Spats1* efectivamente estuviera vinculada con el desarrollo del tumor, no se trataría del primer caso en que la alteración de un gen vinculado a adhesión celular produjera este efecto: ya hemos mencionado más arriba el desarrollo de tumores por parte de ratones KO para un miembro de las cadherinas (Yamada *et al.*, 2006). Otro ejemplo estaría dado por la sobreexpresión de la β -catenina (ver a continuación).

Como se mencionó en la Introducción, un trabajo ha asociado a SPATS1 con la vía Wnt/ β -catenina (Zhang *et al.*; 2010). Según este trabajo, SPATS1 sería un represor de la vía Wnt, una vía que normalmente debe estar muy finamente regulada en el testículo. La vía Wnt está relacionada con la actividad del proteosoma, y también se ha descrito que alteraciones en ratones en varios de los genes relacionados a esta vía causan susceptibilidad a tumores en colon, ovario y testículo (Zhan *et al.*, 2017).

Con respecto al testículo en particular, ratones mutantes sobreexpresantes para varios de los genes de la vía Wnt/ β -catenina han producido fenotipos con problemas en el desarrollo testicular y procesos tumorales, habiéndose reportado tumores de células de Sertoli (*e.g.* Chang *et al.*, 2009; Tanwar *et al.*, 2012) y otros tumores testiculares (Boyer *et al.*, 2008). Sin embargo, en un trabajo reciente no se pudo comprobar activación de la vía Wnt/ β -catenina en el desarrollo de seminomas (Fernando *et al.*, 2016), por lo que se requerirán aún más investigaciones en este sentido.

En la mayor parte de los estudios, la afectación de la vía Wnt se logra mediante la estabilización de la β -catenina. La estabilización de la β -catenina permitiría que ésta se acumule en el citoplasma hasta niveles muy elevados, logrando así translocarse al núcleo e inducir la activación transcripcional de genes blanco de la vía Wnt (ver Introducción), varios de los cuales son oncogenes (*c-Myc*, ciclina D1, entre otros) (Zhang *et al.*, 2010). En ese sentido, Kumar *et al.* (2016) mostraron que en los testículos de ratones mutantes que sobreexpresaban β -catenina específicamente en la línea germinal, se detectaba un incremento significativo en el número de espermatogonias positivas por túbulo para las proteínas TCF1, LF1 y ciclina D1 (*Ccnd1*), correspondientes a productos de genes blanco de la vía Wnt. Del mismo modo, en mutantes sobreexpresantes para β -catenina, Chassot *et al.* (2016) mediante qRT-PCR observaron un aumento en los niveles del ARNm de *Lef-1* (también gen blanco de la vía Wnt), y en el número de espermatogonias ciclina D1-positivas (la ciclina D1 normalmente se expresa en espermatogonias en proliferación) a los 2-3 dpp.

En este esquema, si SPATS1 desempeñara en el testículo un rol semejante al descrito en cultivo de células heterólogas por Zhang y colaboradores, podría participar como inhibidor de la vía Wnt. SPATS1 secuestraría a la proteína DVL2 (necesaria en el citoplasma para que la β -catenina no sea degradada por el proteosoma, y aparentemente también en el núcleo como co-activador/estabilizador del complejo TCF4/ β -catenina), impidiendo la estabilización de la β -catenina. Por lo tanto, en los ratones KO, la ausencia de SPATS1 podría provocar una estabilización y por ende un aumento en los niveles de β -catenina en el testículo, como para que ésta fuera translocada al núcleo, e indujera la expresión de los genes blanco de la vía Wnt. A su vez, en el núcleo la ausencia de SPATS1 contribuiría a estabilizar el complejo TCF4/ β -catenina, lo que también redundaría en la expresión de los genes blanco (Figura V.2). Supongamos que SPATS1 es, efectivamente, un represor de la vía Wnt específico del testículo. ¿Cómo podríamos entonces imaginar una vinculación entre la eventual alteración de la vía Wnt en los ratones KO, y el desarrollo de tumores? La eventual relación surge de manera natural, si tenemos en cuenta que varios de los genes blanco de la vía Wnt son potentes oncogenes (Liao *et al.*, 2007; Takahashi *et al.*, 2007).

Los resultados de los trabajos analizados nos llevaron a evaluar los niveles de expresión de genes blanco de la vía Wnt en los ratones KO *Spats1*, en comparación con ratones WT. En un estudio preliminar comparando ARN de testículo total de los ratones KO vs WT de 55 dpp y 1 año de edad, nosotros no encontramos diferencias en los niveles de transcripción de estos genes blanco de la vía Wnt. De todas formas, dado que en los trabajos mencionados anteriormente las diferencias se observaron únicamente en las espermatogonias, y que además no se trató de un aumento muy notable, es esperable que dichos cambios de expresión pudieran no detectarse por qRT-PCR a partir de ARN de testículo total, ya que si el cambio ocurriera sólo en las espermatogonias, se vería diluido entre la totalidad de los tipos celulares del testículo. Nos proponemos evaluar los niveles de expresión de los genes blanco de la vía Wnt en poblaciones celulares purificadas de testículo de los ratones KO *Spats1*, las que serán obtenidas mediante citometría de flujo, e incluso posiblemente a partir de ratones de diferentes edades.

Se ha propuesto que en los testículos susceptibles a teratomas, podría darse la expresión aberrante de señales restringidas al desarrollo del ovario. Una hipótesis alternativa es que los testículos susceptibles a teratomas carecerían de ciertas señales normalmente activas en los testículos, pero ausentes en el ovario (Lanza *et al.*, 2016). Si así fuera, *Spats1* podría estar comprendido en este último caso ya que, como hemos visto

(Capoano *et al.*, 2010), su expresión no se detecta en el ovario. Resulta muy atractivo imaginar que *Spats1* pudiera ser uno de los genes participantes en ese mutuo antagonismo entre las vías de desarrollo hacia ovario y testículo, pero aún falta efectuar muchos estudios en ese sentido. El disponer de un ratón KO para este gen sin duda nos proporciona una herramienta de gran ayuda.

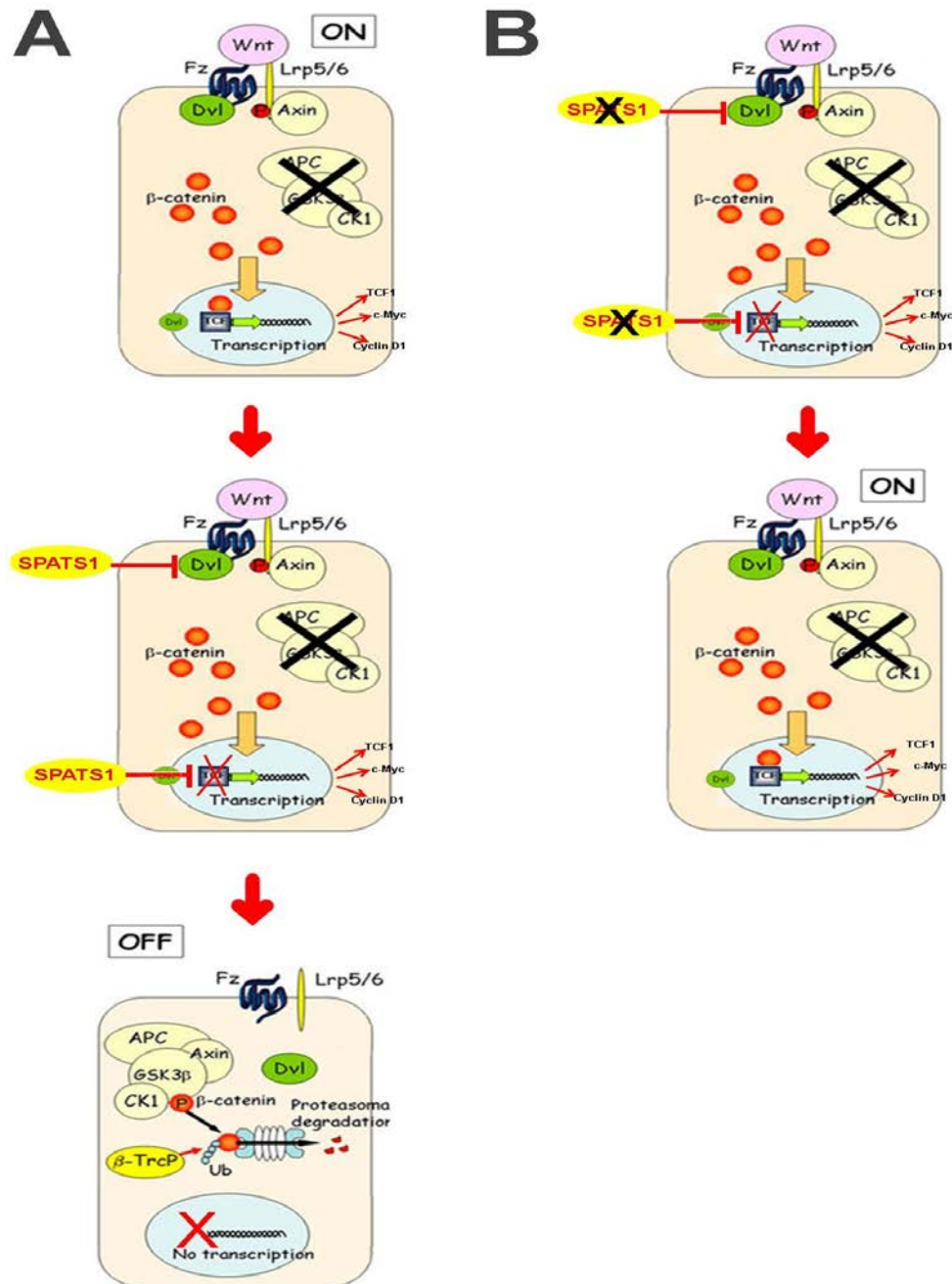


Figura V.2. Modelo sobre la acción propuesta de SPATS1 en la vía canónica Wnt. **A.** Esquematación de lo que ocurriría normalmente, si lo propuesto por *Zhang et al.* (2010), fuera cierto: en presencia de SPATS1, los niveles de β-catenina serían bajos ya que ésta sería degradada en el citoplasma, no acumulándose lo suficiente como para translocar al núcleo, y TCF4 sería degradado. Por lo tanto, los genes blanco de vía Wnt dejarían de expresarse, o sus niveles de expresión disminuirían. **B.** Se muestra lo que suponemos que podría ocurrir al no estar SPATS1 activa: β-catenina no se degradaría y entraría al núcleo, TCF4 no se degradaría, y los genes blanco de la vía se transcribirían activamente.

VI. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

El ratón mutante *Spats1*, obtenido en este proyecto, es el primer ratón KO obtenido en el Uruguay, y fue producido mediante la revolucionaria tecnología de CRISPR/Cas9. Este método presenta muchas ventajas ya que no requiere pasos de clonación ni construcción de vectores. Produce un altísimo número de animales genéticamente modificados en cada experimento, con una eficiencia del 15 al 20% de los embriones microinyectados, lo que reduce además la cantidad de animales requeridos para generar embriones, así como de hembras nodrizas y hembras necesarias para los cruces, además de reducir el número de experimentos de forma muy significativa.

Los resultados de los análisis de minería de datos nos dicen que el gen *Spats1* y la estructura de su proteína, con hojas desplegadas (no globular), están altamente conservadas en la evolución desde los cordados primitivos hasta los mamíferos. En conjunto, los estudios de interacción proteica predicha, sumados a los ensayos de co-inmunoprecipitación que hemos realizado, nos permiten sugerir que SPATS1 interaccionaría con la actina.

La ausencia de SPATS1 no genera defectos en el desarrollo embrionario del ratón, incluso en el testículo, y los ratones mutantes son fértiles. Sin embargo, los acúmulos de células observados en la luz de los túbulos seminíferos de los ratones KO y los desprendimientos de tejido, nos permiten suponer que SPATS1 tendría un rol en el mantenimiento de la estructura interna del túbulo, más precisamente en la adhesión celular.

El fenotipo observado, que se asemeja de manera notable al reportado para los testículos de ratones mutantes para proteínas vinculadas a adhesión celular, estaría también de acuerdo con la probable interacción de SPATS1 con proteínas involucradas en las uniones celulares, en las cuales la actina posee un rol protagónico. Los estudios de expresión génica mostraron que se alteró a la baja la expresión del gen de claudina 11, proteína asociada a las uniones intercelulares estrechas; si bien esta disminución fue moderada, resultó significativa. Este resultado se correlaciona notablemente con los acúmulos y desprendimientos de células observados en los cortes histológicos de los ratones KO. Por tanto, creemos que SPATS1 tendría un rol estructural en el mantenimiento de las células espermatogénicas adheridas a las células de Sertoli, más que un rol vinculado al proceso de espermatogénesis en sí.

En los ratones mutantes de mayor edad se registró una importante disminución en la cantidad de espermatozoides con respecto a los ratones control, si bien ello no impactó sobre la fertilidad. No obstante, no podemos descartar que dicha disminución en el conteo espermático pudiera tener consecuencias en cuanto a la afectación de la capacidad

reproductiva de estos ratones en condiciones ambientales más desfavorables, o en conjunto con posibles alteraciones en otros genes, o en otras especies como el hombre.

Por otra parte, uno de los ratones mutantes desarrolló un teratoma a edad avanzada. Sería demasiado prematuro pretender vincular la alteración de *Spats1* con el desarrollo de este tumor. No obstante, dado que la aparición de estos tumores es sumamente infrecuente, y que se trata precisamente de un tumor de células germinales, este resultado nos alienta a seguir investigando en este sentido.

Si bien existe un reporte que relaciona a SPATS1 con la vía Wnt, no hemos podido detectar en el ratón KO alteraciones en la expresión de los genes blanco de esta vía. Sin embargo, somos conscientes de que los estudios se realizaron partiendo de ARN de testículo total y únicamente a ciertas edades, por lo cual deberemos realizar estudios más detallados que nos permitan sacar conclusiones definitivas al respecto.

Con respecto a las perspectivas, nos proponemos:

- Dejar llegar mayor número de individuos macho KO y WT al año de edad, de modo de observar si los ratones KO desarrollan tumores (¿teratomas u otros?), y si así fuera, evaluar la incidencia de ocurrencia de los mismos.

- Profundizar los análisis de expresión de genes blanco de la vía Wnt en los ratones KO en comparación con individuos WT, utilizando para ello poblaciones celulares de testículo aisladas mediante citometría de flujo, metodología para la cual existe vasta experiencia en nuestro grupo de trabajo. Se podrán realizar los estudios empleando poblaciones puras 2C en contenido de ADN, 4C y C. Eventualmente también se podrán realizar los estudios de expresión en individuos de distintas edades (por ejemplo, embriones).

- Realizar ensayos de inmunohistoquímica en cortes de testículo de ratón, de modo de evaluar si SPATS1 colocaliza con actina, empleando faloidina en paralelo con el anticuerpo anti-SPATS1. Estos estudios nos permitirán eventualmente confirmar los resultados de las inmunoprecipitaciones y los dobles híbridos de levadura. Se podrán efectuar también ensayos de colocalización de SPATS1 con proteínas de adhesión celular (ej. cadherinas, cateninas). Estos estudios podrían darnos una idea acerca de si SPATS1 es un componente de las placas de adhesión en el testículo. Disponemos de un nuevo microscopio confocal Zeiss LSM 800 equipado con módulo Airyscan, que permite muy alta resolución, y que será de gran utilidad para estos estudios.

- Efectuar estudios de transcriptómica de los testículos de ratones KO vs WT. Contamos con los ARNs aislados de ratones WT y KO de 55 dpp en muestras por triplicado, y de los ratones WT y KO de 1 año de edad por duplicado. Dichas muestras se encuentran conservadas a -80°C. Faltaría obtener una muestra más de individuos KO y WT de 1 año para disponer de triplicados. Alternativamente, aunque más trabajoso, podrían hacerse estudios de transcriptómica en poblaciones celulares aisladas de estadios espermatogénicos en particular, los que deberían purificarse a partir de ratones KO y WT mediante citometría de flujo.

- Finalmente, nos gustaría analizar si existen mutaciones (y en tal caso, su incidencia) en el gen *SPATS1* en pacientes humanos infértiles y/o con tumores de testículo. Estos estudios podrían realizarse a partir de biopsias de pacientes con dichas patologías y su comparación con biopsias de pacientes control (ej.: pacientes con azoospermia obstructiva), secuenciando los exones del gen *SPATS1* en ambos casos.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abu-Halima M, Backes C, Leidinger P, Keller A, Lubbad A, Hammadeh M. "MicroRNA expression profiles in human testicular tissues of infertile men with different histopathologic patterns". *Fertil Steril*. 2014; 101:78-86.
- Aivatiadou E, Mattei E, Ceriani M, Tilia L, Berruti G. "Impaired fertility and spermiogenetic disorders with loss of cell adhesion in male mice expressing an interfering *Rap1* mutant". *Molec Biol Cell*. 2007; 18:1530-1542.
- Alsheimer M, Baier A, Schramm S, Schütz W, Benavente R. "Synaptonemal complex protein SYCP3 exists in two isoforms showing different conservation in mammalian evolution". *Cytogenet Genome Res*. 2010; 128:162-168.
- Amann R, Waberski D. "Computer-assisted sperm analysis (CASA): capabilities and potential developments". *Theriogenology*. 2014; 81:5-17.
- Aston KI, Krausz C, Laface I, Ruiz-Castané E, Carrell D. "Evaluation of 172 candidate polymorphisms for association with oligozoospermia or azoospermia in a large cohort of men of European descent". *Hum Reprod*. 2010; 25:1383-1397.
- Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, Richards M, Boyaval P, Moineau S, Romero DA, Horvath P. "CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes". *Science*. 2007; 315:1709-1712.
- Bassett AR, Tibbit C, Ponting CP, Liu JL. "Highly efficient targeted mutagenesis of *Drosophila* with the CRISPR/Cas9 system". *Cell Rep*. 2013; 4:220-228.
- Bellvé A, Cavicchia J, Millette C, O'Brien D, Bhatnagar Y, Dym M. "Spermatogenic cells of the prepubertal mouse. Isolation and morphological characterization". *J Cell Biol*. 1977; 74:68-85.
- Bellver Capella V. "Crispr-Cas9 gene editing revolution and its ethical and legal challenges". *Cuad Bioet*. 2016; 27:223-239.
- Ben-Aharon I, Brown PR, Etkovitz N, Eddy EM, Shalgi R. "The expression of calpain 1 and calpain 2 in spermatogenic cells and spermatozoa of the mouse". *Reproduction* 2005; 129(4):435-442.
- Bernavé A, Navarro J, Pallarés F. "Citología e Histología Veterinaria". Murcia: Universidad de Murcia. 2012; temario 31.
- Boitani C, Di Persio S, Esposito V, Vicini E. "Spermatogonial cells: mouse, monkey and man comparison". *Seminars in Cell Dev Biol*. 2016; 59:79-88.
- Bilgin E, Kovanci E. "Genetics of premature ovarian failure". *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2015; 27:167-74.
- Boscà A, Pous S, Artés MJ, Gómez F, Granero Castro P, García-Granero E. "Tumours of the retrorectal space: management and outcome of a heterogeneous group of diseases". *Colorectal Dis*. 2012; 14:1418-23.
- Boudrez A, Beullens M, Groenen P, Van Eynde A, Vulsteke V, Jagiello I, Murray M, Krainer AR, Stalmans W, Bollen M. "NIPP1-mediated interaction of protein phosphatase-1 with CDC5L, a regulator of pre-mRNA splicing and mitotic entry." *J Biol Chem*. 2000; 275:25411-25417.
- Boyer A, Hermo L, Paquet M, Robaire B, Boerboom D. "Seminiferous tubule degeneration and infertility in mice with sustained activation of WNT/CTNNB1 signaling in Sertoli cells". *Biol Reprod*. 2008; 79:475-485.
- Boyer A, Paquet M, Laguë MN, Hermo L, Boerboom D. "Dysregulation of WNT/CTNNB1 and PI3K/AKT signaling in testicular stromal cells causes granulosa cell tumor of the testis." *Carcinogenesis*. 2009; 30:869-878.
- Brembeck F, Rosário M, Birchmeier W. "Balancing cell adhesion and Wnt signaling, the key role of beta-catenin". *Curr Opin Genet Dev*. 2006; 16:51-59.

- Busby V, Goossens S, Nowotny P, Hamilton G, Smemo S, Harold D, Turic D, Jehu L, Myers A, Womick M, *et al.* "Alpha-T-catenin is expressed in human brain and interacts with the Wnt signaling pathway but is not responsible for linkage to chromosome 10 in Alzheimer's disease". *Neuromolecular Med.* 2004; 5:133-146.
- Cabrera CM, López-Nevot MA, "APC e inestabilidad cromosómica en el cáncer de colon". *Rev esp enferm dig.* 2005; 97:10.
- Capoano CA, Wettstein R, Kun A, Geisinger A. "Spats1 (*Srsp1*) is differentially expressed during testis development of the rat". *Gene Expr Patt.* 2010; 10:1-8.
- Carroll D. "Genome engineering with zinc-finger nucleases". *Genetics.* 2011; 188:773-782.
- Carstea AC, Pirity MK, Dinnyes A. "Germline competence of mouse ES and iPS cell lines: Chimera technologies and genetic background". *World J Stem Cells.* 2009; 1:22-29.
- Cavallo RA, Cox RT, Moline MM, Roose J, Polevoy GA, Clevers H, Peifer M, Bejsovec A. "Drosophila Tcf and Groucho interact to repress Wingless signalling activity". *Nature.* 1998; 395:604-608.
- Chan W, Costantino N, Ruixue L, Lee S, Su Q, Melvin D, Court D, Liu P. "A recombineering based approach for high-throughput conditional knockout targeting vector construction." *Nucleic Acids Res.* 2007; 35:e64.
- Chang H, Guillou F, Taketo MM, Behringer RR. "Overactive beta-catenin signaling causes testicular sertoli cell tumor development in the mouse." *Biol Reprod.* 2009; 81:842-849.
- Chassot A., Gregoire E, Lavery R, Taketo M, de Rooij D, Adams I, Chaboissier M., "RSPO1/beta-catenin signaling pathway regulates oogonia differentiation and entry into meiosis in the mouse fetal ovary". *PLoS One.* 2011; 6:e25641.
- Chassot A, Le Rolle M, Jourden M, Taketo M, Ghyselinck N, Chaboissier M. "Constitutive WNT/CTNNB1 activation triggers spermatogonial stem cell proliferation and germ cell depletion". *Dev Biol.* 2017; 426:17-27.
- Chiriva-Internati M. "Sperm protein 17: clinical relevance of a cancer/testis antigen, from contraception to cancer immunotherapy, and beyond". *Int Rev Immunol.* 2011; 30:138-149.
- Cho SW, Kim S, Kim JM, Kim JS. "Targeted genome engineering in human cells with the Cas9 RNA-guided endonuclease". *Nat Biotechnol.* 2013; 31:230-232.
- Climer S, Templeton A, Zhang W. "Human gephyrin is encompassed within giant functional noncoding yin-yang sequences". *Nat Commun.* 2015; 6:6534.
- Combet C., Blanchet C., Geourjon C. and Deléage G. "NPS@: Network Protein Sequence Analysis". *Trends Biochem Sci.* 2000; 25:147-150.
- Cong L, Ran F, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, Hsu P, Wu X, Jiang W, Marraffini L, Zhang F. "Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems". *Science.* 2013; 339:819-823.
- Cutcutache I, Suzuki Y, Tan IB, Ramgopal S, Zhang S, Ramnarayanan K, Gan A, Lee HH, Tay ST, Ooi A, *et al.* "Exome-wide Sequencing Shows Low Mutation Rates and Identifies Novel Mutated Genes in Seminomas." *Eur Urol.* 2015; 68:77-83.
- 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;* 2016; 17:294.
- Dabaja A, Schlegel P. "Medical treatment of male infertility". *Transl Androl Urol.* 2014; 3:9-16.

- Delorenzi M, Speed T. "An HMM model for coiled-coil domains and a comparison with PSSM-based predictions". *Bioinformatics*. 2002; 18:617-625.
- DiCarlo JE, Norville JE, Mali P, Rios X, Aach J, Church GM. "Genome engineering in *Saccharomyces cerevisiae* using CRISPR-Cas systems". *Nucleic Acids Res*. 2013; 41:4336-4343.
- Domínguez A, Tamayo M, Pérez I, Salas H, Pérez O, Batista A. "Cytotoxic and genotoxic evaluation of the adjuvant AFCo1 by the sperm head morphology assay in NMRI mice". *Vaccinmonitor*. 18:13-17.
- Dominguez R. "Actin-binding proteins--a unifying hypothesis". *Trends Biochem Sci*. 2004 ; 29:572-578.
- Du L, Qian X, Dai C, Wang L, Huang D, Wang S, Shen X. "Screening the molecular targets of ovarian cancer based on bioinformatics analysis". *Tumori*. 2015; 101:384-389.
- Erickson RP. "Post-meiotic gene expression". *Trends Genet*. 1990; 6:264-268.
- Esvelt KM, Mali P, Braff JL, Moosburner M, Yaung SJ, Church GM "Orthogonal Cas9 proteins for RNA-guided gene regulation and editing". *Nat Methods*. 2013; 10:1116-1121.
- Fariselli P, Molinini D, Casadio R, Krogh A. "Prediction of Structurally-Determined Coiled-Coil Domains with Hidden Markov Models". *Lect Notes Comp Sci*. 2007; 4414:292-302.
- Feig C, Kirchhoff C, Ivell R, Naether O, Schulze W, Spiess AN. "A new paradigm for profiling testicular gene expression during normal and disturbed human spermatogenesis". *Hum Mol Reprod*. 2007; 13:33-43.
- Fernando G, Paul F, Laura J, Alejandra AM, Gabriela M, Alberto PL. "Is the Wnt/ β catenin signalling pathway activated in Seminoma?: An immunohistochemical study." *J Cancer Res Ther*. 2016; 12:1075-1079.
- Fineran PC, Charpentier E. "Memory of viral infections by CRISPR-Cas adaptive immune systems: acquisition of new information". *Virology*. 2012; 434:202–209.
- Francis S, Yelumalai S, Jones C, Coward K. "Aberrant protamine content in sperm and consequential implications for infertility treatment". *Hum Fertil. (Camb)*. 2014; 17:80-89.
- Fraune J, Schramm S, Alsheimer M, Benavente R. "The mammalian synaptonemal complex: protein components, assembly and role in meiotic recombination". *Exp Cell Res*. 2012; 318:1340-1346.
- Ganesh K, Adam S, Taylor B, Simpson P, Rada C, Neuberger M. "CTNBL1 is a novel nuclear localization sequence-binding protein that recognizes RNA-splicing factors CDC5L and Prp31." *J Biol Chem*. 2011; 286:17091-17102.
- Gao C, Chen YG. "Disvelled: the hub of Wnt signaling". *Cell Signal*. 2010; 22:717-727
- Gasiunas G, Barrangou R, Horvath P, Siksnys V. "Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria". *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012; 109:E2579–2586.
- Gázquez C, Oriola J, de Mateo S, Vidal-Taboada J, Balleascà J, Oliva R. "A common protamine 1 promoter polymorphism (-190 C->A) correlates with abnormal sperm morphology and increased protamine P1/P2 ratio in infertile patients". *J Androl*. 2008; 29:540-548.
- Geisinger A, Dos Santos A, Wettstein R y Benavente R. "Identification and characterization of *Srsp1*, a rat gene differentially expressed during spermatogenesis and coding for a serine stretch containing protein". *Cytogenet Genome Res*. 2002; 98:249-254.
- Geisinger A, Rodríguez-Casuriaga. "Flow cytometry for the isolation and characterization of rodent meiocytes". *Methods Mol Biol*. 2017; 1471:217-230.

- Geisinger A, Wettstein R, Benavente R. "Stage-specific gene expression during rat spermatogenesis: application of the mRNA differential display method". *Int J Dev Biol.* 1996; 40:385-388.
- Geisinger A. "Expresión génica diferencial durante la espermatogénesis de la rata". Tesis de Doctorado. Montevideo: PEDECIBA (UDELAR). 2003; 148p.
- Geisinger A. "Spermatogenesis in mammals: a very peculiar cell differentiation process". *In: Cell Differentiation Research Developments* (Ed: LB Ivanova), New York: Nova Publishers. 2008; pp. 97-123.
- Handel MA, Schimenti JC. "Genetics of mammalian meiosis: regulation, dynamics and impact on fertility". *Nat Rev Genet.* 2010; 11:124-136.
- Hann MC, Lau PE, Tempest HG. "Meiotic recombination and male infertility: from basic science to clinical reality?" *Asian J Androl.* 2011; 13:212-218.
- He MX, He YW. "CFLAR/c-FLIPL". *Autophagy.* 2013; 9:791-793.
- Hering DM, Olenski K, Kaminski S. "Genome-wide association study for poor sperm motility in Holstein-Friesian bulls." *Anim Reprod Sci.* 2014; 146:89-97.
- Hermo L, Pelletier RM, Cyr DG, Smith CE. "Surfing the wave, cycle, life history, and genes/proteins expressed by testicular germ cells. Part 1: background to spermatogenesis, spermatogonia, and spermatocytes". *Microsc Res Tech.* 2010; 73:241-278.
- Horii T, Morita S, Kimura M, Kobayashi R, Tamura D, Takahashi RU, Kimura H, Suetake I, Ohata H, Okamoto K, et al. "Genome engineering of mammalian haploid embryonic stem cells using the Cas9/RNA system". *Peer J.* 2013; 1:e230.
- Horvath P, Barrangou R. "CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea". *Science.* 2010; 327:167-170.
- Hou Z, Zhang Y, Propson NE, Howden SE, Chu LF, Sontheimer EJ, Thomson JA. "Efficient genome engineering in human pluripotent stem cells using Cas9 from *Neisseria meningitides*". *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013; 110:15644-15649.
- Howitt B, Berney D. "Tumors of the testis: morphologic features and molecular alterations". *Surg Pathol Clin.* 2015; 8:687-716.
- Hrckulak D, Kolar M, Strnad H, Korinek V. "TCF/LEF transcription factors: an update from the Internet resources". *Cancers (Basel).* 2016; 8:p11: E70.
- Hug N, Longman D, Cáceres J. "Mechanism and regulation of the nonsense-mediated decay pathway". *Nucleic Acids Res.* 2016; 44:1483-1495.
- Hurlstone A, Clevers H. "T-cell factors: turn-ons and turn-offs". *EMBO J.* 2002; 21:2303-2311.
- Hwang W, Fu Y, Reyon D, Maeder M, Tsai S, Sander J, Peterson R, Yeh J, Joung J. "Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system". *Nat Biotechnol.* 2013; 31:227-229.
- Idrees M, Ulbright T, Oliva E, Young R, Montironi R, Egevad L, Berney D, Srigley J, Epstein J, Tickoo S;. "The World Health Organization 2016 classification of testicular non-germ cell tumours: a review and update from the International Society of Urological Pathology Testis Consultation Panel". *Histopathology.* 2017; 70:513-521.
- Jamadagni S, Jamadagni P, Lacy S, Williams B, Upadhyay S, Gaidhani S, Hazra J. "Spontaneous nonmetastatic choriocarcinoma, yolk sac carcinoma, embryonal carcinoma, and teratoma in the testes of a swiss albino mouse". *Toxicol Pathol.* 2013; 41:532-536.

- Janssens B, Goossens S, Staes K, Gilbert B, van Hengel J, Colpaert C, Bruyneel E, Mareel M, van Roy F. "Alpha T-catenin: a novel tissue-specific beta-catenin-binding protein mediating strong cell-cell adhesion". *J Cell Sci.* 2001; 114:3177-3188.
- Jao LE, Wente SR, Chen W. "Efficient multiplex biallelic zebrafish genome editing using a CRISPR nuclease system". *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013; 110:13904–13909.
- Ji AX, Chu A, Nielsen T, Benlekbir S, Rubinstein J, Privé G. "Structural insights into KCTD protein assembly and cullin 3 recognition". *J Mol Biol.* 2016; 428:92-107.
- Jiang W, Bikard D, Cox D, Zhang F, Marraffini LA. "RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems." *Nat Biotechnol.* 2013; 31:233–239.
- Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. "A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity". *Science.* 2012; 337:816–821.
- Jinek M, East A, Cheng A, Lin S, Ma E, Doudna J. "RNA-programmed genome editing in human cells". *Elife.* 2013; 2:e00471.
- Kitamura A, Miyauchi N, Hamada H, Hiura H, Chiba H, Okae H "Epigenetic alterations in sperm associated with male infertility". *Congenit Anom. (Kyoto).* 2015; 55:133-144.
- Kleene K. "Patterns, mechanisms and functions of translation regulation in mammalian spermatogenic cells". *Cytogenet Genome Res.* 2003; 103:217-224.
- Kumar M, Atkins J, Cairns M, Ali A, Tanwar P. "Germ cell-specific sustained activation of Wnt signalling perturbs spermatogenesis in aged mice, possibly through non-coding RNAs". *Oncotarget.* 2016; 7:85709-85727.
- Kumeta M., Gilmore J.L., Umeshima H., Ishikawa M., Kitajiri S., Horigome T., Kengaku M., Takeyasu K. "Caprice/MISP is a novel F-actin bundling protein critical for actin-based cytoskeletal reorganizations". *Genes Cells.* 2014; 19:338-349.
- Lanza DG, Dawson EP, Rao P, Heaney JD. "Misexpression of cyclin D1 in embryonic germ cells promotes testicular teratoma initiation." *Cell Cycle.* 2016; 15:919-930.
- Li D, Qiu Z, Shao Y, Chen Y, Guan Y, Liu M, Li Y, Gao N, Wang L, Lu X, Zhao Y, Liu M. "Heritable gene targeting in the mouse and rat using a CRISPR-Cas system". *Nat Biotechnol.* 2013; 31:681-683.
- Li J, Norville JE, Aach J, McCormack M, Zhang D, Bush J, Church GM, Sheen J. "Multiplex and homologous recombination-mediated genome editing in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana* using guide RNA and Cas9". *Nat Biotechnol.* 2013; 31:688–691.
- Li W, Teng F, Li T, Zhou Q. "Simultaneous generation and germline transmission of multiple gene mutations in rat using CRISPR-Cas systems." *Nat Biotechnol.* 2013; 31:684–686.
- Liao DJ, Thakur A, Wu J, Biliran H, Sarkar FH. "Perspectives on c-Myc, Cyclin D1, and their interaction in cancer formation, progression, and response to chemotherapy". *Crit Rev Oncog.* 2007; 13:93-158.
- Liu P, Jenkins NA, Copeland NG. "A highly efficient recombineering-based method for generating conditional knockout mutations." *Genome Res.* 2003; 13:476-484.
- Malcher A, Rozwadowska N, Stokowy T, Kolanowski T, Jedrzejczak P, Zietkowiak W, Kurpisz M. "Potential biomarkers of nonobstructive azoospermia identified in microarray gene expression analysis". *Fertil Steril.* 2013; 100:7.

- Mali P, Yang L, Esvelt KM, Aach J, Guell M, DiCarlo JE, Norville JE, Church GM. "RNA-guided human genome engineering via Cas9". *Science*. 2013; 339:823-826.
- Malkov M, Fisher Y, Don J. "Developmental schedule of the post natal rat testis determined by flow cytometry". *Biol. Reprod.* 1998; 59:84-92.
- Massart A, Lissens W, Tournaye H, Stiffs K. "Genetic causes of spermatogenic failure". *Asian J Androl.* 2012; 14:40-48.
- Matzuk MM, Lamb DJ (2008). "The biology of infertility: research advances and clinical challenges". *Nat Med.* 2008; 11: 1197-1213.
- Mauduit C, Florin A, Amara S, Bozec A, Siddeek B, Cunha S, Meunier, Selva LJ, Albert M, Vialard F, Bailly M, Benahmed M. "Effets à long terme des perturbateurs endocriniens environnementaux sur la fertilité masculine". *Gynecol Obstet Fertil.* 2006; 34:978-984.
- MacDonald BT, Tamai K, He X. "Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases". *Dev Cell.* 2009; 1:9-26.
- Miller J, Pearce D. "Nonsense-mediated decay in genetic disease: friend or foe?". *Mutat Res Rev Mutat Res.* 2014; 762:52-64.
- Miyata H, Castaneda J, Fujihara Y, Yu Z, Archambeault DR, Isotani A, Kiyozumi D, Kriseman M, Mashiko D, Matsumura T, *et al.* "Genome engineering uncovers 54 evolutionarily conserved and testis-enriched genes that are not required for male fertility in mice". *Proc Natl Acad Sci USA.* 2016; 113:7704-7710.
- Mortimer S. "A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals". *Human Reprod Update.* 1997; 3:403-439.
- Nabeshima K, Villeneuve A, Colaiácovo M. "Crossing over is coupled to late meiotic prophase bivalent differentiation through asymmetric disassembly of the SC". *J Cell Biol.* 2005; 168:683-689.
- Nakayama T. "Simple and efficient CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis in *Xenopus tropicalis*". *Genesis.* 2013; 51:835-43.
- Nekrasov V, Staskawicz B, Weigel D, Jones J, Kamoun S. "Targeted mutagenesis in the model plant *Nicotiana benthamiana* using Cas9 RNA-guided endonuclease". *Nat Biotechnol.* 2013; 31:691-693.
- NICE (National Collaborating Centre for Women's and Children's Health). "Fertility: Assessment and Treatment for People with Fertility Problems". London: Royal College of Obstetricians & Gynaecologists (UK); 2013.
- Nord A, Chang P, Conklin B, *et al.* "The International Gene Trap Consortium Website: a portal to all publicly available gene trap cell lines in mouse." *Nucleic Acids Res.* 2006; 34(Database issue):D642-D648.
- Ober C, Taulescu M, Oana L, Bel L, Cătoi C, Fărcas L, Pestean C. "An unusual case of a mature teratoma on the left perineal region of a young cat: surgical treatment and pathological description". *Acta Vet Scand.* 2013; 55:51.
- Pacchierotti F, Spanò M. "Environmental impact on DNA methylation in the germline: state of the art and gaps of knowledge". *Biomed Res Int.* 2015; 2015:123484.
- Page S, Hawley R. "Chromosome Choreography: The Meiotic Ballet" *Science* 2003; 301:785-789
- Papanikos F, Daniel K, Goercharn-Ramlal A, Fei JF, Kurth T, Wojtasz L, Dereli I, Fu J, Penninger J, Habermann B, *et al.* "The enigmatic meiotic dense body and its newly discovered component, SCML, are dispensable for fertility and gametogenesis in mice." *Chromosoma.* 2017; 126:399-415.

- Pattanayak, V, Lin, S, Guilinger, JP, Ma, E, Doudna, JA, Liu, DR. "High-throughput profiling of off-target DNA cleavage reveals RNA-programmed Cas9 nuclease specificity". *Nat Biotechnol.* 2013; 31:839-843.
- Paul C, Robaire B. "Impaired function of the blood-testis barrier during aging is preceded by a decline in cell adhesion proteins and GTPases". *PLoS One.* 2013; 8(12):e84354.
- Penna-Videau S, Cermeno-vivas J, Moreno-Marval M, Quiroga-Notti M. "Histopathological changes in albino mouse testis induced by the administration of *Tityus n. sp.* Venom". *J Venom Anim Toxins.* 2000; 6:167-179.
- Qin X, Krumrei N, Grubissich L, Dobarro M, Aktas H, Perez G, Halperin JA. "Deficiency of the mouse complement regulatory protein mCd59b results in spontaneous hemolytic anemia with platelet activation and progressive male infertility." *Immunity.* 2003; 18:217-227.
- Quartuccio SM, Schindler K. "Functions of Aurora kinase C in meiosis and cancer. " *Front Cell Dev Biol.* 2015; 3:50.
- Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, Zhang F. "Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system". *Nat prot.* 2013; 8:2281-2308.
- Rivera J, Tessarollo L. "Genetic background and the dilemma of translating mouse studies to humans." *Immunity.* 2008; 28:1-4.
- Rodríguez-Casuriaga R., Geisinger A., López-Carro B., Porro V., Wettstein R., Folle G. "Ultra-fast and optimized method for the preparation of rodent testicular cells for flow cytometric analysis". *Biol Proced Online.* 2009; 11:184.
- Roeder G, Bailis J. "The pachytene checkpoint". *Trends Genet.* 2000; 16:395-403.
- Rossi P, Dolcia S, Settea C, Capolunghia F, Pellegrinia M, Loiarroa M, Di Agostino S, Paronetto MP, Grimaldia P, Mericob D, *et al.* "Analysis of the gene expression profile of mouse male meiotic germ cells". *Gene Expr Patt.* 2004; 4:267-281.
- Sander JD, Joung JK. "CRISPR-Cas systems for genome editing, regulation and targeting". *Nat Biotechnol.* 2014; 32: 347-355.
- Sarrouilhe D, di Tommaso A, Métayé T, Ladeveze V. "Spinophilin: from partners to functions". *Biochimie.* 2006 ;88:1099-1113.
- Sciarano RB, Rahn MI, Rey-Valzacchi G, Coco R, Solari AJ. "The role of asynapsis in human spermatocyte failure". *Int J Androl.* 2012; 35: 541-549.
- Schofield A, Bernard O. "Rho-associated coiled-coil kinase (ROCK) signaling and disease". *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 2013; 48:301-316.
- Sekido R, Lovell-Badge R. "Sex determination involves synergistic action of SRY and SF1 on a specific Sox9 enhancer". *Nature.* 2008; 453:930-934.
- Shaha C, Tripathi R, Prasad Mishra D. "Male germ cell apoptosis: regulation and biology". *Phil Trans R Soc B.* 2010; 365:1501-1515.
- Shan Q, Wang Y, Li J, Zhang Y, Chen K, Liang Z, Zhang K, Liu J, Xi JJ, Qiu JL, Gao C. "Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system". *Nat Biotechnol.* 2013; 31:686-688.
- Shanmughapriya S, Rajan S, Hoffman N, Higgins A, Tomar D, Nemani N, Hines K, Smith D, Eguchi A, Vallem S, Shaikh F, Cheung M, Leonard NJ, Stolakis R, Wolfers M, Ibetti J, Chuprun J, Jog N, Houser S, Koch W, Elrod J,

- Madesh M. "SPG7 is an essential and conserved component of the mitochondrial permeability transition pore". *Mol Cell*. 2015; 60:47-62.
- Shen B, Zhang J, Wu H, Wang J, Ma K, Li Z, Zhang X, Zhang P, Huang X. "Generation of gene-modified mice via Cas9/RNA-mediated gene targeting". *Cell Res*. 2013; 23:720-3.
 - Shima JE, McLean DJ, McCarrey J, Griswold MD. "The murine testicular transcriptome: characterizing gene expression in the testis during the progression of spermatogenesis". *Biol Reprod*. 2004; 71:319-330.
 - Schultz N, Hamra FK, Garbers DL. "A multitude of genes expressed solely in meiotic or postmeiotic spermatogenic cells offers a myriad of contraceptive targets". *Proc. Natl Acad. Sci USA*. 2003; 100:12201–12206.
 - Smith A, Benavente R. "Identification of a structural component of rat synaptonemal complexes". *Exp. Cell Res*. 1992; 198:291-297.
 - Spanò M, Evenson D. "Flow cytometric analysis for reproductive biology". *Biol Cell*. 1993; 78:53-62.
 - Stanford W, Cohn J, Cordes S. "Gene-trap mutagenesis: past, present and beyond". *Nat Rev Genet*. 2001; 2:756-768.
 - Stival C, Puga Molina L, Paudel B, Buffone M, Visconti P, Krapf D. "Sperm capacitation and acrosome reaction in mammalian sperm". *Adv Anat Embryol Cell Biol*. 2016; 220:93-106.
 - Suarez S. "Control of hyperactivation in sperm". *Hum Reprod Update*. 2008; 14:647-657.
 - Sun R, Shen R, Li J, Xu G, Chi J, Li L et al. "Lyzl4, a novel mouse sperm-related protein, is involved in fertilization". *Acta Biochim Biophys Sin*. 2011; 43:346–353.
 - Sundström J, Pelliniemi LJ, Kuopio T, Veräjänkorka E, Fröjdman K, Harley V, Salminen E, Pöllänen P. "Characterization of the model for experimental testicular teratoma in 129/SvJ-mice". *Br J Cancer*. 1999; 80:149-160.
 - Sutton KA, Jungnickel MK, Florman HM. "A polycystin-1 controls postcopulatory reproductive selection in mice." *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008; 105:8661-8666.
 - Swanson WJ, Vacquier VD. "The rapid evolution of reproductive proteins". *Nat Genet*. 2002; 3:137-144.
 - Takase HM, Nusse R. "Paracrine Wnt/beta-catenin signaling mediates proliferation of undifferentiated spermatogonia in the adult mouse testis." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2016; 113:E1489-97.
 - Takahashi Y, Kawate S, Watanabe M, Fukushima J, Mori S, Fukusato T. "Amplification of *c-myc* and *cyclin D1* genes in primary and metastatic carcinomas of the liver". *Pathol Int*. 2007; 57:437-442.
 - Tanwar PS, Commandeur AE, Zhang L, Taketo MM, Teixeira JM. "The Müllerian inhibiting substance type 2 receptor suppresses tumorigenesis in testes with sustained β -catenin signaling." *Carcinogenesis*. 2012; 33:2351-2361.
 - Terawaki S, Fujita S, Katsutani T, Shiomi K, Keino-Masu K, Masu M, Wakamatsu K, Shibata N, Higuchi Y. "Structural basis for Ccd1 auto-inhibition in the Wnt pathway through homomerization of the DIX domain". *Sci Rep*. 2017; 7:7739.
 - Topping D, Brown P, Judis L, Schwartz S, Seftel A, Thomas A. "Synaptic defects at meiosis I and non-obstructive azoospermia". *Hum Reprod*. 2006; 21:3171-3177.
 - Upadhyay SK, Kumar J, Alok A, Tuli R. "RNA-guided genome editing for target gene mutations in wheat." *G3 (Bethesda)*. 2013; 3:2233-2238.

- Van Zonneveld P, Scheffer G, Broekmans F, Blankenstein M, de Jong F, Looman C, Habbema J, te Velde E. "Do cycle disturbances explain the age-related decline of female fertility? Cycle characteristics of women aged over 40 years compared with a reference population of young women". *Hum Reprod.* 2003; 18:495-501.
- Wang C, Leung A, Sinha-Hikim A. "Reproductive aging in the male brown-Norway rat: a model for the human." *Endocrinology.* 1993; 133:2773-2781.
- Wang H, Yang H, Shivalila C, Dawlaty M, Cheng AW, Zhang F, Jaenisch R. "One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering." *Cell.* 2013; 153:910–918.
- Wang Y, Li Z, Xu J, Zeng B, Ling L, You L, Chen Y, Huang Y, Tan A. "The CRISPR/Cas system mediates efficient genome engineering in *Bombyx mori*." *Cell Res.* 2013; 23:1414–1416.
- Wang PX, Ji YX, Zhang XJ, Zhao LP, Yan ZZ, Zhang P, Shen LJ, Yang X, Fang J, Tian S, *et al.* "Targeting CASP8 and FADD-like apoptosis regulator ameliorates nonalcoholic steatohepatitis in mice and nonhuman primates". *Nat Med.* 2017; 23:439-449.
- Wichman L, Somasundaram S, Breindel C, Valerio D, McCarrey J, Hodges C, Khalil A. "Dynamic expression of long noncoding RNAs reveals their potential roles in spermatogenesis and fertility". *Biol Reprod.* 2017; 97:313-323.
- Wiedenheft B, Sternberg SH, Doudna JA. "RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea". *Nature.* 2012; 482:331-338.
- Wrobel G, Primig M. "Mammalian male germ cells are fertile ground for expression profiling of sexual reproduction". *Reproduction.* 2005; 129:1-7.
- Xiao A, Wang Z, Hu Y, Wu Y, Luo Z, Yang Z, Zu Y, Li W, Huang P, Tong X, Zhu Z, Lin S, Zhang B. "Chromosomal deletions and inversions mediated by TALENs and CRISPR/Cas in zebrafish". *Nucleic Acids Res.* 2013; 41:e141.
- Xie K, Yang Y. "RNA-guided genome editing in plants using A CRISPR-Cas system." *Mol Plant.* 2013; 6:1975-1983.
- Xu J, Zhang L, Ye Y, Shan Y, Wan C, Wang J, Pei D, Shu X, Liu J. "SNX16 regulates the recycling of E-cadherin through a unique mechanism of coordinated membrane and cargo binding". *Structure.* 2017; 25:1251-1263.e5.
- Yamada D, Yoshida M, Williams YN, Fukami T, Kikuchi S, Masuda M, Maruyama T, Ohta T, Nakae D, Maekawa A, Kitamura T, Murakami Y. "Disruption of spermatogenic cell adhesion and male infertility in mice lacking TSLC1/IGSF4, an immunoglobulin superfamily cell adhesion molecule". *Mol Cell Biol.* 2006; 26:3610-3624.
- Yang D, Xu J, Zhu T, Fan J, Lai L, Zhang J, Chen YE. "Effective gene targeting in rabbits using RNA-guided Cas9 nucleases". *J Mol Cell Biol.* 2014; 6:97-99
- Yang F, Silber S, Leu N, Oates R, Marszalek J, Skaletsky H. "TEX11 is mutated in infertile men with azoospermia and regulates genome-wide recombination rates in mouse". *EMBO Mol Med.* 2015; 7:1198-1210.
- Yokota N, Aruga J, Takai S, Yamada K, Hamazaki M, Iwase T, Sugimura H, Mikoshiba K. "Predominant expression of human zic in cerebellar granule cell lineage and medulloblastoma." *Cancer Res.* 1996; 56:377-383.
- Young S, Miyata H, Satouh Y, Kato H, Nozawa K, Isotani A, Aitken R, Baker M, Ikawa M. "CRISPR/Cas9-Mediated Rapid Generation of Multiple Mouse Lines Identified Ccdc63 as Essential for Spermiogenesis". *Int J Mol Sci.* 2015; 16:24732-24750.
- Yu Z, Ren M, Wang Z, Zhang B, Rong YS, Jiao R, Gao G. "Highly Efficient Genome Modifications Mediated by CRISPR/Cas9 in *Drosophila*". *Genetics.* 2013; 195:289-291.

- Zhan T, Rindtorff N, Boutros M. "Wnt signaling in cancer" *Oncogene*. 2017; 36:1461-1473.
- Zhang H, Zhang H, Zhang Y, Ng SS, Ren F, Wang Y, Duan Y, Chen L, Zhai Y, Guo Q, Chang Z. "Dishevelled-DEP domain interacting protein (DDIP) inhibits Wnt signaling by promoting TCF4 degradation and disrupting the TCF4/beta-catenin complex." *Cell Signal*. 2010; 22:1753-1760.
- Zhu Y, Ma M, Wan L, Zhang D, Zhao L, Wei L, Li L. "Analysis of DAZL SNP260 and SNP386 in infertile Chinese males using multi-analyte suspension array". *Mol Med Rep*. 2014; 10:2949-2954.

VIII. ANEXOS

1. MATERIALES Y MÉTODOS - Recombineering: diseño de un targeting vector

Los vectores para *gap repair* se generan mediante la ligación de dos fragmentos de 200-400 nt cada uno flanqueantes de la zona del BAC que se desea subclonar, en un vector que contiene marcadores de selección tanto positiva como negativa (PL253, en nuestro caso). Estos fragmentos se obtienen por PCR con iniciadores quiméricos (ver Tabla VIII.1), que portan además de 20 nt de la secuencia específica del fragmento a amplificar, sitios de reconocimiento para enzimas de restricción que permitan su ligación en el plásmido. Esta construcción plasmídica se linealizó y se introdujo por electroporación en la cepa SW102 de *E. coli* a la que previamente se le había electroporado el BAC conteniendo la secuencia de *Spats1*, y crecida a 32°C para no activar los genes *Red*. Una vez transferido el vector lineal, se procedió a la activación del complejo de proteínas EXO, BET y GAM, mediante incubación de las bacterias transfectadas durante 1 hora en LB a 42°C con ampicilina.

Las Figuras VIII.1 y VIII.2 muestran esquemas aclaratorios de los pasos involucrados.

1.A. Plásmidos y cepas

Todos los plásmidos y cepas de *E. coli* utilizadas en este protocolo fueron adquiridas de *NCI BRB Repository*.

-SW102: es una cepa modificada de D10HB que contiene los genes *Red* integrados en el cromosoma bajo un promotor inducible por temperatura. Tiene además incorporado el gen de resistencia al antibiótico tetraciclina.

-PL253: Es un plásmido tipo pBluescript (es decir, que contiene el gen de selección positiva de resistencia a ampicilina y un sitio de clonado múltiple) modificado, al que se lo agregó el marcador de selección negativa *MC1/HSV-TK* (un promotor eucariota + gen timidina-kinasa) (Figura VIII.3).

-PL451: Es un plásmido que tiene el gen de resistencia a neomicina y su promotor, flanqueado por secuencias loxP (Figura VIII.3).

1.B. Subclonado de un fragmento de 13,8 Kb del gen *Spats1* del BAC al plásmido mediante la técnica de *gap repair*.

- 1- Para la amplificación por PCR de los dos fragmentos de homología (izquierdo y derecho), se diseñaron los juegos de iniciadores que se muestran en la Tabla VIII.1 (Brazo Izq PCR y Brazo Der PCR, respectivamente). La amplificación se llevó a cabo a partir de ADN del BAC conteniendo la secuencia del gen *Spats1* de *M. musculus*. Para todas las reacciones de PCR se empleó básicamente el protocolo de PCR descrito en Materiales y Métodos, con eventuales variaciones menores (*e.g.* temperatura de *annealing* de los iniciadores).
- 2- Se digirieron 100 ng del fragmento izquierdo con las enzimas de restricción *NotI/PstI* en Buffer G (Fermentas) y 100 ng del fragmento derecho con *PstI* y *BamHI*, en el mismo buffer.
- 3- Los productos de ambas digestiones se purificaron mediante el *PCR Clean up Kit* (Fermentas), siguiendo las instrucciones del fabricante.
- 4- El plásmido PL253 se digirió con las enzimas de restricción *NotI* y *BamHI* en Buffer G, de modo de poder subclonar los fragmentos de homología creados por PCR.
- 5- El producto de la digestión se corrió en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio, se cortó la banda de plásmido y se eluyó de la agarosa mediante el *Agarose Elution Kit* (Fermentas).
- 6- Se efectuó una reacción de ligación utilizando 100 ng de PL253 digerido + 5 ng de fragmento izquierdo digerido + 5 ng de fragmento derecho digerido, utilizando ligasa (Fermentas), y empleando los procedimientos de ligación habituales. La ligación se incubó 1 h a 16°C.
- 7- Se transformaron células DH10B quimiocompetentes con el producto de ligación, se dejó crecer el cultivo por 1 h a 37°C, y se plaquearon 100 µl de la mezcla de transformación en una placa de Petri conteniendo medio LB-agar/ampicilina.
- 8- Se seleccionaron 8 clones, se repicaron en otra placa de LB-agar/ampicilina, y se realizaron minipreparaciones para aislar el plásmido ligado. Se cuantificó por Nanodrop la cantidad de plásmido obtenido en cada caso.
- 9- Se chequeó por PCR la presencia en el plásmido de los fragmentos izquierdo y derecho en los 8 clones. Los juegos de iniciadores diseñados para la confirmación de la ligación de los fragmentos se muestran en la Tabla VIII.1.
- 10- Se generaron células electrocompetentes de *E. coli* cepa SW102, mediante los procedimientos habituales.

- 11- Se electroporaron 100 ng de ADN del BAC conteniendo la secuencia de *Spats1* de ratón en células SW102 (electrotransformación). Se plaquearon como es habitual, y se procedió a la extracción de ADN y chequeo por PCR (primers 1 y 2 de la tabla VIII.1).
- 12- Las células SW102-BAC (es decir, las células SW102 electrotransformadas con el BAC) se cultivaron en medio líquido LB/ampicilina o.n. a 32°C.
- 13- A continuación se incubó a 42°C por 15 minutos con el objeto de inducir la expresión de los genes *Red*. Luego de la inducción, las células se colocaron inmediatamente en hielo.
- 14- Se generaron células electrocompetentes SW102-BAC.
- 15- Las células electrocompetentes SW102-BAC (50-100 ng) se transformaron con el *gap vector* (plásmido aceptor) linealizado con *Pst*I.
- 16- Las células transformadas se incubaron 2 h a 32°C, se plaquearon 50-100 µl en LB-agar/ampicilina, se incubó o.n. a 32°C, y se contaron las colonias obtenidas.
- 17- Se repicaron 8 colonias a otra placa de LB-agar/ampicilina.
- 18- Se realizaron minipreparaciones de ADN a partir de las 8 colonias.
- 19- Se procedió a la detección del fragmento de 13 Kb subclonado mediante PCR de los extremos, y por secuenciación de los fragmentos de PCR. Los iniciadores diseñados para confirmación del “*gapeado*” se muestran en la Tabla VIII.1.

1.C. Introducción de Casete Neo^r en exón 2 de *Spats1*.

Este paso consistió en la amplificación del casete de resistencia a neomicina (Neo^r) para su posterior introducción en el *targeting* vector PL253 entre medio de cada fragmento flanqueante anteriormente ligado. El procedimiento seguido fue:

- 1- Se amplificó por PCR el casete Neo^r usando como molde el plásmido PL452, con iniciadores quiméricos (100 nt cada uno, ver tabla VIII.1). Este casete incluía la secuencia del gen de resistencia a neomicina, (Neo^r) más un promotor procariota (EM7), más un promotor eucariota (*PgK*) además de una cola poliA.
- 2- El producto de PCR se corrió en gel de agarosa al 2%, se cortó la banda y se eluyó el fragmento (*Agarose Elution Kit*, Fermentas)
- 3- Se cuantificó la cantidad de fragmento purificado mediante Nanodrop.
- 4- Cultivar SW102/*gap vector* en LB/ampicilina o.n. a 32°C. Inducir los genes *Red* a 42°C por 15 minutos. Rápidamente poner las células en hielo y hacerlas electro-competentes.

- 5- Electroporar el casete *Neo^r* en células electro-competentes *SW102/gap vector - Red* inducidas. Incubar 1 h a 32°C y plaquear 100 µl sobre LB-agar/kanamicina.
- 6- Seleccionar 8 colonias y repicar en otra placa de LB-agar/kanamicina.
- 7- Hacer minipreparaciones de colonias seleccionadas.
- 8- Este plásmido obtenido constituiría el vector direccionador (*targeting vector*) completo, que se usaría para transfectar en células ES de ratón. Las células ES transformadas serían luego microinyectadas en blastocitos de ratón e implantadas en hembras pseudopreñadas.

Tabla VIII.1. Juegos de iniciadores diseñados para la construcción del *targeting vector.**

PCRs	Nombre del primer	Secuencia primers 5'-3'	Enzima restricción	Tm	PCR pb
Brazo Izq PCR	S-armIzQ	tatagcggccgcTGGGGACTGTGACATTTAGC	NotI	60	450
	A-armIzQ	tatactgcagGATGGAAGATAGAGACAAGGG	PstI	60	
Brazo Der PCR	S-armDER	tatactgcagTGCCAACGCCTCAGTGATG	PstI	60	438
	A-armDER	tataggatccCTCAGATTCCACACGAACTC	BamHI	60	
Confirmatorio ligación frag.	S-ConIzQ	CCTCTTCGCTATTACGCCAG		60	523
	A-ConIzQ	tatactgcagGATGGAAGATAGAGACAAGGG	PstI	60	
	S-ConDER	tatactgcagTGCCAACGCCTCAGTGATG	PstI	60	578
	A-ConDER	GCGAAGTGGACCTGGGAC		58	
Confirmatorio "gapeado"	S-ConIzQ	CCTCTTCGCTATTACGCCAG		60	846
	A-gapIzQ	AAGGTGGCTCAGCAAGGG			
	S-gapDER	ATGTTTCAGTTGGAGGGCAC		60	917
	A-ConDER	GCGAAGTGGACCTGGGAC		58	
PCR Bac Exon 4 (control neg)	S-BACe4	GGATTGTTCACTGTCAGGTTG		62	480
	A-BACe4	CGATAGGGGCAGAGACAGG		62	
Casete Neo ^r	S-Neo	TTCCCCGACTTTTGATTATGATATAGGAA ATAAACAGACTGTCAAGTGATACCCCA GCAATATACTTAAGTGGgggcccTCTACCG GGTAGGGGAGGCG	Apal		1851
	A-Neo	CTTCTGTGACTCGTCCACATCAGGGCA GATTTCTTGAAAGGTCCCGGGGCAGAG ACCTGTGAAAGAAGGCCCGtcgacTTAAGG GTTCCGCAAGCTCT	Sall		
Confirmatorio inserción casete Neo ^r	S-ConNeoDer	GTGCCTTCCTTGACCCTGG			503
	A-ConNeoDer	AGGGAATACTGAGTAAGAGG			

* En la tabla se muestran los iniciadores diseñados para la construcción de los brazos de homología izquierdo y derecho para el *gap-vector*, flanqueantes a los 13 kb de ADN del BAC que se deseaba subclonar. También se listan los iniciadores usados para los PCRs confirmatorios de clonación de fragmentos izquierdo y derecho, confirmación de "gapeado" y confirmación de presencia del BAC (exón 4). En mayúsculas se muestran los nt homólogos a la secuencia blanco de PCR, en minúscula se muestran los nucleótidos quiméricos agregados, y en colores los sitios de reconocimiento por enzimas de restricción agregados.

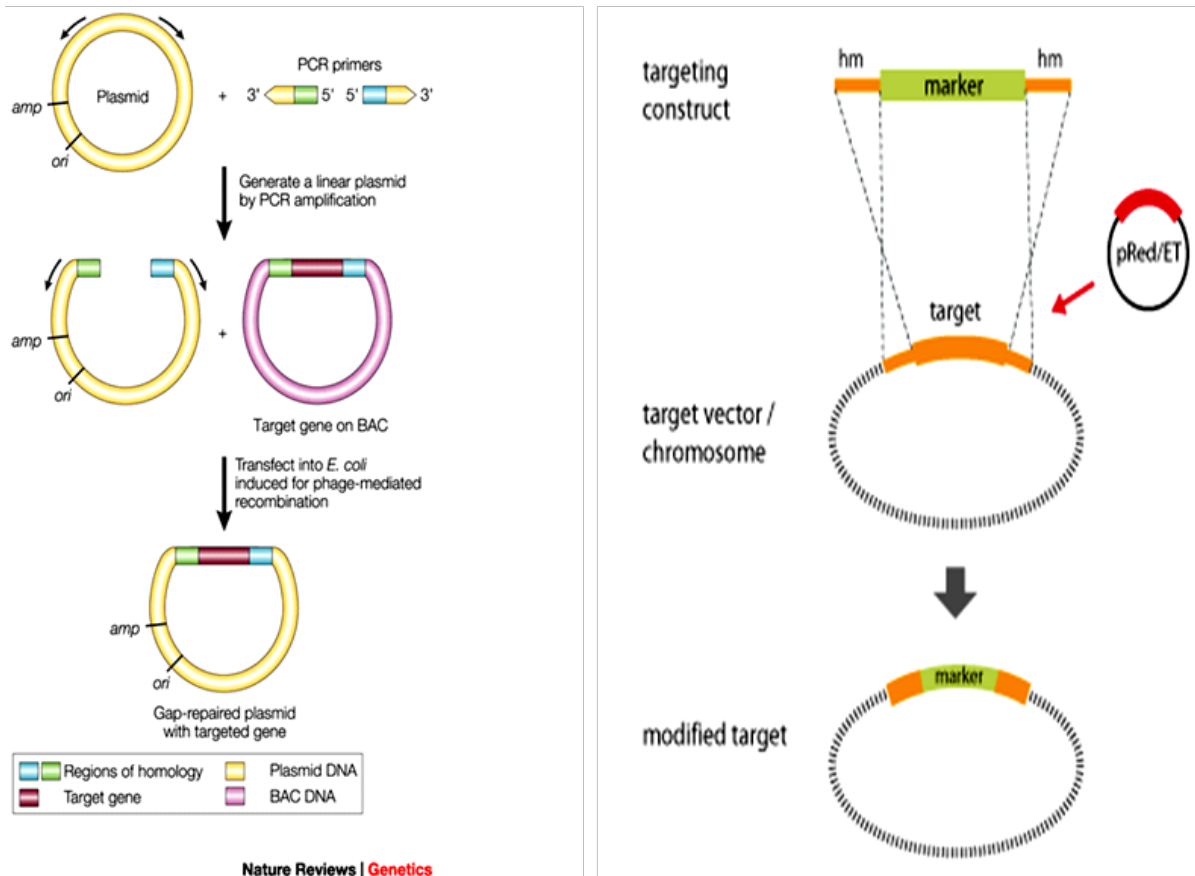


Figura VIII.1. Esquema de los pasos de construcción del *targeting vector*. En la figura de la izquierda se muestra que primero se debe crear el vector para *gap repair*, es decir, el vector que va a aceptar la clonación de un fragmento de 13 kb de un BAC. Para ello, en primer lugar se amplifican 50 pb flanqueantes a la zona a clonar y se ligan al vector, luego se introduce el vector linealizado en las células SW102 previamente transformadas con el BAC. Este proceso daría como resultado un vector “*gap-repaired*” que contendrá 13 kb de secuencia de *Spats1* de *M. musculus* reparada utilizando el *gap* como molde. La figura de la derecha muestra el paso siguiente, que es clonar un marcador de selección en la región donde se desea interrumpir el gen (en nuestro caso, el exón 2 del gen *Spats1*). Fuente: Liu *et al.*, 2003.

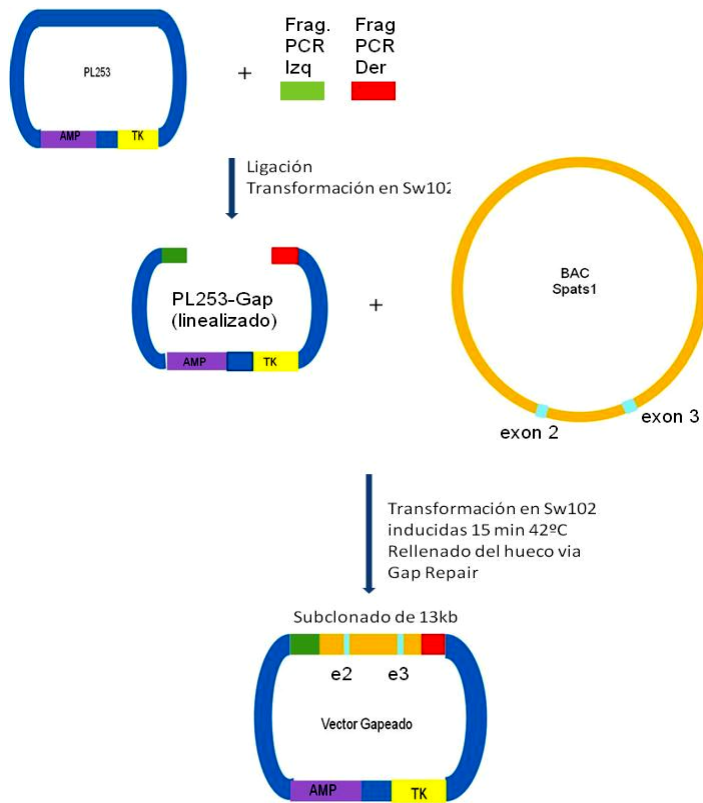


Figura VIII.2. Esquema de subclonado de 13 kb del gen *Spats1* de *M. musculus* mediante la técnica de *gap repair*, a partir de un BAC. Al vector PL253 primero se le clonan dos brazos de homología (verde y rojo). Posteriormente se transforma dentro de una cepa SW102 activada que contiene el BAC *Spats1* molde.

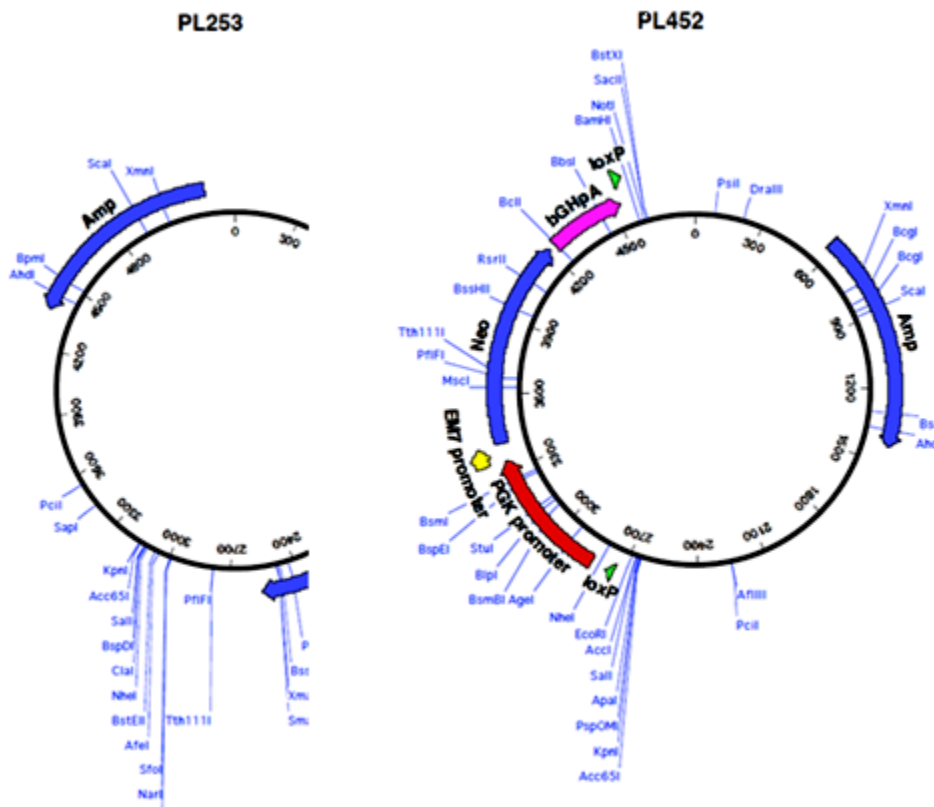


Figura VIII.3. Esquema de los vectores PL253 (usado para clonar los fragmentos Izq y Der, para formar el “*gap-vector*”) y PL452 (que contiene el casete *Neo^r*). Fuente: Liu *et al.*, 2003.

2. RESULTADOS - Curva de calibración para experimentos de qRT-PCR

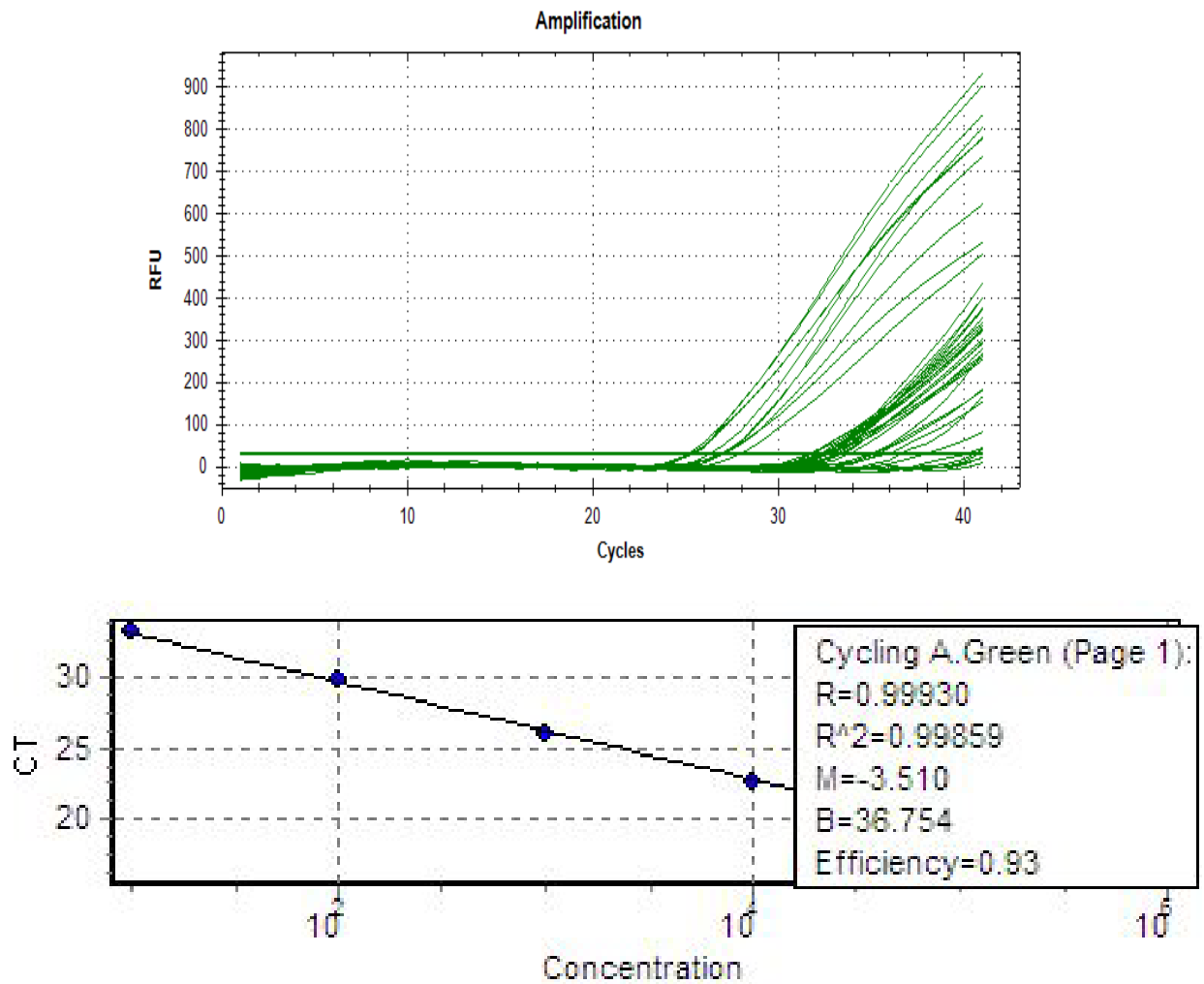


Figura VIII.4. Ejemplo de resultados de detecciones por qRT-PCR (izquierda), y curva de calibración para el gen *Ppp1cc* (derecha). La curva de calibración se realizó mediante 4 diluciones seriadas. Se obtuvieron una recta con un $R=0.9993$ y una eficiencia = 93%.