



Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA)

Área: Biología

Subárea: Biología Celular y Molecular

**“MTCH2: CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE
SU EXPRESIÓN DURANTE LA
ESPERMATOGÉNESIS DE LA RATA Y RELACIÓN
CON LA MUERTE CELULAR PROGRAMADA”**

Licenciado en Ciencias Biológicas Andrés Goldman

Laboratorio de Biología Molecular

Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable

Orientadora: Dra. Adriana Geisinger

Junio 2013

Tribunal de Tesis:

Dr. Gustavo Folle, Dr. Alejandro Bielli y Dr. Gonzalo Ferreira

... renuncia a los resultados, pero nunca jamás renuncies a la pasión. En realidad, el Maestro sabe intuitivamente que la pasión es el camino; es la vía de la auto-realización.

Incluso en una perspectiva terrenal se puede afirmar con bastante exactitud que, si uno no siente pasión por nada, no tiene vida en absoluto.

Neale Donald Walsch

Agradecimientos

En primer lugar quisiera agradecer a PEDECIBA por ofrecer un marco donde llevar a cabo mi formación de posgrado y a la ANII y CSIC, ambas instituciones me apoyaron económicamente durante el desarrollo de la maestría.

En particular un gran agradecimiento a los tres integrantes del tribunal por la evaluación de mi tesis, Gustavo, Gonzalo y Alejandro, de todos ustedes he aprendido.

Especialmente agradecer al Profesor Atan Gross y la Dra. Yehudit Zaltsman del Instituto Weizmann de Ciencias, por las herramientas y apoyo que me brindaron, sin los cuales no habría logrado los resultados que alcancé.

Agradecer a todos los profesores y compañeros que aportaron a la realización de esta tesis. Con anticuerpos colaboraron el profesor Gross y la Dra. Pedrana, la sonda Mitotracker red fue un obsequio de la Dra. Cassina y parte de los experimentos de TUNEL fueron realizados con reactivos brindados por Gianni Curti. También mencionar al servicio de citometría de flujo del IIBCE y la plataforma de microscopía confocal, tanto Federico Santiñaque como Marcela Díaz me apoyaron con profesionalismo y especial dedicación.

A todos los integrantes del grupo de Biología Molecular del IIBCE: Adriana, Carina, Inés, Raquel, Mercedes, Rossana, Adrián, Eva, Lucina, Paola, Alfonzo, Alexandra, Gianni, Ricardo y a los que siguieron de largo Juan Pablo, Marianne, Lucila, Mariana y Mauricio, un agradecimiento especial. Siempre fue placentero trabajar junto a ustedes, no solo hemos compartido reactivos y buffers, sino también muchas tardes de mate, cumpleaños, recibimientos incluso casamientos y nacimientos. Excelentes personas todos.

A Adriana Geisinger por aceptarme no solo una, sino dos veces como su estudiante de posgrado. Su constante apoyo y dedicación, a lo largo de toda mi formación fueron fundamentales para haber logrado crecer no solo científicamente, sino desde el punto de vista profesional, académico y humano. Sin dudas hoy, muchas de tus enseñanzas se ven reflejadas en mi identidad científica. Gracias.

A mis padres, Victor y Eva y a mi abuela Oma, aunque no entienden el 95% de lo que estoy haciendo siempre me apoyaron, me transmitieron su orgullo, me cuidaron y confiaron

en que iba a llegar, sin ellos nada de esto hubiera sido posible. A Silvina, que llenó mi corazón, que tú nombre esté en todos mis agradecimientos por los próximos 100 años.

ABREVIACIONES

ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN copia
C	El valor C se define como la cantidad de ADN por genoma haploide
DO	Densidad Óptica
dpp	días post parto
FasL	Fas Ligando
G₀	Fase quiescente del ciclo celular en la cual no hay síntesis de ADN ni mitosis
G₂	Fase del ciclo celular previa a la mitosis cuya carga genética es 4C
IP	Ioduro de propidio
KO	Knockout
MCP	Muerte Celular Programada
min.	minutos
MME	Membrana Mitocondrial Externa
MMI	Membrana Mitocondrial Interna
o.n.	<i>overnight</i> o toda la noche
PAGE	<i>Polyacrylamide gel electrophoresis</i> o electroforesis en gel de poliacrilamida
PARP	Poly (ADP-ribose) polymerase
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> o reacción en cadena de la polimerasa
rpm	revoluciones por minuto
RT-PCR	Retrotranscripción seguida por PCR
seg.	Segundos
siRNA	<i>small interfering RNA</i> o ARN pequeño de interferencia
tBid	Bid truncada

u.a.	Unidades Arbitrarias
ufp	Unidades formadoras de playas de lisis
UTR	<i>UnTranslated Region</i> o partes no traducidas del gen
UV	ultravioleta
WT	<i>wild type</i> o salvaje o silvestre

Tabla de contenido

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN.....	2
1.1. La Reproducción Sexual	2
1.2. La Espermatogénesis.....	2
La hazaña espermatogénica	3
Organización espacial.....	9
Entre ciclos y ondas.....	10
Distintos niveles de control.....	12
Expresión génica diferencial durante la espermatogénesis.....	13
1.3. Muerte Celular Programada.....	15
Apoptosis y sus actores.....	16
La familia BCL-2	18
Transportadores mitocondriales y <i>Mtch2</i>	21
1.4. Muerte Celular Programada en la Línea Germinal Masculina	23
MCP en el establecimiento de la línea germinal y durante la primera onda espermatogénica ...	24
MCP en la espermatogénesis adulta.....	25
Las distintas moléculas involucradas en la MCP presentan distintos perfiles de expresión	28
1.5. Antecedentes directos de nuestro grupo de trabajo: <i>Mtch2</i> en el testículo.....	29
Resumen de los antecedentes	31
HIPOTESIS, OBJETIVOS Y ABORDAJE.....	32
2.1 Hipótesis.....	32
2.2 Objetivo general de la tesis.....	32
Objetivos específicos.....	32
2.3 Abordaje.....	32
MATERIALES Y METODOS	34
3.1 Animales.....	34
3.2 RT-PCR	34
Retrotranscripción (RT).....	34
PCR	35
3.3 Rastreo en genoteca de ADNc de espermatoцитos paquiténicos.....	36
Rastreo preliminar por PCR de clones conteniendo la secuencia de <i>Mtch2</i>	36
Marcado de la sonda.....	36
Plaqueo de unidades formadoras de playas de lisis (ufp), transferencia y fijación	37
Detección y rastreo	38

Escisión <i>in-vivo</i>	39
Purificación de ADN de los clones seleccionados y análisis de restricción	40
3.4 Western Blots	41
Preparación de extractos proteicos	41
Electroforesis en gel de poliacrilamida	41
Transferencia.....	42
Detección Inmunológica.....	43
3.5 Inmunohistoquímica	43
Preparado de cortes histológicos.....	43
Inmunodetección de Mtch2 en cortes	44
Co-detección de Mtch2 con Mitotracker® Red 580 (MTR580)	45
Detección de Mtch2 y ensayo de TUNEL	45
3.6 Cuantificación Celular por Citometría de Flujo	45
Suspensiones celulares.....	46
Inmunocitoquímica	46
Mediciones citométricas	47
3.7 Ensayos de Hipertermia Moderada.....	47
3.8 Análisis de Secuencias y Estudios Estadísticos	48
RESULTADOS	49
4.1 Estudios de expresión del gen <i>Mtch2</i> y caracterización de la secuencia codificante en el testículo de la rata.....	49
RT-PCR a alto número de ciclos.....	49
Rastreo en genoteca de espermatozoides paquítericos del ADNc completo de <i>Mtch2</i>	50
4.2 Patrón de expresión de la proteína Mtch2	53
Estudios de expresión de la proteína Mtch2 en distintos tejidos de la rata	53
Mtch2 en el testículo, ¿es de localización mitocondrial?	57
Caracterización de la expresión de Mtch2 durante el desarrollo posnatal del testículo de la rata	58
Estudios de localización de Mtch2 en diferentes estadios del ciclo del epitelio seminífero	61
Análisis de la expresión testicular de Mtch2 en los distintos tipos celulares	63
Patrón peculiar de expresión de Mtch2 en algunas células aisladas	68
4.3 Estudios de Muerte Celular Programada (MCP)	69
Inmunomarcación en testículo normal con anticuerpo anti-Mtch2 y reacción de TUNEL.....	69
Estudios de MCP y evaluación de la expresión de Mtch2 en individuos sometidos a hipertermia moderada	72

Comparación del patrón de expresión de Mtch2 con el de marcadores clásicos de apoptosis (caspasa 3 activada) en el testículo.....	76
DISCUSIÓN	78
5.1 Una variante transcripcional con UTR corto	78
5.2 Perfil de expresión del gen Mtch2 y su producto proteico en el testículo	80
5.3 Mtch2 y la MCP	83
5.4 Mtch2: ¿qué función cumple en la línea germinal?	86
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	90
BIBLIOGRAFÍA	93
ANEXO: Secuencias	105

RESUMEN

La espermatogénesis es un proceso de diferenciación terminal complejo, en el que interactúan de modo estrictamente regulado procesos de proliferación celular, diferenciación, y muerte celular programada (MCP).

El gen *Mtch2* codifica para una proteína presuntamente apoptótica involucrada en la regulación de la MCP. La evidencia más reciente apunta a *Mtch2* como un importante actor involucrado en la interconexión entre las vías extrínseca e intrínseca de apoptosis. En la rata descubrimos que *Mtch2* se expresa diferencialmente en el testículo adulto respecto a otros tejidos (mientras en otros tejidos los niveles detectados tanto de ARNm como de proteína son muy bajos, en el testículo se detectan altísimos niveles), y respecto a etapas previas del desarrollo de la línea germinal. Es más, hallamos diferencias cuantitativas en la expresión de *Mtch2* entre diferentes estadios del epitelio seminífero y entre los distintos tipos de células germinales. Determinamos que aquellas células donde se expresan mayores niveles de *Mtch2* son los espermatoцитos (células en profase meiótica I), y que en este tipo de célula se expresa una variante transcripcional con una región 3'UTR mucho más corta. Caracterizamos además el patrón subcelular de localización de *Mtch2* en el testículo, determinando que se trata de una proteína mitocondrial.

Mediante el empleo de metodologías para el estudio de MCP, detectamos que en células que se encuentran sufriendo apoptosis, *Mtch2* presenta un perfil peculiar de expresión y que bajo condiciones de inducción de la MCP a nivel testicular, se observa un aumento en la expresión de la proteína, junto con incremento en la aparición de marcadores apoptóticos clásicos.

Los resultados expuestos indican que *Mtch2* representa un gen con un perfil de expresión particular, añadiendo nueva evidencia acerca de la peculiaridad en los perfiles de expresión génica que presenta el testículo, e introduciendo a *Mtch2* en el panorama de la regulación de la MCP a nivel de este órgano.

INTRODUCCIÓN

1.1. La Reproducción Sexual

La reproducción es un *sine qua non* para la continuación de la vida y la propagación de las especies. Los seres vivos utilizan diferentes estrategias para reproducirse, las que se diferencian principalmente en reproducción asexual y sexual. Esta última apareció más recientemente y representó un importante salto evolutivo (Crow, 1994). El principio fundamental de la reproducción sexual consiste en la unión de células especializadas llamadas gametos, provenientes de individuos distintos, con la finalidad de generar a partir de una única célula primordial, un nuevo individuo único resultante de la fusión de la información genética de ambos progenitores.

En los mamíferos el macho se caracteriza por producir gametos pequeños, móviles y livianos, responsables de transportar la información genética hacia un gameto femenino grande, rico en organelos y reservas, responsable de brindar el complemento de la información genética y un ambiente propicio para la formación del nuevo individuo. La producción de gametos requiere de la ejecución de programas sofisticados de diferenciación celular denominados espermatogénesis y ovogénesis.

1.2. La Espermatogénesis

La espermatogénesis es un proceso de diferenciación celular complejo, altamente regulado, que puede clasificarse en divisiones mitóticas, divisiones meióticas y espermiogénesis (Russell *et al.*, 1990) (**figura 1.1**). El propósito de la espermatogénesis es mantener una adecuada producción de espermatozoides. Es necesaria la apropiada ejecución de un programa de expresión génica en concomitancia con la ocurrencia de sofisticados eventos moleculares, para que este programa se ejecute correctamente y de manera coordinada (Matzuk, 2002).

En el hombre, la producción diaria de espermatozoides alcanza los 200 millones mientras que en el toro puede alcanzar de 2 a 3 billones de espermatozoides por día (Johnson, 2000). Esta producción masiva de gametos requiere de una arquitectura tisular especial, en conjunto con un sistema aislado que permita un alto y refinado nivel de regulación (Sutovsky & Manandhar, 2006).

Los espermatozoides son células altamente especializadas, que presentan una cabeza y una cola rodeadas por una membrana plasmática. La cabeza, hidrodinámica, está compuesta principalmente por un núcleo con ADN altamente compactado y un acrosoma, vesícula que contiene enzimas necesarias para la fecundación del óvulo. La cola o flagelo, compuesta por microtúbulos, provee de motilidad al espermatozoide. Clásicamente la cola se clasifica en 4 segmentos: la pieza conectora, la pieza media (que contiene las mitocondrias agrupadas), la pieza principal y la final (revisado por Fawcett, 1975).

La hazaña espermatogénica

Para el establecimiento de la línea germinal de los mamíferos, es necesaria la migración de células germinales primordiales (derivadas del endodermo embrionario) desde el alantoides, a través del estómago primitivo del embrión, hasta la cresta genital (Tam & Snow, 1981). Tanto durante la migración como al arribo a la cresta genital, las células germinales primordiales se dividen activamente (Sutton, 2000). Al parecer, esta migración extra-embrionaria impide la exposición de las células germinales primordiales a señales de diferenciación presentes a nivel embrionario (Downs & Harmann, 1997). Una vez en destino, en el caso del macho estas células pasan a formar los cordones seminíferos en conjunto con células de Sertoli.

Las células de Sertoli, presentes en los cordones seminíferos (que luego adquirirán luz y se transformarán en túbulos), son células sustentaculares encargadas de orquestar el adecuado desarrollo de la espermatogénesis, proveyendo de nutrientes y señales parácrinas de supervivencia y diferenciación a las células de la línea germinal (Guraya, 1995). Son muy importantes a la hora del establecimiento de la línea germinal masculina ya que su número determinará en última instancia la capacidad espermatogénica máxima del epitelio seminífero, afectando la productividad sexual de los machos y su fertilidad (Allden, 1979). Las células de Sertoli se dividen activamente hasta unos días después del nacimiento del macho, aunque esto puede variar levemente según la especie (Sharpe *et al.*, 2003).

Una vez asentadas en los cordones, las células germinales primordiales pasan a denominarse gonocitos. Los gonocitos se dividen de manera activa a nivel embrionario hasta alcanzar un estado de quiescencia, en el cual quedan detenidos en fase G₀ (Malkov, 1998). Este estado de quiescencia se mantiene hasta el nacimiento, cuando los gonocitos migran

desde el centro del túbulo hacia la membrana basal del mismo y se transforman en espermatogonias (Orth, 2000).

Las espermatogonias son las células responsables de dar comienzo al ciclo espermatogénico, una sucesión de divisiones y transformaciones celulares que ocurren durante la espermatogénesis. Mediante divisiones mitóticas las espermatogonias originan los espermatocitos, que tras la meiosis dan lugar a espermátidas. Luego de un proceso de diferenciación celular las espermátidas se transforman en espermatozoides.

Antes de originar un espermatocito, una espermatogonia atraviesa de 8 a 9 divisiones, pudiendo generar en última instancia de 2.048 a 4.096 espermatozoides dependiendo del número de divisiones (de Rooij & Russell, 2000). Dado que las células de Sertoli son capaces de sustentar un número limitado de células germinales de manera adecuada, el control del número de espermatogonias es primordial a la hora de mantener la proporción de células germinales en relación a las células de sostén.

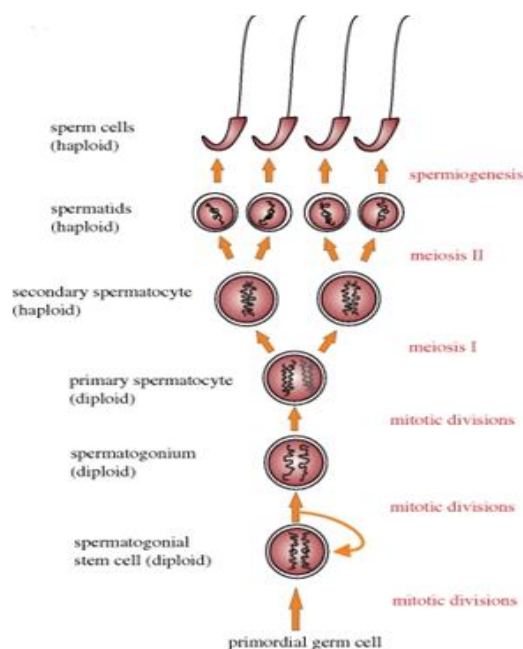


Figura 1.1. El ciclo espermatogénico. Modificado de Cheng & Mruk (2010).

Las espermatogonias madre A_s (*stem*) se dividen para generar dos células, una espermatogonia A_{pr} (pareada) y otra espermatogonia A_s , encargada de automantener la población de células germinales. Dos células del tipo A_{pr} unidas por puentes citoplasmáticos

pueden generar de 16 a 32 espermatogonias Aal (alineadas). Las espermatogonias del tipo As, Apr y Aal se clasifican como indiferenciadas (**figura 1.2**).

Es importante destacar que las uniones formadas por puentes citoplásmicos se mantendrán a lo largo de toda la espermatogénesis, resolviéndose recién hacia el final de la espermiogénesis, para la liberación de los espermatozoides. Esto determina que las células germinales funcionen como un sincitio durante la mayor parte de la espermatogénesis, donde las distintas poblaciones celulares se comportan como una cohorte y maduran de manera sincrónica, al producirse entre ellas un diálogo permanente ocasionado por el tráfico de macromoléculas y otros componentes citoplásmicos (Braun *et al.*, 1989).

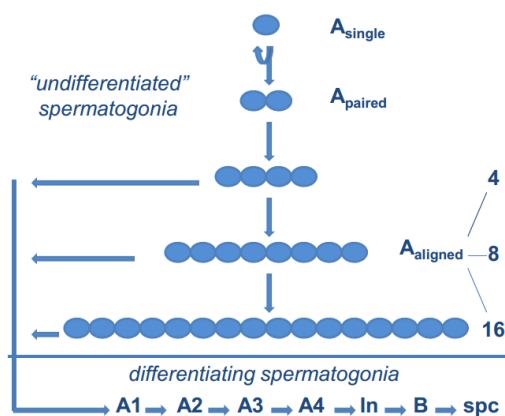


Figura 1.2. Espermatogonias indiferenciadas y diferenciadas dentro de la línea germinal masculina. Extraído de de Rooij & Griswold (2012).

Las espermatogonias tipo Aal se diferencian, sin división mediante, en espermatogonias tipo A1, encargadas de comenzar una serie de divisiones mitóticas estrictamente reguladas a nivel temporal, que darán lugar sucesivamente a espermatogonias tipo A2, A3, A4, intermedias y finalmente espermatogonias tipo B (Aponte, 2005). Las espermatogonias tipo B atraviesan la última división mitótica para originar los espermatoцитos.

Los espermatoцитos por su parte, atravesarán dos divisiones celulares consecutivas sin mediar una fase de síntesis de ADN entre ellas, obteniéndose como resultado células con la mitad del complemento cromosómico de la especie. Este tipo de división celular especial, conocida antiguamente a través de las observaciones de Weissman (padre de la teoría sobre la herencia basada en el plasma germinal) en 1893 se denomina meiosis. Clásicamente

ambos procesos se clasifican como meiosis I y II (o primera y segunda división meiótica). Las células que transitan la primera división se conocen como espermatocitos primarios, mientras que las que atraviesan la segunda división se denominan espermatocitos secundarios.

Los espermatocitos primarios son células grandes en las cuales ocurren importantes eventos moleculares para concretar de manera exitosa una profase meiótica compleja y extensa. Esta profase se ha clasificado en diferentes etapas denominadas leptoteno, cigoteno, paquiteno, diploteno y diacinesis, que presentan características diferenciables tanto a nivel celular como molecular (**figura 1.3**). Durante el leptoteno los cromosomas comienzan a condensarse para luego encontrar a sus homólogos, en tanto se constituyen los llamados “elementos axiales” los cuales posteriormente formarán los elementos laterales de los complejos sinaptonémicos (ver a continuación). A su vez, los telómeros se unen a la envoltura nuclear y empiezan a migrar sobre la misma. En el cigoteno los cromosomas homólogos comienzan a aparearse, mientras los telómeros se concentran en un polo de la envoltura nuclear formando lo que se conoce como *bouquet*. Durante esta fase comienza la formación de un andamiaje proteico entre ambos cromosomas, denominado complejo sinaptonémico (por una revisión actualizada de la integración de esta estructura ver Benavente *et al.*, 2012). En el paquiteno finaliza el ensamblaje del complejo sinaptonémico y a nivel genético comienza el intercambio de información entre los cromosomas homólogos, llamado recombinación homóloga. Debido al mecanismo de recombinación, los cromosomas homólogos entrecruzan sus hebras de ADN lo que determina que permanezcan unidos formando quiasmas al desensamblarse el complejo sinaptonémico durante el diploteno (revisado por Qiao *et al.*, 2012). Finalmente, durante la diacinesis los cromosomas comienzan a disponerse en la placa ecuatorial de la célula en división (**figura 1.3**).

La profase meiótica I es una sucesión de eventos moleculares complejos y altamente controlados que componen una etapa limitante en el desarrollo de los gametos tanto masculinos como femeninos. La recombinación homóloga, junto con la segregación aleatoria de cromosomas de origen materno y paterno que ocurre durante la anafase de la primera división meiótica, constituyen una de las principales fuentes de variabilidad conocidas jugando un rol fundamental en los procesos evolutivos.

Luego de culminada la primera división meiótica tiene lugar la segunda división, en la cual se separan las cromátidas hermanas. Se desconoce bastante acerca de los eventos moleculares que ocurren para que los espermatocitos secundarios originen las espermátidas redondas, en gran parte debido a la dificultad para aislarlos y/o cultivarlos a partir de testículos de mamíferos (Roy & Matzuk, 2006).

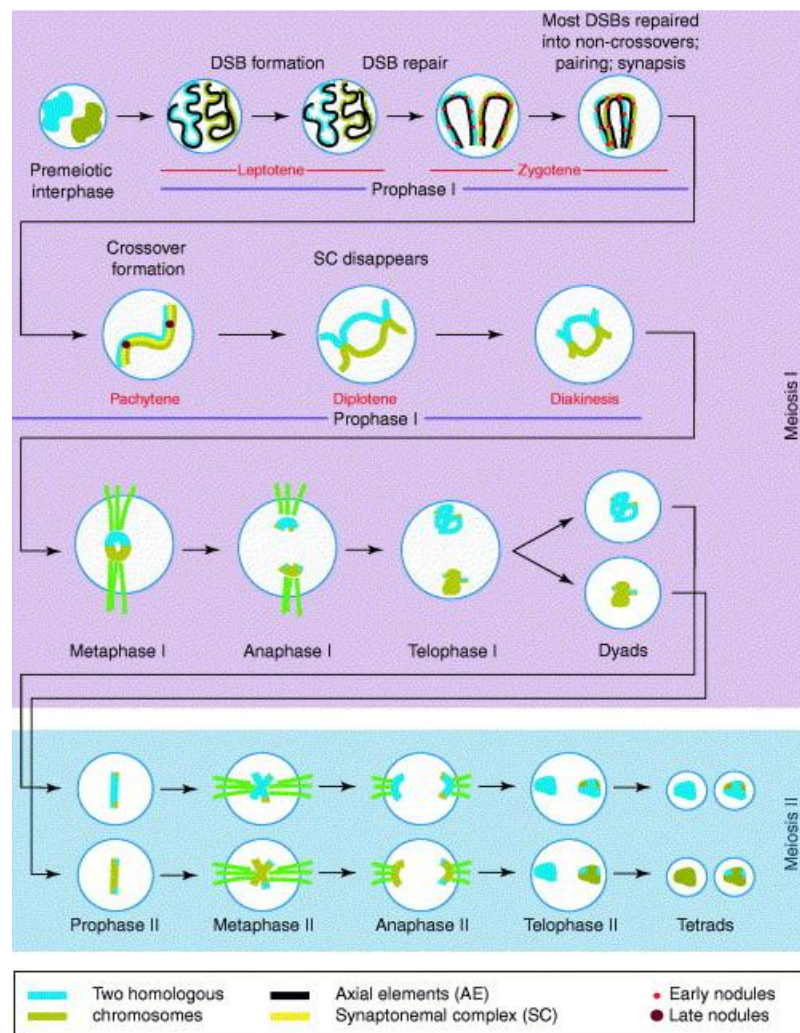


Figura 1.3. Eventos celulares y moleculares que ocurren durante la meiosis. DSB: rupturas de doble hebra en el ADN. Extraído de Pawlowski & Cande (2005).

Una vez culminada la meiosis comienza la espermiogénesis, donde transcurren una serie de cambios estructurales y moleculares que tienen como finalidad la formación de espermatozoides a partir de espermátidas redondas (Parvinen, 1982) (**figura 1.4**). Se distinguen 19 etapas en la espermiogénesis de la rata, 16 en la del ratón, 14 en ungulados y primates, mientras que 12 etapas se han distinguido en la espermiogénesis de carnívoros

(Sutovsky & Manandhar, 2006). La espermiogénesis comprende la elongación de las espermátidas, la formación del flagelo, la pérdida de masa citosólica, la compactación del ADN, la concentración de las mitocondrias alrededor de la pieza media de la cola del espermatozoide, y la generación de estructuras accesorias que harán del espermatozoide una célula especializada en portar el ADN hacia el óvulo de la manera más rápida y eficiente (de Kretser & Kerr, 1988).

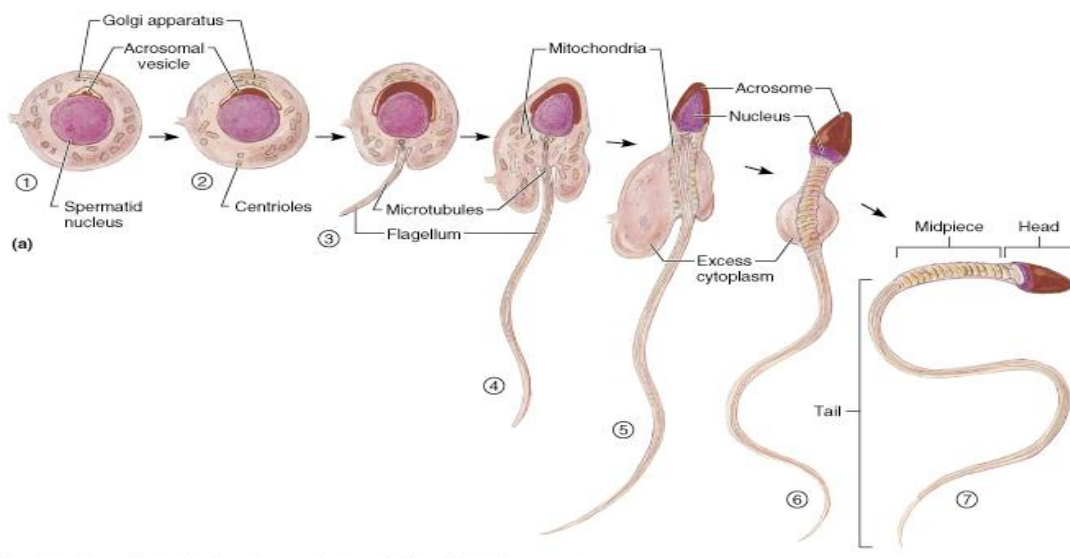


Figura 1.4. Espermiogénesis. Modificado de <http://quizlet.com/8409845/reproductive-and-development-study-guide-flash-cards/>

La compactación del ADN se logra sustituyendo las histonas canónicas unidas al ADN por proteínas de transición (Alfonso & Kistler, 1993) y a continuación por protaminas (Kimmins & Sassone-Corsi, 2005), proteínas con una importante carga positiva que permiten una súper-compactación del ADN. Esto tiene como consecuencia una disminución en el volumen que ocupa el ADN en el espermatozoide, pero a su vez colateralmente trae como consecuencia una disminución casi total de su metabolismo. Ello es contrarrestado por la célula a través de mecanismos de regulación postranscripcional, donde transcritos generados en etapas previas de la espermatogénesis son traducidos a proteínas en etapas más avanzadas de la diferenciación celular (Meistrich *et al.*, 2003).

Como hemos mencionado, durante la espermiogénesis se generan una serie de diferentes estructuras proteicas involucradas en la adecuada formación y función del espermatozoide que incluyen el acrosoma, el acroplaxoma, el *manchette* y el aro marginal,

(Kierszenbaum & Tres, 2004). La espermiogénesis se caracteriza también por un rearrreglo de organelos, como resultado del cual se obtiene un espermatozoide con una cabeza que contiene el núcleo con la cromatina compactada, una pieza media rica en mitocondrias y una cola encargada de la motilidad del gameto. Las mitocondrias, dispuestas de manera helicoidal en la pieza media, constituyen una fuente importante de energía para la motilidad del espermatozoide a través del movimiento flagelar.

No sólo a nivel de la célula germinal aparecen estructuras especializadas. A nivel de las células de Sertoli surgen los complejos túbulo-bulbares y especializaciones ectoplasmáticas, que tienen diferentes funciones como la eliminación de citoplasma excedente de las espermátidas elongadas y el anclaje de las espermátidas previo a los eventos de espermiación, donde los gametos casi maduros son liberados a la luz del túbulo seminífero (Kierszenbaum & Tres, 2004).

Los gametos una vez liberados son dirigidos a través de los túbulos rectos, la *rete testis* y los conductillos eferentes hacia el epidídimo, donde permanecerán estacionados. El epidídimo es primordial para la maduración final y el almacenamiento de los espermatozoides. Distintos tipos de células a nivel del epitelio epididimario regulan las propiedades fisicoquímicas del líquido seminal, confiriendo las características necesarias a los espermatozoides para que sean capaces de fecundar al ovocito.

Organización espacial

Los testículos de los mamíferos se encuentran divididos en gran cantidad de lóbulos dentro de los cuales se sitúan los túbulos seminíferos, que contienen las células de la línea germinal y las células de Sertoli. Los túbulos seminíferos, por su parte, están alojados en un estroma compuesto por células de Leydig, células de la línea linfocitaria, vasos sanguíneos y linfáticos así como terminaciones nerviosas (**figura 1.5**). Estos túbulos se hallan a su vez delimitados por células mioides peritubulares (Davidoff *et al.*, 1990). Las células germinales no sólo requieren de un intrincado ambiente molecular para llevar adecuadamente a cabo la espermatogénesis, sino que también necesitan una arquitectura tridimensional peculiar que facilite el proceso espermatogénico, añadiendo un nuevo orden de complejidad a este proceso de vital importancia.

Las uniones especializadas entre las células de Sertoli generan uno de los principales componentes de lo que se conoce como la barrera hemato-testicular. Dichas uniones, de

tipo adherente y ocluyente, transforman el compartimento adluminal del túbulo seminífero en un lugar aislado, un sitio inmunoprivilegiado en el que existe un delicado control del tráfico de moléculas (Siu & Cheng, 2004). Las células de Sertoli engolfan a las células germinales controlando así su ambiente, nutrición, número y adecuado desarrollo.

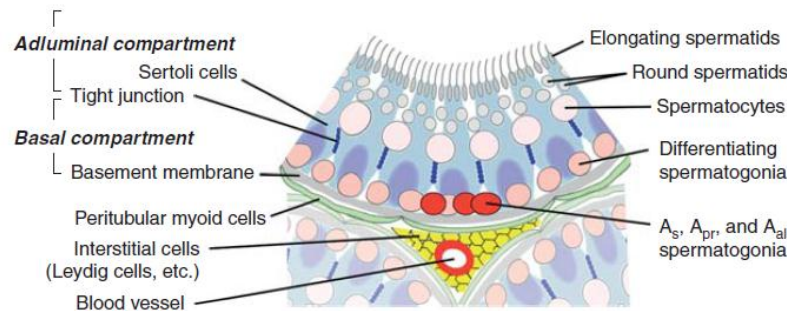


Figura 1.5. Organización espacial del túbulo seminífero. Las espermatogonias y espermátocitos leptoténicos ocupan el compartimento basal, mientras que el resto de los espermátocitos y espermátidas se ubican en la porción adluminal de los túbulos. Extraído de Spradling *et al.* (2011).

En la zona basal del epitelio seminífero se encuentran a las espermatogonias y espermátocitos pre-leptoténicos y leptoténicos, células que aún no han atravesado la barrera hemato-testicular. Atravesando dicha barrera y acercándonos hacia la luz del túbulo se hallan, engolfados por las células de Sertoli a los espermátocitos en etapas más avanzadas, espermátidas redondas y elongadas. Por último, los espermatozoides se localizan en la luz de los túbulos (**figura 1.5**).

Entre ciclos y ondas

Una ciclo espermatogénico corresponde al tiempo que demora una espermatogonia del tipo A en dar origen a un espermatozoide y ser liberado a la luz del túbulo (Barth & Oko, 1989). La primera onda espermatogénica comienza tras el nacimiento y es caracterizada por la aparición secuencial dentro del epitelio seminífero de los distintos tipos celulares que conforman la línea germinal, culminando en la pubertad con la aparición de los primeros espermatozoides (Clermont & Perey, 1957). Según Malkov *et al.* (1998), la meiosis en la rata comienza por la aparición de los espermátocitos leptoténicos (13 dpp) seguida por los primeros espermátocitos cigoténicos (18 dpp), primeros paquitenos (21 dpp), espermátidas redondas (25 dpp) y espermátidas elongadas (32 dpp). Concluyendo la primera onda

espermatogénica, se observan los primeros espermatozoides a los 40 dpp, pudiendo considerarse completamente adulta a la rata de 60 dpp.

Durante la madurez sexual, en los machos se establece la aparición de sucesivos ciclos espermatogénicos en una misma sección del túbulo seminífero y como consecuencia, células germinales en distinto estadio de desarrollo pueden observarse asociadas en una misma sección.

De manera similar al ciclo espermatogénico, el epitelio seminífero presenta una onda. Esta onda se distribuye a lo largo de los túbulos seminíferos y resulta en un desfase en las asociaciones germinales en las que se encuentran distintas secciones del túbulo (Clermont & Leblond, 1955). Se han descrito 6 asociaciones diferentes en el hombre, 12 en el ratón y 14 en la rata (**figura 1.6**). Este desfase permite que el epitelio seminífero produzca espermatozoides de manera continua ya que en cualquier momento dado se encontrarán regiones del epitelio seminífero en proceso de espermiación.

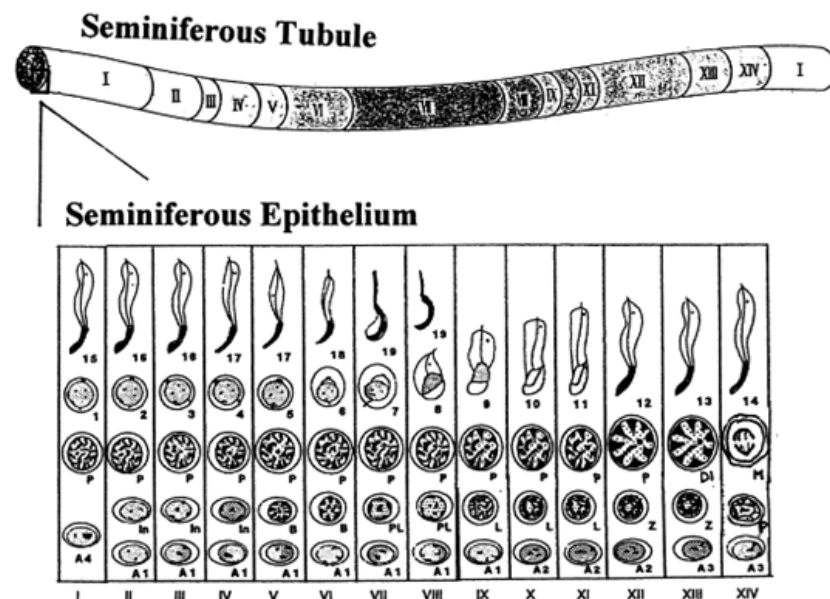


Figura 1.6. Ciclo del epitelio seminífero y diferentes asociaciones celulares en la rata. Extraído de Homma-Takeda *et al.* (2001).

Las distintas asociaciones de células germinales (Clermont & Leblond, 1955) a su vez, se piensa que responden a diferentes requerimientos metabólicos de los diferentes tipos de células germinales (ej. factores de crecimiento, hormonas, etc.) y a la habilidad que tienen las células de Sertoli de cubrir satisfactoriamente los mismos (Cheng & Mruk, 2002 y 2004).

Es por ello también que el número de células germinales dentro del epitelio seminífero está finamente controlado, ya que como hemos mencionado, las células de Sertoli son capaces de cubrir satisfactoriamente las necesidades de un número limitado de células germinales.

Distintos niveles de control

La espermatogénesis transcurre de manera coordinada, gracias a un refinado control que ocurre a distintos niveles. Es controlada a nivel neuroendócrino por el eje hipotálamo-hipofisario a través de hormonas como la gonadotropina, la hormona folículo estimulante (FSH), la hormona luteinizante (LH), la prolactina, hormonas tiroideas y hormona del crecimiento, entre otras (**figura 1.7**).

A nivel local, la espermatogénesis es también afectada por la producción de hormonas como la testosterona, y estrógenos. Las células encargadas de sintetizar estas hormonas con funciones endócrinas y parácrinas son las pertenecientes a la línea somática, entre las que encontramos a las células de Sertoli, células de Leydig y células mioideas peritubulares. La complejidad de esas interacciones se traduce en un proceso altamente regulado de diferenciación celular, el cual es muy sensible a variaciones ambientales.

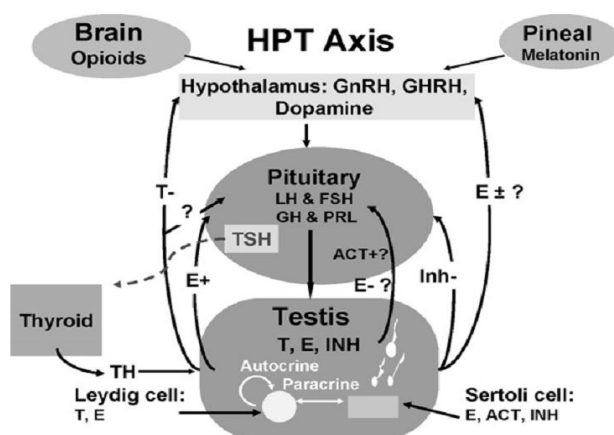


Figura 1.7. Eje hipotálamo – pituitaria – testículo. Melatonina proveniente de la glándula pineal y opioides provenientes del cerebro regulan la secreción de hormona liberadora de gonadotropinas o GnRH, por sus siglas en inglés (*Gonadotropin-releasing hormone*). GnRH regula la liberación de hormona luteinizante (LH) y hormona folículo estimulante (FSH) por parte de la adenohipófisis. La LH a su vez actúa sobre las células de Leydig afectando su producción de testosterona (T) y estrógenos (E). Los principales moduladores de la actividad de las células de Sertoli son FSH, E, inhibina (INH) y probablemente activina (ACT). La hormona liberadora de la hormona de crecimiento (GHRH) regula la producción de hormona de crecimiento (GH) por parte de la adenohipófisis. La dopamina regula negativamente la liberación de prolactina (PRL) por la glándula pituitaria. La hormona estimuladora tiroidea (TSH), por su parte, se produce en la adenohipófisis y modula la liberación de hormonas tiroideas (TH). Extraído de Roser, 2008.

No sólo se coordina la espermatogénesis a través de moléculas provenientes del entorno, sino que también existe una coordinación a nivel intrínseco, entre células germinales descendientes de una misma espermatogonia. Esta coordinación se logra gracias a que estas células germinales, como se explicó antes, se comportan como una cohorte.

La homeostasis del tejido es vital para cumplir con los requerimientos de supervivencia de las células germinales. El ambiente molecular y el control poblacional a nivel de túbulo, fiscalizados en gran parte por las células de Sertoli a través de mecanismos de muerte celular programada (MCP), son de vital importancia (ver capítulo 1.4).

Expresión génica diferencial durante la espermatogénesis

La espermatogénesis es un proceso de diferenciación celular muy complejo en el cual ocurren profundos cambios a nivel morfológico. Esto se logra gracias a la expresión de un repertorio particular de genes y proteínas que se reflejan en fenotipos celulares muy diferentes. Pese a que muchas preguntas permanecen sin respuesta, hoy sabemos que la regulación de la expresión génica durante la espermatogénesis es el resultado de distintos niveles de regulación: intrínseco, interactivo y extrínseco (Eddy, 2002). La regulación intrínseca se refiere a la ejecución de un programa genético evolutivamente conservado que subyace al desarrollo de las células germinales y es responsable de los eventos de diferenciación y morfogénesis que se dan durante la progresión de la espermatogénesis. El siguiente nivel de regulación involucra las interacciones que se dan entre las distintas cohortes de células germinales que coexisten en un estadio en particular y las células de Sertoli. En este “ecosistema” se integran y armonizan múltiples señales provenientes tanto del interior como del exterior del túbulo seminífero lo que permite una modulación interactiva de la expresión de genes en respuesta a una gran variedad de señales endócrinas y parácrinas.

Se ha evidenciado tiempo atrás que durante la espermatogénesis se expresa un repertorio único de genes, así como de ARNm y proteínas (Boitani *et al.*, 1980; Gold *et al.*, 1983). Existe un programa de expresión génica responsable de llevar adelante tanto el proceso de meiosis como el de espermiogénesis. Este programa se caracteriza por la expresión de muchos genes diferentes y variantes transcripcionales únicas, que diferencian a la línea germinal de otros tejidos y tipos celulares presentes en el organismo. Dicho

programa se caracteriza por variaciones en la expresión de genes a lo largo del desarrollo y a lo largo de los diferentes estadios del epitelio seminífero.

La espermatogénesis es un proceso único desde el punto de vista genético en el que diversas estrategias de expresión génica, regulación transcripcional, postranscripcional y regulación traduccional confluyen para llevar a cabo exitosamente un proceso vital en la propagación y evolución de los seres vivos (revisado por Kleene 2001; Geisinger 2008; White-Cooper & Davidson, 2011). Los avances tecnológicos de la última década (técnica de microarreglos) han permitido estudiar los cambios dinámicos en los perfiles de expresión que ocurren durante la espermatogénesis con particular detalle (Chalmel *et al.*, 2007) detectándose un gran número y variedad de transcritos específicos del testículo (Rajkovic *et al.*, 2001; Sassone-Corsi 2002; Yan *et al.*, 2009). A modo de ejemplo, estos estudios permitieron conocer que en el macho el testículo es el órgano que expresa mayor cantidad de genes de manera específica o diferencial (Shima *et al.*, 2004), así como el que exhibe mayor número de isoformas de transcritos, generadas principalmente por procesamiento alternativo (Elliott & Grellscheid, 2006), pero también por el inicio a partir de promotores alternativos o por el uso alternativo de sitios de poliadenilación. Un número importante de esas variantes alternativas codifica para proteínas específicas de la línea germinal, con funciones e incluso localización sub-celular completamente diferentes a las de sus isoformas somáticas. Un ejemplo concreto lo constituye la variante trunca del producto del proto-oncogén *c-kit* expresada en las espermátidas redondas, que carece de importantes dominios que le impiden actuar como receptor tirosín-kinasa, función que desempeña en células somáticas. En cambio, algunas evidencias sugieren que la versión trunca de *c-kit* de los espermatozoides podría participar en la activación de los ovocitos fertilizados (Sette *et al.*, 1997). Otro ejemplo es el de PHGPx, que en tanto en las células somáticas es una enzima citosólica, en las células de la línea espermatogénica, al ser transcripta a partir de un sitio de inicio “corriente arriba” en el ADN, incluye una señal de localización mitocondrial que hace que la versión testicular se localice en la mitocondria (Ursini *et al.*, 1999).

Otra característica sobresaliente de la línea germinal es la elevada tasa de regulación a nivel postranscripcional, lo que es acompañado por niveles inusualmente elevados de transcripción “promiscua” y represión traduccional (*e.g.* Iguchi *et al.*, 2006).

Hoy en día, la técnicas de secuenciación de transcriptomas están haciendo posible avanzar en la caracterización de perfiles de expresión gracias a la generación de masivos

volúmenes de información que, al ser integrados con la información pre-existente, nos permitirán alcanzar un mayor entendimiento de la genética subyacente a la espermatogénesis (Lesch & David, 2012).

1.3. Muerte Celular Programada

Las células de los organismos multicelulares son miembros de una comunidad compleja y altamente organizada. El número de células dentro de esta comunidad se encuentra estrictamente regulado tanto a través del control de la tasa de división celular como de la tasa de muerte celular. La muerte celular programada (MCP) es fundamental en el mantenimiento de la homeostasis, el modelado de diferentes partes del organismo durante el desarrollo, la eliminación de estructuras innecesarias y la remoción de células potencialmente nocivas tales como linfocitos autorreactivos, células infectadas por virus y células tumorales (Thompson, 1995; Ekert & Vaux, 1997; Raff *et al.*, 1998; Lindsten *et al.*, 2000; Feig & Peter, 2007). Históricamente, dos tipos de MCP se han distinguido en células de mamífero, los que pueden ser diferenciados mediante criterios morfológicos (Kroemer, 2005).

Uno de estos tipos de MCP es la apoptosis, caracterizada por cambios en la morfología nuclear como condensación de la cromatina (picnosis) y fragmentación de la misma (cariorrexis), cambios menores en organelos citoplásmicos, y disminución del volumen celular acompañada por la formación de protusiones de la membrana plasmática (*blebbs*) y cuerpos apoptóticos conteniendo material nuclear y/o citoplasmático (Kerr, 1972). Cronológicamente el último paso que caracteriza a la apoptosis es la pérdida de la integridad de la membrana de la célula afectada.

La muerte celular autofágica es caracterizada por la acumulación masiva de autofagolisosomas a nivel citoplásmico, sin picnosis (Baehrecke, 2005). Debe ser diferenciada de la macroautofagia, que se caracteriza por la degradación de los propios componentes de la célula mediante un proceso altamente regulado que conforma una actividad rutinaria tanto para el mantenimiento de la homeostasis, como para el desarrollo y crecimiento celular (Stromhaug *et al.*, 2001).

Día a día, aumenta en complejidad el número y el tipo de fenotipos observados en células que afrontan la muerte celular de manera programada: procesos tales como la entosis (Overholtzer *et al.*, 2007), la muerte celular dependiente de PARP-1 o *parthanatos*

(Andrabi *et al.*, 2008) y paraptosis (Sperandio *et al.*, 2000), que no describiremos aquí en detalle, van surgiendo día a día en el escenario de la MCP.

Por otro lado, aunque estrictamente no se considera un tipo de MCP debemos mencionar a la necrosis como otro tipo de muerte celular, que se caracteriza por una pérdida prematura de la integridad de la membrana plasmática, acompañada por una dilatación del citoplasma y de organelos (Edinger & Thompson, 2004). La necrosis normalmente es causada por factores extrínsecos como infecciones, exposición a toxinas o traumas mecánicos, y es común que este proceso conlleve una respuesta inmune. Hoy en día, más allá de considerarse a la necrosis como un proceso pasivo de destrucción, se la considera como un proceso celular controlado, aunque aún nos encontramos en etapas muy iniciales de su comprensión a nivel molecular (Golstein & Kroemer, 2006). Algunos autores se inclinan por denominar como necroptosis a la necrosis que ocurre de manera ordenada, y en la que participan activamente moléculas (Galluzzi & Kroemer, 2008; Kroemer *et al.*, 2009).

Apoptosis y sus actores

La apoptosis requiere de una inversión energética por parte de la célula, de la activación de diversos actores moleculares y de la expresión de un programa genético altamente regulado (Bröker *et al.*, 2005). En general la apoptosis se concreta a través de dos vías principales, la extrínseca y la intrínseca, aunque existen vías alternativas como la de las perforinas/granzimas (Martinvalet *et al.*, 2005) y la vía de p53, esencial en la regulación del crecimiento celular y la muerte inducida por estrés genotóxico (Vogelstein *et al.*, 2000).

La vía extrínseca se induce por la activación de receptores específicos ubicados en la superficie celular: Fas, TNF, TRADD o TRAIL, que al unirse a ligandos específicos transducen señales hacia el interior celular a través de dominios de “muerte” (Sinha Hikim & Swerdloff *et al.*, 1999). Dicha unión activa enzimas especializadas denominadas caspasas, un conjunto de enzimas que al ser activadas catalizan la ruptura de otras proteínas a nivel de residuos de aspartato.

Las caspasas son mediadores esenciales de los procesos de apoptosis (Degterev *et al.*, 2003; Abraham & Saham, 2004). En primera instancia se activa la caspasa 8, que a su vez activará la caspasa 3 o caspasa efectora (Green, 1998) que se encarga de producir el fenotipo apoptótico (Kerr *et al.*, 1972) a través del clivaje de diferentes dianas moleculares

como PARP, laminas, actina y gelsolina (**figura 1.8**). Estos clivajes en última instancia tienen como efecto el desmantelamiento de la célula de forma controlada y ordenada (Slee *et al.*, 2001).

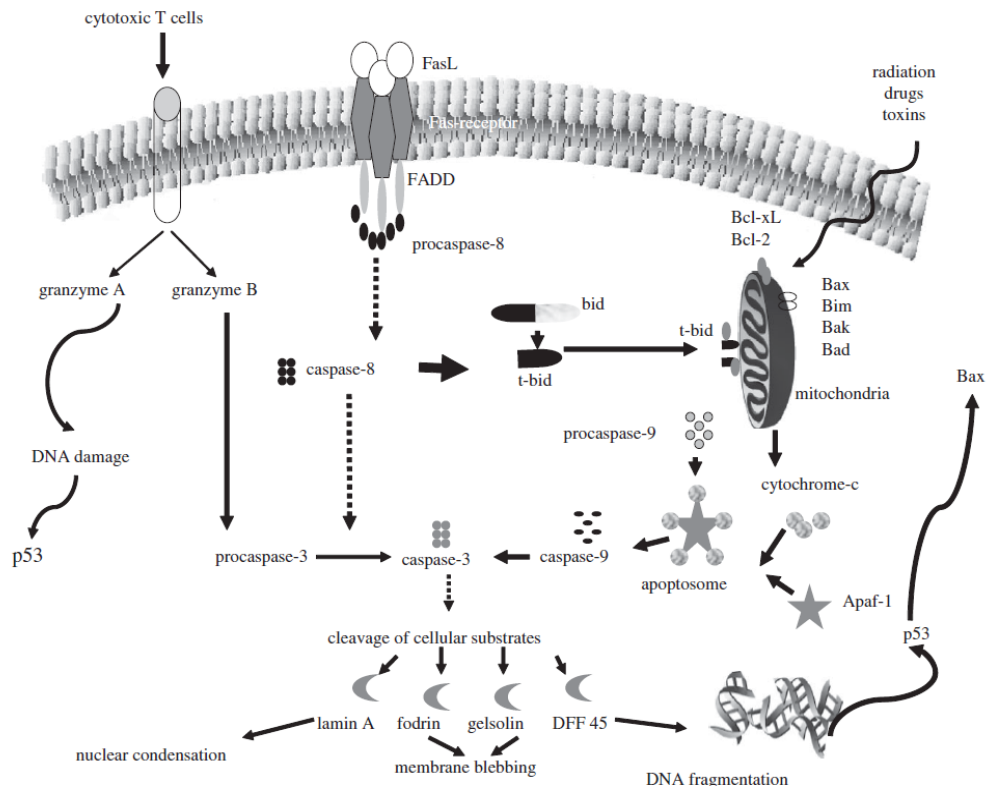


Figura 1.8. Vías y actores de la apoptosis. Extraído de Shaha *et al.* (2010.)

La vía intrínseca o mitocondrial, se activa debido factores como el daño irreversible del ADN o el aumento en la producción de especies reactivas del oxígeno (Danial & Korsmeyer, 2004). La célula es capaz de sensar estos daños y activar mecanismos de MCP mediados por proteínas pertenecientes a la familia BCL-2, que llevan en última instancia a la permeabilización de la membrana mitocondrial externa (MME) y a la liberación de proteínas localizadas en el espacio inter-membrana de la mitocondria hacia el citosol. Dentro de las proteínas liberadas encontramos al citocromo C, SMAC/DIABLO, AIF, EndoG y Omi/HtrA2, que actúan como señales de muerte para activar la MCP (revisado por Kroemer *et al.*, 2007). El citocromo C activa la caspasa 9 a través de la proteína Apaf-1, llevando, nuevamente, a la activación de la caspasa 3 (Acehan *et al.*, 2002; **figura 1.8**). SMAC inhibe la actividad de las IAP (*Inhibition of Apoptosis*), una familia de proteínas que a su vez inhiben activación de la apoptosis (Salvesen & Duckett, 2002). Las proteínas Endo G (Li *et al.*, 2001), AIF (Susin *et al.*,

1999) y Omi/HtrA2 (Suzuki *et al.*, 2001) por su parte, son capaces de activar vías de muerte celular independientes de caspasas, haciendo a los mecanismos de MCP más robustos y redundantes.

Incluso existen otros organelos además de la mitocondria, que se encuentran involucrados en el desarrollo de la apoptosis. Se ha demostrado tanto los lisosomas como el retículo endoplásmico administran la liberación de moléculas que, en última instancia, pueden activar mecanismos de MCP (Guicciardi *et al.*, 2004; Xu *et al.*, 2005).

La familia BCL-2

El gen *Bcl-2* (*B-cell lymphoma-2*), fue descubierto a partir de un linfoma de células B foliculares que portaba una translocación cromosómica t(14:18). En estas células la transcripción de *Bcl-2* se ve drásticamente aumentada por el promotor y potenciador (*enhancer*) del gen de la cadena pesada de inmunoglobulina (Tsujiimoto *et al.*, 1985). El descubrimiento clave fue la determinación del proceso neoplásico en estas células: la sobreexpresión de *Bcl-2* en lugar de promover la proliferación celular, inhibía la MCP (Tsujiimoto *et al.*, 1985).

Con el tiempo, se descubrió toda una familia de proteínas que compartían homología con *Bcl-2*, formada por alrededor de 25 miembros (Zinkel *et al.*, 2006) (**figura 1.9**). Los miembros de la familia comparten la presencia de dominios conservados denominados BH (*Bcl-2 homology*), pudiendo tener hasta 4 de estos dominios (Cory *et al.*, 2003), compuestos por segmentos de α -hélice (Adams & Cory, 1998). Algunos miembros además poseen dominios hidrofóbicos carboxiterminales, que les permiten anclarse a la MME (Nguyen *et al.*, 1993). Sin embargo, no todos los miembros de la familia inhiben MCP como el producto del gen *Bcl-2* (proteínas anti-apoptóticas), sino que algunos actuarían de modo opuesto, promoviéndola (proteínas pro-apoptóticas).

Al parecer el destino final de la célula depende en última instancia del balance entre proteínas pro-apoptóticas y anti-apoptóticas de la familia BCL-2 (Oltvai & Korsmeyer, 1994). A grandes rasgos, los miembros con función anti-apoptótica son *Bcl-2*, *Bcl-xL*, *Bcl-w* y *Mcl-1* y los miembros con función pro-apoptótica son *Bax*, *Bak* y *Bok* (Kuwana & Newmeyer, 2003). Dentro de los miembros pro-apoptóticos se reconoce a su vez un subgrupo denominado *BH3 only*, una clasificación estructural que congrega a proteínas como *Bid*, *Bad*, *Bim*, *PUMA* o *Noxa*, caracterizadas por tener un único dominio BH3 en su composición proteica (**figura 1.9**).

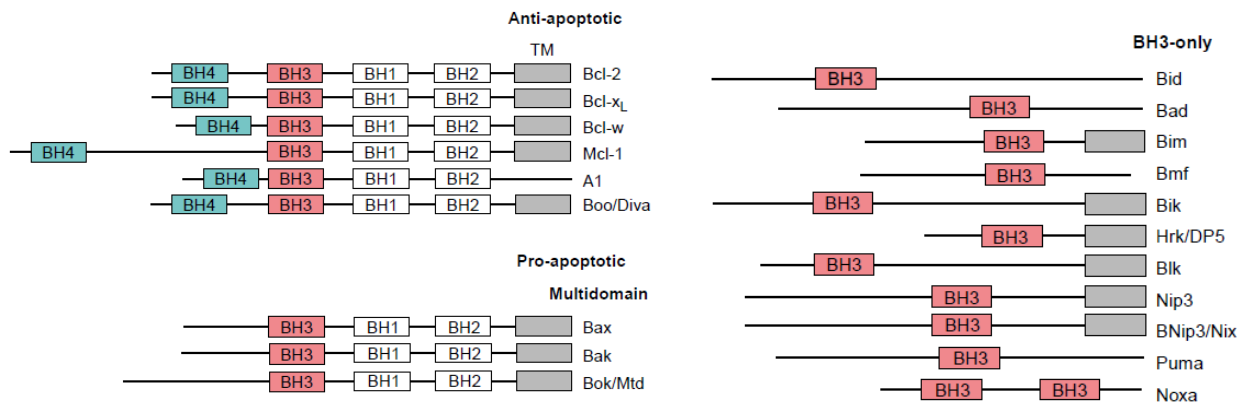


Figura 1.9. Familia de proteínas BCL-2. Los recuadros grises representan dominios de transmembrana. Adaptado de Kuwana & Newmeyer (2003).

Con respecto a las proteínas pro-apoptóticas Bax y Bak, no está claro aún, pero junto con proteínas como VDAC (“voltaje dependiente anion channel”) y ANT (intercambiador de ATP/ADP), controlarían la salida de proteínas localizadas en el espacio intermembrana de la mitocondria (Marzo *et al.*, 1998; Shimizu *et al.*, 1999; Wallace, 2005). Bak se localiza constitutivamente en la MME (Wei *et al.*, 2000; Antonsson *et al.*, 2000) mientras Bax en su estado inactivo es de localización citoplasmática, pero tras su activación sufre modificaciones alostéricas que la dirigen hacia la MME (Gross *et al.*, 1998). Bax y Bak activas, pueden constituir homo/oligómeros capaces de formar poros en la MME.

La importancia de las proteínas pro-apoptóticas de la familia BCL2 (en particular Bax y Bak) fue demostrada en ratones doble *knockout* (KO) (Wei *et al.*, 2001; Zong *et al.*, 2001). Aquellos ratones que lograron superar la muerte durante el desarrollo embrionario, presentaron persistencia de membranas interdigitales, canal vaginal no perforado, acumulación y exceso de ciertos tipos celulares tanto en el sistema nervioso como en el sistema hematopoyético, además de resultar resistentes a múltiples estímulos apoptóticos (Lindsten *et al.*, 2000). No obstante, si bien existen diversas teorías acerca del modo de acción molecular de las proteínas pro-apoptóticas de la familia BCL-2, aún no se han dilucidado completamente los mecanismos subyacentes a la permeabilización de la MME (Zamzami & Kroemer, 2001; Walensky & Gavathiotis, 2011).

Las proteínas anti-apoptóticas de la familia BCL-2 (ver **figura 1.9**), presentan distintos patrones de expresión que pueden variar según el tejido, tipo celular o etapa del desarrollo. Su función principal es la de inhibir la permeabilización de la MME, evitando la formación de homo/oligómeros entre Bax y Bak (Breckenridge & Xue, 2004). Esto lo logran asociándose a

estas moléculas mediante interacciones proteicas, principalmente a nivel de dominios hidrofóbicos inhibiendo, de esta manera, su actividad (Oltvai *et al.*, 1993).

Las proteínas *BH3 only* pueden promover la apoptosis pero no a través de la formación de poros de membrana sino actuando como sensibilizadores celulares (Chipuk *et al.*, 2010). Por ejemplo, en algunas células (clasificadas como del tipo 2), la activación de la caspasa 8 no alcanza los niveles suficientes como para desencadenar la apoptosis mediada por caspasa 3, por lo que la señal requiere de amplificación (Berry, 2007). El encargado de amplificar esta señal es la proteína del tipo *BH3 only* Bid que al ser clivada por la caspasa 8 y transformarse en tBid (por *truncated-Bid*), activa la vía intrínseca de MCP (Luo *et al.*, 1998; Gross *et al.*, 1999). Bid es de localización citosólica en células sanas, mientras que su forma truncada tBid se transloca a la mitocondria (Luo *et al.*, 1998). La importancia de tBid como mensajero entre la vía extrínseca e intrínseca fue demostrada, en primera instancia, en hepatocitos (células del tipo 2) de ratones deficientes en el gen *Bid*, los cuales fueron resistentes a la apoptosis hepatocelular inducida por Fas ligando (FasL, Yin *et al.*, 1999).

Mientras que la activación de Bid se logra a través de su proteólisis (tBid), la activación de Bad, otro miembro perteneciente a la subfamilia de proteínas *BH3 only*, se regula a través de su fosforilación o desfosforilación (Zha *et al.*, 1996). En ausencia de señales de supervivencia Bad se encuentra desfosforilada, secuestrando la proteína anti-apoptótica Bcl-2, y por lo tanto promoviendo la MCP. En presencia de señales de supervivencia, en cambio, Bad se encuentra fosforilada; esto permite a Bad permanecer unida a la proteína 14-3-3, quedando así secuestrada a nivel citosólico (Datta *et al.*, 2000).

Bim, otro regulador de la MCP perteneciente a la subfamilia BH3 "only", ha sido hallado asociado a complejos multiproteicos localizados a nivel de microtúbulos (Lutter *et al.*, 2000). En células sanas, la mayoría de las moléculas de Bim se encuentran asociadas a la cadena liviana de la dineína LC8, y por lo tanto secuestradas y unidas a los microtúbulos. En presencia de estímulos apoptóticos esta interacción se interrumpe permitiendo que Bim interactúe con Bcl-2, neutralizando así su actividad anti-apoptótica (Puthalakath *et al.*, 1999).

¿Qué moléculas son responsables de dirigir a estas proteínas *BH3 only* hacia la mitocondria, de modo que puedan interactuar con Bcl-2? Algunos autores señalan que fosfolípidos presentes en la mitocondria como la cardiolipina son los encargados de esta función (Lutter *et al.*, 2000). Otros aseveran que esta función es llevada a cabo por proteínas

localizadas en la MME. Diferentes proteínas se han postulado como reguladoras del direccionamiento de proteínas *BH3 only* a la mitocondria, entre ellas TOM (Ottl *et al.*, 2009), VDAC (Chacko *et al.*, 2010), y Mtch2 (Zaltsman *et al.*, 2010). Esta última es de especial interés para nosotros, y por ello nos referiremos a ella en detalle en la próxima sección.

Transportadores mitocondriales y Mtch2

La familia de los transportadores mitocondriales comprende un conjunto de proteínas integrales de membrana que se ubican en la membrana mitocondrial interna (MMI) (Arco & Satrustegui, 2005) y catalizan el intercambio de solutos a través de la misma. Estos transportadores proveen un nexo entre el citosol y la mitocondria, indispensable para que ésta lleve a cabo adecuadamente sus actividades metabólicas. Los transportadores mitocondriales comparten la presencia de un motivo tripartito, compuesto de tres repetidos en tándem de una secuencia de 100 aminoácidos conocida como dominio *Mito Carr* (por *mitochondrial carrier*), compuesto por tramos α -hélice conectados a través de regiones hidrofóbicas (Schwarz *et al.*, 2007).

El gen *Mtch2* (*mitochondrial carrier homolog 2*) también denominado *Mimp* (*Met-induced mitochondrial protein*), codifica para una proteína de 33 kDa identificada por primera vez en células de la línea NIH-3T3, como una proteína inducible a través del factor de crecimiento de hepatocitos Met (Yerushalmi *et al.*, 2002). Pertenece a la familia de transportadores mitocondriales por presentar en su secuencia aminoacídica un dominio *Mito Carr* compuesto por 6 regiones transmembrana (Schwarz *et al.*, 2007; Robinson *et al.*, 2012) (**figura 1.10**).

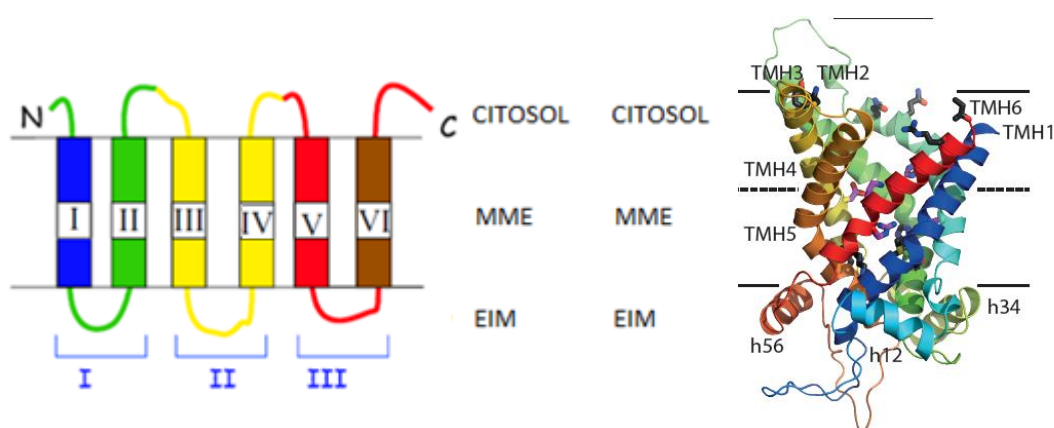


Figura 1.10. Representación esquemática y modelo 3D de Mtch2 de *Mus musculus*. Modificado de Schwarz *et al.* (2007) y extraído de Robinson *et al.* (2012), respectivamente.

Los análisis bioquímicos demostraron que Mtch2 se localiza en la superficie mitocondrial, con sus dominios transmembrana atravesando la MME (Zhang *et al.*, 2000; Zaltsman *et al.*, 2010); esta característica parece ser propia y única de Mtch2 ya que, como hemos mencionado, el resto de los transportadores mitocondriales conocidos se ubican en la MMI.

Ensayos posteriores *in vitro* indicaron que en condiciones de inducción de la apoptosis, Mtch2 forma parte de un complejo multiproteico de 185 kDa que comparte con proteínas pro-apoptóticas como Bak y Bax (Grinberg *et al.*, 2005) (**figura 1.11**). Experimentos en ratones transgénicos indicaron que la depleción del gen dificultaba el reclutamiento de tBid hacia la mitocondria, insensibilizando a las células frente a diferentes estímulos apoptóticos (Zaltsman *et al.*, 2010). Por lo tanto, dichos estudios sugieren que Mtch2 tendría una función crítica en el reclutamiento de tBid a la mitocondria (Gross, 2005; Zaltsman *et al.*, 2010; Katz *et al.*, 2012).

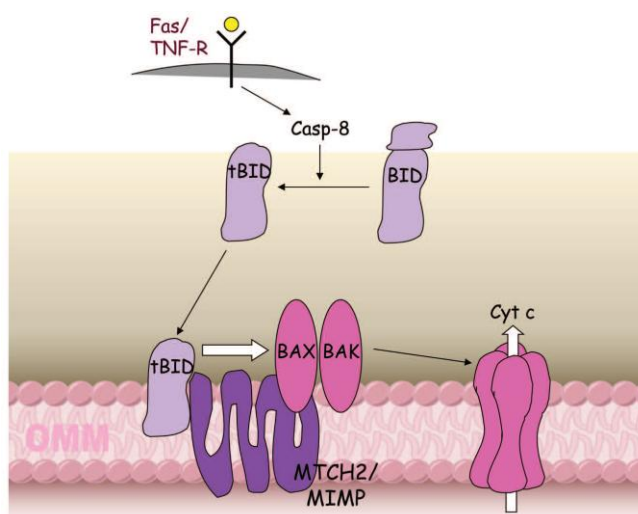


Figura 1.11. Modelo de la actividad de Mtch2 como un receptor para tBid. Representación esquemática de las interacciones que Mtch2 mediaría a nivel de la superficie mitocondrial. Extraído de Gross *et al.* (2010).

Pese a pertenecer a la familia de transportadores mitocondriales, Mtch2 presenta diferencias a nivel de secuencia que podrían explicar su habilidad para asociarse con tBid (Katz *et al.*, 2012). Las últimas evidencias indican que Mtch2 ha perdido su función ancestral como transportador para adquirir nuevas funciones relacionadas con un rol en los mecanismos de señalización apoptóticos (Robinson *et al.*, 2012).

La evidencia apunta a *Mtch2* como un importante orquestador de las interacciones que ocurren entre proteínas pro-apoptóticas, y por lo tanto, como una proteína clave en la comunicación entre las vías apoptóticas extrínseca e intrínseca, que culmina, finalmente, con la liberación de citocromo C al citosol (Coligati & Scorrano, 2010) (**figura 1.11**).

Por otra parte, estudios a nivel genómico han permitido revelar un nexo entre un polimorfismo de *Mtch2* y personas con altos índices de masa corporal (Willer *et al.*, 2009). Cabe destacar que se ha reportado la expresión tanto del gen como de la proteína en tejido adiposo blanco y adipocitos, observándose un aumento sustancial de su expresión en mujeres obesas (Kulyte *et al.*, 2011). Es más, los estudios realizados por Yu *et al.* (2008) indicaron que la reducción de la expresión de *Mtch2* por siRNA causó un aumento en la invasividad *in vitro* de células de cáncer gástrico. Esto nos indica que la función de este gen está aún por ser esclarecida, ya que nos encontramos en etapas primarias de su caracterización.

1.4. Muerte Celular Programada en la Línea Germinal Masculina

Los gametos son los responsables del transporte de la información para la siguiente generación, por lo que debe existir un refinado control de calidad dentro de la “línea de producción” espermatogénica. Las funciones que cumple la MCP en la línea germinal incluyen la regulación del número de células germinales que las células de Sertoli pueden sustentar, la eliminación de células anormales o genéticamente dañadas, y el mantenimiento de la homeostasis tisular (**figura 1.12**).

Durante la gametogénesis masculina hasta un 75% de las células que son producidas por el epitelio son descartadas por apoptosis, tanto en el testículo adulto como durante el desarrollo temprano de la línea germinal masculina (Huckins, 1978; Shaha *et al.*, 2010). Las células germinales masculinas no sólo mueren naturalmente durante el desarrollo normal, sino que también mueren por la influencia de varios compuestos tóxicos y situaciones de estrés (Koji & Hishikawa, 2003). Por ejemplo, la deficiencia de señales de supervivencia causadas por privación de hormonas (Tapanainen *et al.*, 1993; Billig *et al.*, 1995) y la exposición a diferentes tipos de estrés ambiental tales como hipo e hipertermia o radiaciones ionizantes (Blanco-Rodríguez, 2006) generan aumento de muerte celular a nivel de la línea germinal. La temperatura escrotal en los mamíferos es normalmente inferior a la temperatura abdominal, y éste es un requerimiento básico para el adecuado transcurso de

la espermatogénesis (VanDemark *et al.*, 1979). Asimismo, la criptorquidia ha demostrado producir un aumento en la muerte de células germinales (Gambacorta *et al.*, 1979).

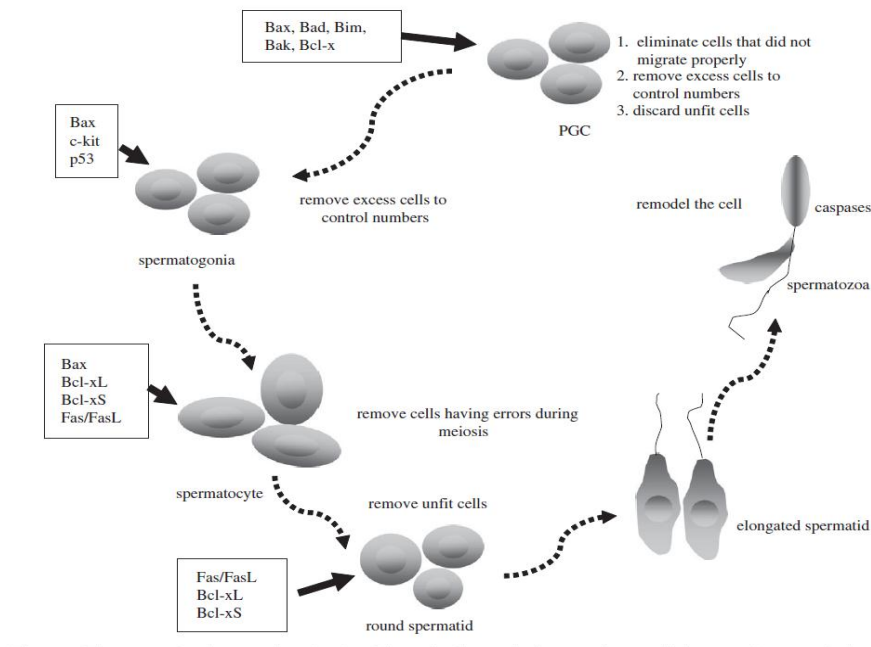


Figura 1.12. En la línea germinal la MCP cumple diferentes propósitos a través de distintos actores moleculares durante la espermatogénesis. PGC- células germinales primordiales. Extraído de Shaha *et al.* (2010).

Las células apoptóticas son reconocidas por las células de Sertoli a través de receptores de membrana *scavenger* del tipo 1 clase B, que detectan la externalización de fosfolípidos de fosfatidilserina en las células apoptóticas (Shiratsuchi *et al.*, 1999). Como consecuencia de ello, las células de Sertoli fagocitan los cuerpos apoptóticos provenientes de las células desmanteladas.

MCP en el establecimiento de la línea germinal y durante la primera onda espermatogénica

El número de células germinales primordiales es regulado por la actividad de proteínas como Bcl-xL y Bax (Rucker *et al.*, 2000). Durante la migración celular hacia la cresta genital en desarrollo, aquellas células que migran de manera inadecuada son eliminadas mediante MCP (Rucker *et al.*, 2000) (ver **figura 1.12**). Una vez establecidos los cordones seminíferos durante los últimos días de gestación, existe un aumento en la MCP a nivel de gonocitos con características predominantemente necróticas (Wang *et al.*, 1998).

La primera onda espermatogénica consiste en la aparición progresiva y ordenada, en tiempos pre-establecidos, de los sucesivos tipos de células germinales representados en el ciclo espermatogénico (Russell *et al.*, 1990). El aumento de la apoptosis durante la primera onda espermatogénica en rata, es un proceso clave para la adquisición de la madurez sexual y la fertilidad de los individuos, en gran parte debido a que es cuando se establece la proporción adecuada de células germinales respecto a las células de Sertoli (Orth *et al.*, 1988). En la rata, este pico de apoptosis afecta principalmente a las espermatogonias del tipo A y espermatocitos en estadio de paquiteno (Jahnukainen *et al.*, 2004), aunque los mecanismos que subyacen a estos procesos complejos son aún tema de estudio (Gutti, 2008). Este pico de apoptosis es dependiente de las caspasas 3, 8 y 9, indicando que tanto la vía extrínseca como la vía intrínseca se encuentran involucradas en la ejecución de este evento (Zheng *et al.*, 2006; Moreno *et al.*, 2006). En animales KO para el gen *Bax*, o que sobre-expresan *Bcl-2* o *Bcl-xL*, este pico de MCP es eliminado generando la acumulación de espermatogonias y espermatocitos, y desencadenando infertilidad de los machos adultos (Knudson *et al.*, 1995; Russell *et al.*, 2002; Yan *et al.*, 2003).

MCP en la espermatogénesis adulta

Para lograr una espermatogénesis cuantitativamente normal, la acción de distintas hormonas es fundamental (Blanco-Rodríguez, 2006). Las células de Sertoli son las encargadas de mediar la supervivencia inducida por hormonas, proveyendo a las células germinales de factores de crecimiento y otras señales regulatorias que interactúan con las espermatogonias y espermatocitos. Estas interacciones son además específicas de los distintos estadios del epitelio seminífero, siendo en la rata la testosterona más crítica en el estadio VII-VIII, mientras que la FSH ha demostrado ser crítica en la supervivencia entre los estadios IX-XIV-VI (Parvinen, 1982; Blanco-Rodríguez & Martínez-García, 1998; Blanco-Rodríguez, 2006) (**figura 1.13**). Por otra parte, otros autores señalan que la FSH es además fundamental para la supervivencia de espermátidas redondas tempranas (Weinbauer *et al.*, 1997).

Dado que los receptores a FSH se localizan principalmente en las células de Sertoli, es a través de ellas que se ejercen los efectos pro-supervivencia que esta hormona produce (Heckert *et al.*, 1991). La FSH induce la síntesis por parte de las células de Sertoli de SCF (*stem cell factor*), que provoca un aumento de la expresión de *Bcl-w* en células germinales,

favoreciendo la supervivencia de las mismas y suprimiendo la activación constitutiva de la vía apoptótica intrínseca (Yan *et al.*, 2000 y 2003; Furuchi *et al.*, 1996). La FSH a su vez inhibe el aumento de la proteína Bok (pro-apoptótica de la familia *BH3 only*) en espermatogonias y otras células germinales (Suominen *et al.*, 2001). La deficiencia de FSH, testosterona y SCF lleva a altos niveles de Bax y Bak, aumentando la apoptosis de espermatogonias y espermatocitos (Yan *et al.*, 2000a).

La testosterona es considerada la hormona principal responsable de la iniciación y mantenimiento de la espermatogénesis, siendo clave para la maduración de los espermatocitos y de las espermátidas (O'Donnell *et al.*, 1996). La ausencia de testosterona durante la adultez de la rata provoca un aumento de la apoptosis principalmente a nivel de espermatocitos pre-leptoténicos y paquiténicos en estadio VII, junto con un deterioro de espermátidas en etapas 7-8 de la espermiogénesis (Nandi *et al.*, 1999) (ver **figura 1.13**).

En cuanto a la función de la LH, se ha demostrado que la inmuno-neutralización de la misma produce un incremento de la apoptosis en el epitelio seminífero (Marathe *et al.*, 1995). Incluso los estrógenos regulan la MCP en la línea germinal (O'Donnell *et al.*, 2001); ratones KO para el gen de la aromatasa (ArKO) que carecen de la capacidad de transformar la testosterona en estrógenos, tienen defectos en la espermatogénesis asociados a un incremento en la apoptosis de células germinales (Robertson *et al.*, 2001).

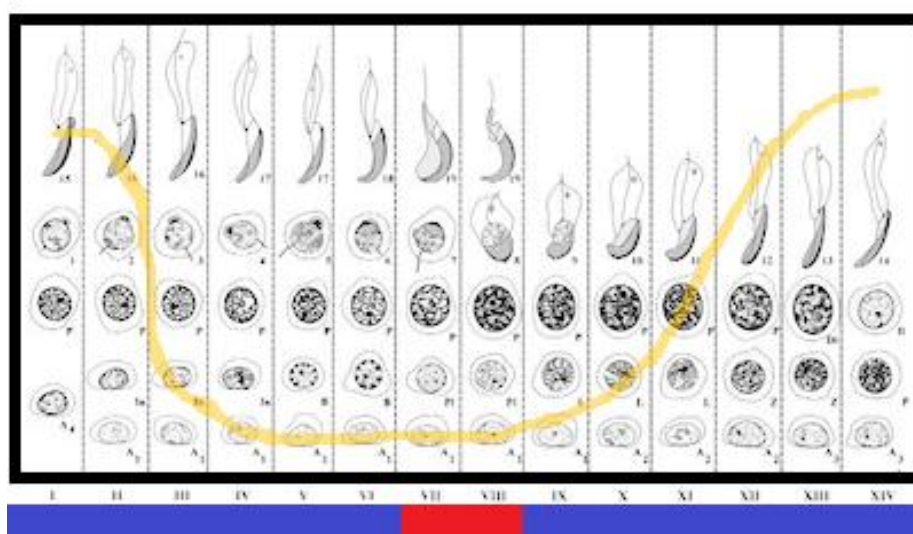


Figura 1.13. Diagrama mostrando la distribución de los tipos de células germinales que sufren MCP en el testículo de la rata. La línea amarilla representa el nivel relativo de apoptosis espontánea según las diferentes asociaciones celulares del túbulo seminífero. En rojo se indican aquellos estadios más susceptibles a la apoptosis por privación de testosterona, mientras que en azul se señalan las células cuya supervivencia es favorecida por la presencia de FSH.

En el testículo adulto de la rata, se eliminan espontáneamente por apoptosis principalmente espermatogonias y espermatocitos. Según Ruwanpura *et al.* (2007), los mayores niveles de apoptosis se observan en espermatocitos en estadios IX–XIV. A nivel de espermatogonias las más afectadas son las tipo A2-A4 en estadios XII-XIV y I respectivamente, mientras que rara vez se aprecia apoptosis en espermatogonias A1 (Kerr, 1992). A nivel de espermatocitos, aquellos en los que se observan mayores niveles de apoptosis son espermatocitos II en estadio XIV, y en menor grado cigotenos tempranos (estadio XII) y espermatocitos en transición cigoteno-paquiteno (estadios XIV-I) (Wing & Christiansen, 1982; Johnson *et al.*, 1984; Allan *et al.*, 1992) (**figura 1.13**). El patrón de células que mueren de manera espontánea es similar en mamíferos de diferentes órdenes, con la mayor parte de las células apoptóticas localizadas en estadios equivalentes (Blanco-Rodríguez, 2002). En contraste, la muerte de espermátidas así como de los espermatocitos y espermatogonias en los estadios que no se mencionaron, son eventos muy raramente observados durante la espermatogénesis normal (Blanco-Rodríguez, 2002).

En términos generales, se sabe poco acerca de la apoptosis en las espermátidas (Kerr & de Kretser, 1974; Jegou, 1991; Baum *et al.*, 2005). En condiciones naturales a nivel de espermátidas elongadas está descrita la activación de vías apoptóticas, cuya función más allá de la muerte celular se asocia con la formación de los cuerpos residuales que se generan durante la espermiación (Baum *et al.*, 2005). En *Drosophila* la inhibición de caspasa 3 provoca defectos en la espermiogénesis llevando a la acumulación de citoplasma en los espermatozoides (Arama & Steller, 2003), e indicando que moléculas pertenecientes a la maquinaria de MCP están involucradas en aspectos de la espermiogénesis. Bajo condiciones patológicas, en individuos (roedores) que presentan problemas para sobrellevar adecuadamente la espermiogénesis, se aprecia fragmentación del ADN a nivel de espermátidas redondas y finalmente azoospermia (Tesarik *et al.*, 1998; Jurisicova *et al.*, 1999).

Pujianto y colaboradores demostraron que la supervivencia de los espermatozoides es un proceso dependiente de la hormona prolactina, y mediado por la proteína Bad (Pujianto *et al.*, 2010). Pero, ¿tienen los espermatozoides la capacidad de morir por apoptosis? No existen claras evidencias de que se eliminen espermatozoides por MCP, aunque sí se han observado distintos marcadores apoptóticos como caspasa 3, 8 y 9 activas (Weng *et al.*, 2002), receptor Fas, externalización de fosfatidilserina y rupturas de cadena en

el ADN (Blanc-Layrac *et al.*, 2000; Sakkas *et al.*, 2002). En espermatozoides que presentan algunos de estos marcadores apoptóticos se observa pérdida de motilidad, lo que desde un punto de vista funcional los elimina de la competencia por la fertilización (De Iulius *et al.*, 2009).

Las distintas moléculas involucradas en la MCP presentan distintos perfiles de expresión

La proteína FasL es expresada por las células de Sertoli (Bellgrau *et al.*, 1995), mientras que el receptor Fas se localiza en las células germinales. Aquellos cambios que afectan al sistema de señalización Fas/FasL generan defectos en la espermatogénesis, afectando la calidad de los gametos producidos en la línea germinal (Francavilla *et al.*, 2002).

Tanto Bcl-2 como Bcl-w, Bcl-xl, Bax, Bad y Bak se expresan en el testículo, y la variación dinámica entre los perfiles de expresión de estas proteínas es determinante en los eventos apoptóticos que ocurren durante la primera onda espermatogénica [entre los 16-25 días posparto (dpp) en la rata] y durante la adultez (Rodríguez *et al.*, 1997; Yan *et al.*, 2000; Jeyaraj *et al.*, 2003) (**figura 1.12**).

Bcl-2 se expresa únicamente en las células de Sertoli. Esta particularidad podría explicar por qué las mismas son menos sensibles a estímulos apoptóticos que las células germinales (Yan *et al.*, 2000a). Mientras que Bcl-2 no se expresa en las células germinales (Hockenbery *et al.*, 1991), Bcl-xl parece estar restringida a las espermátidas (Krajewski *et al.*, 1994). Ratones transgénicos que sobreexpresan las proteínas Bcl-xl, Bcl-w o Bcl-2 en sus células germinales presentan una espermatogénesis anormal en el adulto, acompañada por esterilidad, como resultado de la inhibición de la primera onda de apoptosis que, como hemos visto, juega un rol preponderante en el control de la densidad celular y el mantenimiento de la homeostasis tisular en el testículo (Parvinen, 1982; Rodríguez *et al.*, 1997).

Los estudios de Yan *et al.* (2000) muestran que los niveles de expresión de Bax a nivel del testículo aumentan desde el nacimiento hasta los 20 dpp, para luego decrecer y mantenerse en niveles bajos en el adulto. Bak, en cambio, presenta niveles constantes de expresión en distintos momentos del desarrollo. Por otra parte, los niveles de Bad aumentan entre los 10 y 20 dpp, para luego mantenerse constantes durante la adultez. Mientras que Bax se puede inmunolocalizar a nivel citoplásmico en células de Sertoli, espermátogonias y

espermaticos, Bax no se observa a nivel de células de Sertoli. Los mayores niveles de expresión de Bax y Bak respecto a Bcl-w observados en espermatogonias y espermaticos podrían explicar la mayor predisposición de estos tipos celulares a activar los mecanismos de MCP (Yan *et al.*, 2000a).

Ni Bax, Bak ni Bcl-w se expresan en espermáticas. Esto plantea la posibilidad de que otros miembros de la familia BCL-2 tomen su lugar, y de hecho existen datos acerca de la expresión de Bcl-xl (**figura 1.12**) y Diva en dicho tipo celular (Krajewski *et al.*, 1994; Inohara *et al.*, 1998).

Otros ejemplos de proteínas de la familia BCL-2 involucradas en la gametogénesis son Bim, Bik, Boo y Diva. Ratones doble KO $Bim^{-/-}$ y $Bik^{-/-}$ presentan durante la adultez un bloqueo de la espermatogénesis, evidenciándose un desajuste en la homeostasis tisular que desemboca en infertilidad de los adultos (Coultas *et al.*, 2005).

1.5. Antecedentes directos de nuestro grupo de trabajo: Mtch2 en el testículo

Durante un experimento de *mRNA Differential Display* (Liang *et al.*, 1993) llevado a cabo en el Departamento de Biología Molecular del IIBCE, se comparó la presencia de ARNs mensajeros (ARNm) de testículo de rata (*Rattus norvegicus*) adulto joven (40 dpp) expresados diferencialmente en poblaciones celulares altamente enriquecidas en células meióticas (espermaticos paquiténicos) en relación a las células posmeióticas (espermáticas redondas). Como resultado de dicho experimento se aislaron, purificaron y reamplificaron 40 bandas de ADN copia (ADNc) obtenidas como diferenciales de uno u otro tipo celular, en experimentos por duplicado (Geisinger, 2003). El ADN de varias de las bandas obtenidas fue secuenciado, y las secuencias obtenidas se analizaron por comparación con las secuencias presentes en los bancos de datos.

Una de las bandas obtenidas, diferencial de espermaticos paquiténicos en comparación con las espermáticas, resultó complementaria a parte de la región 3' UTR del gen *Mtch2* de la rata. Con el fin de confirmar el patrón de expresión diferencial observado en el *mRNA Differential Display* para esta banda, de 327 pb, se recurrió a la técnica de RT-PCR a bajo número de ciclos (semicuantitativa). La elección de esta metodología se basó en que dada la cinética de acumulación de los productos de PCR, una vez que se han fijado las temperaturas y los tiempos del ciclo, la fase exponencial (que refiere al período temprano de

ciclos en que los productos se acumulan de forma exponencial) puede usarse como una medida comparativa aproximada de la cantidad de producto presente, al correr los productos en geles de agarosa conteniendo bromuro de etidio (Cha & Thilly, 1995).

Se diseñó una reacción de RT-PCR para amplificar parte de la secuencia aislada a través de un producto de amplificación de 183 pb contenido dentro de la secuencia de 327 pb. Para ello se partió de ARN de espermatoцитos paquiténicos, por un lado, y espermátidas redondas, por otro. A su vez, con el objeto de analizar si se trataba de un gen de expresión exclusiva o mayoritaria del testículo adulto en comparación con otros tejidos y etapas del desarrollo, se incluyó ARN total de testículo adulto, de testículo de ratas macho neonatas de 1 día, y de otros 9 tejidos de la rata, incluyendo ovario y epidídimo. Todos los experimentos se realizaron por duplicado (tanto la transcripción reversa como el PCR) partiendo de muestras independientes de ARN (**figura 1.14.A**). Como control de calidad de los distintos ARN se amplificó la secuencia de un gen constitutivo (β -actina) a alto número de ciclos, siempre partiendo de la misma cantidad de molde (**figura 1.14.B**).

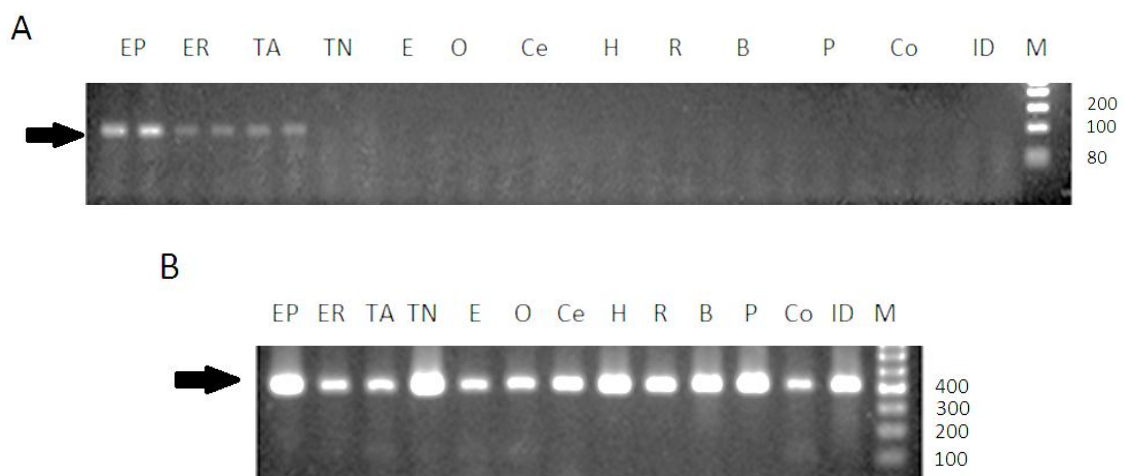


Figura 1.14. *Mtch2* se expresa diferencialmente en espermatoцитos paquiténicos respecto a espermátidas redondas, y en el testículo adulto respecto a otros tejidos y etapas previas del desarrollo. A. Gel de agarosa teñido con bromuro de etidio en que se migraron los productos de amplificación por RT-PCR semicuantitativa de un fragmento del ADNc de *Mtch2*. Cantidad de ciclos de PCR: 18. Se comparan los niveles de expresión en 13 tipos celulares y/o tejidos, por duplicado (los duplicados están corridos en carriles adyacentes). EP- espermatoцитos paquiténicos, ER- espermátidas redondas, TA- testículo total de adulto, TN- testículo total de neonato, E- epidídimo, O- ovario, Ce- cerebro, H- hígado, R- riñón, B- bazo, P- pulmón, Co- corazón, ID- intestino delgado, M- Marcador de peso molecular *GeneRuler 100pb DNA Ladder* (Fermentas). B. Gel de agarosa teñido con bromuro de etidio en que se migraron los productos de amplificación de un fragmento del ARNm de la β -actina en los mismos tipos celulares y tejidos, a 40 ciclos. En ambos geles la flecha señala los productos de amplificación.

En la **figura 1.14.A** se observa amplificación de parte de la secuencia de *Mtch2* a bajo número de ciclos en espermátocitos paquiténicos, espermátidas redondas y testículo adulto. Los niveles de expresión son mayores en espermátocitos paquiténicos con respecto a espermátidas redondas, confirmando el patrón diferencial obtenido en el *mRNA Differential Display*. Por otro lado, la amplificación diferencial de la secuencia de interés en testículo adulto en relación al testículo de neonatos, y respecto a otros tejidos donde no se aprecia amplificación de *Mtch2*, nos sugiere que este gen no sólo se expresa de manera diferencial entre espermátocitos paquiténicos y espermátidas redondas, sino que los niveles de transcripción del gen aumentan junto con el arribo de la madurez sexual en la rata, y que la expresión de *Mtch2* es diferencial del testículo en relación a los otros tejidos analizados.

Resumen de los antecedentes

*A lo largo de estas páginas se han expuesto nociones básicas acerca de la espermatogénesis, así como de la importancia de la MCP en la formación de los seres vivos y en el establecimiento de la línea germinal masculina. También se ha demostrado que los patrones de expresión de las distintas moléculas involucradas en la apoptosis varían en la línea germinal según tipo celular y según la etapa del desarrollo. Se ha destacado la importancia de la acción de estas moléculas y cómo su ausencia o desbalance puede tener profundas implicancias sobre la homeostasis tisular y, por lo tanto, sobre las propiedades cualitativas y cuantitativas de la espermatogénesis. Teniendo en cuenta que *Mtch2* es un gen que se expresa diferencialmente en la profase meiótica masculina respecto a células posmeióticas en la rata adulta joven, y dada la evidencia existente acerca del posible rol de *Mtch2* podría estar involucrada en la interconexión entre diferentes vías de MCP, nos pareció interesante estudiar el patrón de expresión de *Mtch2* en el testículo de la rata y su posible relación con la MCP en este tejido.*

HIPOTESIS, OBJETIVOS Y ABORDAJE

2.1 Hipótesis

La hipótesis general de trabajo es que el gen *Mtch2*, diferencialmente expresado durante la espermatogénesis de la rata, codifica una proteína presuntamente apoptótica.

2.2 Objetivo general de la tesis

El objetivo general es aportar conocimiento original sobre los mecanismos moleculares subyacentes a la espermatogénesis de los mamíferos, en particular al importante rol que la apoptosis desempeña durante la misma.

Objetivos específicos

Con el fin de lograr dicho objetivo general, nos propusimos los siguientes objetivos específicos:

1. Caracterizar la secuencia del ARNm de *Mtch2* en el testículo, y determinar la presencia o ausencia de isoformas.
2. Estudiar el perfil de expresión de *Mtch2* tanto a nivel de ARN mensajero como de su producto proteico en el testículo en comparación con otros tejidos, en diferentes etapas del desarrollo testicular y en los diferentes tipos celulares pertenecientes a la línea germinal.
3. Analizar la expresión y localización de *Mtch2* en relación a la MCP, bajo condiciones normales del desarrollo testicular y bajo condiciones de inducción de MCP.

2.3 Abordaje

Con respecto al objetivo específico 1, para lograr una caracterización en profundidad es necesario conocer la secuencia expresada por *Mtch2* a nivel de espermatoцитos paquiténicos dado que nuestros antecedentes indican que en este tipo celular en particular el gen es expresado de manera diferencial. La metodología se basará en el rastreo de la secuencia expresada por *Mtch2* en una genoteca obtenida a partir de espermatoцитos paquiténicos, esperando poder determinar la presencia o no, de nuevas isoformas de *Mtch2*.

Es importante determinar la presencia o ausencia de isoformas que puedan alterar características importantes del producto proteico y como consecuencia puedan afectar su función.

En relación al segundo objetivo, basándonos en las diferencias cuantitativas observadas en primera instancia a nivel de ARNm, pretendemos profundizar en el estudio del patrón de expresión del gen descrito en los antecedentes, así como caracterizar el patrón de expresión a nivel proteico. Mediante técnicas de inmunolocalización que permitan detectar diferencias cuantitativas y cualitativas de expresión (Western blot, inmunohistoquímica, técnicas citométricas), esperamos corroborar que Mtch2 se expresa diferencialmente durante la espermatogénesis de la rata, con mayores niveles de expresión en el testículo adulto respecto a etapas previas del desarrollo y en espermátocitos paquiténicos respecto a espermátidas redondas. En conjunto con el primer objetivo específico, pretendemos aportar información original acerca del perfil de expresión Mtch2 en el marco de la espermatogénesis.

Considerando tanto la posible función de Mtch2 en relación con la apoptosis como la importancia de la MCP a nivel del desarrollo de la línea germinal, buscamos estudiar si el perfil de expresión de Mtch2 en el marco de la espermatogénesis de la rata puede relacionarse con la expresión de marcadores conocidos de la apoptosis (objetivo específico 3). Empleando técnicas clásicas de estudio de MCP, esperamos averiguar si existen evidencias que relacionen a Mtch2 con la MCP a nivel de la línea germinal.

MATERIALES Y METODOS

3.1 Animales

Todos los animales utilizados fueron ratas de la especie *Rattus norvegicus* cepa Sprague-Dawley, criadas en el bioterio del IIBCE a temperatura constante de 23°C, ciclo de luz/oscuridad de 12/12 horas y alimentación *ad libitum*. Se utilizaron individuos macho entre los 7 dpp y 60 dpp. Todos los animales fueron sacrificados de acuerdo a las condiciones establecidas por la Comisión Honoraria para la Experimentación Animal (CHEA, actualmente CNEA) por sobredosis con pentobarbital sódico y posterior dislocación cervical. A continuación se procedió a la disección de los animales, extrayendo los testículos y, en algunos casos, también otros tejidos (ver Resultados). Para el caso de las disecciones de testículo, éstos se despojaron de la túnica albugínea previo a cualquier procesamiento.

Para los ensayos de hipertermia moderada se procedió puntualmente según lo descrito en 3.7.

Se contó con protocolo experimental aprobado por la CHEA y por la Comisión de Ética del IIBCE (número de expediente 004/09/2011) para todos los experimentos llevados a cabo.

3.2 RT-PCR

Retrotranscripción (RT)

Para realizar la reacción de RT se partió de ARN de rata previamente extraído de diferentes tejidos de adulto (40 dpp): testículo, epidídimo, ovario, cerebro, hígado, riñón, bazo, pulmón, corazón e intestino delgado, así como también de testículo de neonatos (1 dpp). Además se incluyó ARN extraído a partir de dos poblaciones celulares diferentes de testículo de 40 dpp, previamente obtenidas mediante el método de elutriación (ver Geisinger *et al.*, 1996), una enriquecida en espermatozoides paquiténicos y la otra en espermátidas redondas. Partiendo de la misma cantidad de ARN para todas las muestras (1 µg por cada reacción), se llevó a cabo la mezcla de RT mediante el agregado de la enzima transcriptasa inversa RevertAidTM M-MuLV (Fermentas, 100 unidades por cada reacción) en el volumen correspondiente de buffer de la enzima, junto con cebadores oligo dT₁₈(IDT, 0,25

µg por cada reacción), dNTPs (0,25 mM de una mezcla de los 4 desoxirribonucleótidos por cada reacción) e inhibidor de ribonucleasas RiboLock™ (Fermentas, 5 unidades por cada reacción), y completando el volumen final a 10 µl con agua ultrapura tratada contra ARNasas con dimetil-pirocarbonato (DMPC) al 0,1% según el procedimiento habitual (Sambrook *et al.*, 1989).

Se hibridó el ARN junto con los cebadores oligodT durante 5 min. a 70°C antes de agregar los reactivos restantes de la mezcla, incorporando la enzima en último término. La reacción de RT se llevó a cabo en termociclador Perkin-Elmer (GeneAmp PCR System 2400 que abarcó las siguientes fases: 1) 5 min. a 37°C; 2) 1 hora de síntesis de ADNc a 42°C y; 3) 10 min. a 70°C para inactivar la enzima.

PCR

Para las reacciones de PCR se utilizaron como molde 2 µL de cada uno de los ADNc obtenidos de la reacción de RT. Se amplificó parte de la secuencia de *Mtch2* con la enzima ADNTaq polimerasa (Fermentas, 1 unidad por cada reacción) en el buffer provisto por la enzima junto con dNTPs (concentración final 0,5mM conteniendo los 4 desoxirribonucleótidos por cada reacción), MgCl₂ (concentración final 2,5 mM por cada reacción), y cebadores específicos (concentración final 0,5 µM de cada uno por cada reacción): cebador *Forward* 5'-CCACCTAGAGGAGGATGAG-3' y cebador *Reverse* 5'-AAATGTCACTGTCCTGCTC-3'. Dichos cebadores amplifican un producto de 183 pb a nivel de la región 3' del gen *Mtch2*, contenido dentro de la secuencia de 329 pb aislada a partir del experimento de *mRNA Differential Display*.

En el mismo termociclador indicado más arriba se realizaron 40 ciclos de 30 seg. de desnaturalización a 92°C, 30 seg. de *annealing* a 57°C, y 30 seg. de amplificación a 72°C, con una etapa de extensión final de 7 min. a 72°C. Como control negativo se realizó una reacción idéntica, pero sustituyendo el ADNc por un volumen equivalente de agua ultrapura estéril.

Los productos amplificados por PCR fueron separados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % en buffer TAE (Tris 40 mM pH 8,0, ácido acético 20 mM, EDTA 1 mM) conteniendo bromuro de etidio al 1%, y se detectó el ADN por visualización bajo transiluminador de luz ultravioleta (UV).

3.3 Rastreo en genoteca de ADNc de espermatozoides paquítenicos

Para el rastreo se utilizó una sonda basada en la secuencia del fragmento de ADNc de *Mtch2* obtenido a partir del experimento de *mRNA Differential Display*. El rastreo se llevó a cabo en una biblioteca de ADNc obtenida previamente en nuestro laboratorio partiendo de ARNm extraído de poblaciones celulares altamente enriquecidas por elutriación en espermatozoides paquítenicos de rata macho adulta (39-41 dpp) (Meistrich, 1981). La biblioteca se había sintetizado utilizando el kit “ZAP-cDNA Synthesis” (Stratagene), de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Geisinger, 2003).

Rastreo preliminar por PCR de clones conteniendo la secuencia de *Mtch2*

Se llevó a cabo un rastreo preliminar de la secuencia de *Mtch2* en la genoteca mediante la técnica de PCR. Se partió de distintas diluciones de la genoteca, y se utilizó el ADN contenido dentro de las cápsidas como molde para la reacción de PCR.

Previo al agregado de la mezcla de PCR (mismas condiciones de la Sección 3.2, PCR), se añadió una etapa de desnaturalización de las cápsidas virales, que consistió en un ciclo de calentamiento a 95°C durante 5 min., para luego continuar con 40 ciclos de 30 seg. de desnaturalización a 92°C, 30 seg. de *annealing* a 57°C, 30 seg. de amplificación a 72°C y, por último, una etapa de extensión final de 7 min.

Marcado de la sonda

La banda de ADNc del experimento de *mRNA Differential Display*, de 327 pb y correspondiente a parte de la región 3' UTR del gen *Mtch2*, se encontraba clonada en un plásmido pGEM-T (Promega), dentro de células *Escherichia coli* XL1-Blue transformadas y almacenadas en glicerol a -80°C. Una alícuota del glicerol se estrió sobre placas de Petri conteniendo LB agar (10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura y 10 g de NaCl por litro de medio, pH 7,0, con el agregado de 15 g de agar-agar por litro de medio)-ampicilina (50 µg/mL) y se dejó crecer o.n. a 37°C en estufa. Luego de una segunda estría sobre LB-ampicilina, se picó una colonia para inocular 25 mL de medio líquido LB-ampicilina (50 µg/mL), incubándose o.n. con agitación a 37°C. Alcanzada una $DO_{600}=1$, se purificó el ADN plasmídico utilizando el kit de purificación de *Qiagen Plasmid Midi Kit* de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Finalmente el ADN se resuspendió en 200 µL de Tris-Cl 10 mM

pH 8,5. Se chequeó el estado del plásmido por electroforesis en gel de agarosa al 0,8% en buffer TAE conteniendo bromuro de etidio, y se visualizó bajo transiluminador de luz UV.

Se realizó una digestión del plásmido para liberar el inserto. Ésta se llevó a cabo con las enzimas *Apal* y *PstI* (Fermentas). Dada la incompatibilidad de buffer y temperaturas óptimas de acción de ambas enzimas, se realizaron dos digestiones secuenciales. La digestión con *Apal* se llevó a cabo en buffer *Blue* (Fermentas) a 30°C, en tanto la digestión con *PstI* se efectuó en buffer *Orange* (Fermentas) a 37°C. Se utilizó una relación de 3 unidades de enzima por cada μg de ADN plasmídico, y se efectuó cada digestión durante 75 min. Se verificó el tamaño del inserto contenido en el plásmido por electroforesis en gel de agarosa al 1,5% en buffer TAE, con bromuro de etidio.

El producto de la digestión se purificó cortando la banda de interés a partir de un gel preparativo al 1,5 % de agarosa en TAE con bromuro de etidio. Para la elución de la banda se utilizó el kit *Wizard SV Gel Clean Up Sys* (Promega) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El ADN total eluído fue resuspendido en un volumen final de 50 μL de Tris-Cl 10 mM pH 8,5.

La sonda de ADN marcada con digoxigenina fue sintetizada utilizando como molde el ADN eluído. La síntesis de la sonda se realizó mediante el kit *DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit* (Roche) durante 20 horas a 37°C partiendo de 800 ng de ADN molde, y siguiendo las instrucciones del manual. La eficiencia del marcado se midió de acuerdo a lo indicado en el kit.

Plaqueo de unidades formadoras de playas de lisis (ufp), transferencia y fijación

Los plaques se realizaron siguiendo el protocolo del *ZAP-cDNA Synthesis kit*. Brevemente, se iniciaron cultivos de células de *E. coli* XL1-Blue en medio LB líquido suplementado con maltosa (0,2%) y MgSO_4 (10 mM), se dejaron crecer hasta alcanzar una $\text{DO}_{600\text{nm}}$ de 0,5-0,6, se centrifugaron a 6000 rpm (10 min., 4 °C) y se resuspendieron en MgSO_4 (10 mM) a $\text{DO}_{600\text{nm}}$ de 0,5. Por cada placa de Petri (\varnothing 150 mm) utilizada para el rastreo se plaquearon 600 μL de bacterias previamente inoculadas durante 15 min. a 37°C con agitación, con una dilución de la genoteca conteniendo 40.000 bacteriófagos λ (40.000 ufp). Se plaquearon las bacterias inoculadas junto con 6,5 mL de NZY top agarosa (10 g de extracto de levadura, 5 g de NaCl, 2 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 10 g de NZ-amina y 7 g de agarosa por litro de medio, pH 7,0) fundido y termostatizado a 45-48°C sobre las placas de Petri

conteniendo medio LB agar. Las bacterias infectadas con fagos λ se incubaron a 37°C hasta la formación de una alta densidad de ufp.

Las ufp se transfirieron hacia una membrana de nylon cargada positivamente (Hybond™-N+, Amersham). Discos de membranas cargadas se apoyaron durante 5 min. sobre el NZY top agarosa conteniendo las ufp (los discos de membrana y las placas de Petri se marcaron de modo indeleble, para poder alinearlos posteriormente), y las cápsides de los fagos se desnaturalizaron durante 5 min. apoyando los discos boca arriba sobre filtros de papel secante embebidos en solución desnaturalizante (NaCl 1,5 M, NaOH 0,5 M). El exceso de solución desnaturalizante se eliminó apoyando las membranas boca arriba sobre papel secante, y las membranas se apoyaron durante 15 min. sobre filtros embebidos en solución neutralizante (NaCl 1,5 M, TrisCl 0.5 M, pH 7,5). El exceso nuevamente fue retirado apoyando sobre papel secante, y finalmente se incubó mediante el mismo procedimiento durante 10 min. en SSC 5X (1,5 M NaCl, 0.5 M TrisCl pH 7,5). El ADN liberado de las cápsides de los fagos se fijó a las membranas por horneado a 120°C durante 30 min.

Detección y rastreo

Las membranas horneadas se hidrataron y bloquearon durante 1 hora a 42°C en solución de prehibridación ULTRAhyb (Ambion), en horno de hibridación (Hybaid), dentro de botellas de hibridación. Se incubaron o.n. las membranas en solución de prehibridación conteniendo 0,1 ng/mL de sonda. Por cada botella de 100 mL se colocaron 2 membranas separadas entre sí mediante malla de hibridación (Hybaid), y se emplearon 6 mL de solución ULTRAhyb.

Luego de la hibridación se realizaron 2 lavados de 5 min. cada uno en 2X SSC, 0,1% SDS, y 2 lavados de 15 min. cada uno a 68°C en 0,5X SSC, 0,1% SDS para remover la sonda no hibridada. Se procedió a la detección de la sonda con anticuerpos anti-digoxigenina acoplados a fosfatasa alcalina siguiendo las indicaciones del fabricante (*DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit*). Se lavó el excedente de anticuerpo y se detectaron las ufp positivas mediante CSPD (*Chloro-5-substituted adamantyl-1,2-dioxetane phosphate*, Roche), sustrato quimioluminiscente de la fosfatasa alcalina. Se reveló por exposición a film de rayos X (Kodak). Se alinearón las placas fotográficas reveladas con las placas de Petri, y las ufp positivas fueron identificadas, picadas del agar mediante la utilización de una punta de pipeta automática de 1000 μ L con su punta cortada, y conservadas en 1 mL de buffer SM

(NaCl 100 mM, MgSO₄·7H₂O 8 mM, Tris-Cl 50 mM pH 7,5, gelatina 0,002%) con 2% de cloroformo.

Se realizaron 2 rondas subsiguientes de rastreo con la finalidad de obtener el mayor grado de pureza de las playas de lisis positivas aisladas, esta vez utilizando placas de Petri de 80 mm de diámetro. Previo a cada ronda de rastreo las soluciones conteniendo los bacteriófagos se diluyeron y fueron tituladas según lo indicado en el manual del *ZAP cDNA Synthesis Kit*. Para las rondas de purificación se sembraron entre 100 y 300 ufp por placa, de modo de poder aislar fácilmente las playas positivas. Se utilizaron 200 µL de células XL1-Blue DO_{600nm}=0,5 y 3 mL de medio NZY-top por placa, y se levantó un único filtro por cada una. Las membranas se desnaturalizaron, neutralizaron y fijaron del mismo modo que para la primera ronda de rastreo. Las playas de lisis positivas aisladas se levantaron del mismo modo que lo indicado más arriba y se conservaron en 1 mL de buffer SM con cloroformo a 4°C.

Escisión *in-vivo*

Se llevó a cabo la escisión *in-vivo* de los fagos y el plaqueo de los mismos de acuerdo a las instrucciones del fabricante (*ZAP-cDNA Synthesis Kit*). Brevemente, se inocularon 200 µL de *E. coli* XL-1 Blue DO₆₀₀=1,0 con 200 µL de fagos λ contenidos en buffer SM, de cada una de las diferentes playas de lisis seleccionadas en etapas previas, y 1 µL del fago *helper* R408 (Stratagene). Se incubaron las bacterias inoculadas con el fago *helper* y los fagos λ durante 15 min. a 37°C para permitir la coinfección. A continuación se agregaron a la mezcla 5 mL de medio de cultivo 2X YT (16 g de triptona, 10 g de extracto de levadura y 5 g de NaCl por litro de medio, pH 7,2) y se incubó durante 3 horas a 37°C con agitación. Se calentó el cultivo a 70°C durante 20 min. para inducir la liberación de los fagémidos. Cada fagémido empaquetado como una partícula de bacteriófago filamentoso contiene el plásmido pBluescript con la secuencia de ADNc rastreada. Éstos se separaron de las bacterias por centrifugación diferencial durante 5min. a 4000g, concentrándose los fagémidos en el sobrenadante.

Se inocularon 200 µL de células *E. coli* XL-1 Blue (DO₆₀₀=1,0) en medio LB suplementado con maltosa (0.2%) y MgSO₄ (10 mM) con 200 µL de los fagémidos purificados y se incubó a 37°C con agitación durante 15 min. para permitir la infección. A continuación se sembraron las bacterias en placas de Petri conteniendo medio LB agar con ampicilina (50 µg/mL). La ampicilina permitió seleccionar aquellas bacterias que hubieran sido infectadas

por el fagémido y por lo tanto incorporaron el plásmido pBluescript con el gen de resistencia a la ampicilina. Las colonias crecidas en medio selectivo fueron repicadas (dos estrías de purificación) y utilizadas para hacer minipreparaciones plasmídicas (ver a continuación).

Purificación de ADN de los clones seleccionados y análisis de restricción

Se cultivaron las colonias o.n. en 3 mL de LB líquido con ampicilina (50 µg/mL) a 37°C con agitación. Se centrifugaron las bacterias durante 90 seg. a máxima velocidad y se eliminó el sobrenadante antes de resuspender el precipitado bacteriano en 300 µL de solución 1 (Tris-Cl 50 mM pH 8, EDTA 10 mM, 100 µg de ARNasa A por mL de buffer). Se vortexeó antes de agregar 300 µL de solución 2 (NaOH 200 mM, SDS al 1%, preparado en el momento). Se mezcló con cuidado por inversión y se incubó durante 5 min. a temperatura ambiente. A la mezcla se le agregaron 300 µL de solución 3 (acetato de potasio 3 M, pH 5,5), se mezcló e incubó la mezcla 5 min. en agua-hielo. Se centrifugó la muestra durante 10 min. a máxima velocidad y se recuperó el sobrenadante en un nuevo tubo estéril, con cuidado de no destruir el precipitado. El ADN plasmídico fue precipitado o.n. a partir del sobrenadante agregando 0,7 volúmenes de isopropanol, mezclando por inversión e incubando aproximadamente 30 min. a -20°C. A continuación, se centrifugó a máxima velocidad durante 30 min. a 4°C. El precipitado de ADN se lavó con 1 mL de etanol 70% y se centrifugó a 4°C durante 5 min. a máxima velocidad. Se secó el precipitado al aire y se resuspendió en 40 µL de Tris-Cl 10 mM pH 8,5. Se conservó la muestra a -20°C.

Previo a enviar a secuenciación, el tamaño de los insertos contenidos en los clones aislados fue estudiado por doble digestión de los plásmidos con las enzimas de restricción *Apal* y *PstI* (Fermentas). La digestión con *Apal* se llevó a cabo en buffer *Blue* (Fermentas) a 30°C, en tanto la digestión con *PstI* se efectuó en buffer *Orange* (Fermentas) a 37°C. Ambas digestiones se realizaron durante 90 minutos cada una. El tamaño de los insertos fue analizado por electroforesis en gel de agarosa al 1,5% en buffer TAE, utilizando bromuro de etidio al 1% incluido en el gel para la detección del ADN.

Al menos 0,7 µg de cada uno de los clones obtenidos se enviaron a la Unidad de Biología Molecular del Institut Pasteur de Montevideo (IPMon) para su secuenciación (ver 3.8).

3.4 Western Blots

Preparación de extractos proteicos

Los testículos disecados y despojados de túnica albugínea, se conservaron en PBS (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄·2H₂O 8,1 mM, KH₂PO₄ 1,76 mM, pH 7,4) frío. Con un bisturí se cortó el testículo en trozos de 3 mm de lado, y luego se procedió a pipetear suavemente con puntero de pipeta automática de 1000 µl con la punta cortada, evitando la formación de espuma, hasta homogeneizar la muestra. Se filtró la mezcla homogeneizada en forma sucesiva con membranas de 80 µm y 25 µm de poro. Se estimó el número de células totales por conteo en cámara Neubauer. Se centrifugaron las células a 1000 g durante 10 min. a 4°C y se resuspendió el precipitado en buffer de Laemmli (Tris-Cl 0,12 M pH 6,8, SDS 10%, glicerol 20%, β-mercaptoetanol 20%, azul de bromofenol 0,02%), de modo que la concentración final de células fuera de 1,5 x 10⁵ células por µL. Se calentaron las muestras a 100°C durante 10 min. y se centrifugó a 15.000 g por 20 min. a 4°C. Se conservó el sobrenadante conteniendo las proteínas a -20°C.

Con respecto a otros tejidos, se extrajo proteína mediante el macerado de los mismos utilizando un homogeneizador Potter-Elvehjem (Sigma-Aldrich). Considerando que 1 gramo de tejido corresponde aproximadamente unas 1 x 10⁸ células (Rédei, 2008), se homogeneizó la muestra en buffer de Laemmli adecuando el volumen para lograr una concentración final de 1,5 x 10⁵ células por µL. Se calentaron las muestras a 100°C durante 10 min. y se centrifugó a 15.000 g durante 20 min. a 4°C. Se conservó el sobrenadante conteniendo las proteínas a -20°C.

Electroforesis en gel de poliacrilamida

Para las corridas electroforéticas de proteínas se cargó un rango de entre 10 y 50 µg de proteína por carril, de cada uno de los extractos proteicos obtenidos según lo indicado más arriba. La concentración de proteína fue estimada por Absorbancia₂₈₀ en espectrofotómetro NanoDrop (Thermo Scientific), según las instrucciones del fabricante, y se ajustó mediante corridas electroforéticas de prueba en geles teñidos con azul de Coomassie (ver más abajo).

Para los casos en que se migraron extractos de mitocondrias de hígado, los mencionados extractos fueron cedidos por el profesor Atan Gross (Instituto Weizmann,

Rehovot, Israel), obtenidos a partir de ratones WT y KO para el gen *Mtch2*. Dichos extractos mitocondriales habían sido obtenidos por centrifugación diferencial (Zaltsman *et al.*, 2010) y la concentración de proteína cuantificada en origen.

Los extractos proteicos se separaron por electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida SDS PAGE (Laemmli *et al.*, 1970). Las muestras se apilaron en un gel concentrador (acrilamida 4,8% y bisacrilamida 0,12%, SDS 0,1%, en Tris 0,12 M pH 6,8,) y se separaron en un gel al 12% (acrilamida 12%, bisacrilamida 0,3%, SDS 0,1%, en Tris 0,37 M pH 8,7). Se utilizaron como catalizadores para las reacciones de polimerización TEMED y APS, ambos a una concentración final de 0,1%. Se utilizó como buffer de corrida Tris 25 mM pH 8,5, glicina 0,112 M, SDS 0,1%, y las corridas se efectuaron en una cuba de electroforesis *Mini PROTEAN 3 Cell* (BioRad). En el gel concentrador se aplicó un voltaje de 90 V mientras que para la electroforesis en el gel separador se aplicó un voltaje de 150 V.

En los casos en que no se planeaban transferir, las proteínas se tiñeron utilizando azul de Coomasie (*Coomasie brilliant blue* 1,125%, metanol 40%, ácido acético glacial 10%) durante 1 hora con agitación a temperatura ambiente. El excedente de colorante se retiró con solución de desteñido (etanol 25%, ácido acético glacial 10%), hasta observar bandas de proteína en el gel de poliacrilamida. Cuando se efectuó transferencia, los geles no se tiñeron previamente a la misma.

Transferencia

Las proteínas separadas por electroforesis en gel de poliacrilamida fueron transferidas hacia membranas de nitrocelulosa (Schleicher & Schuell) utilizando buffer de transferencia CAPS (CAPS 25mM, metanol 10%, SDS 0,025%, ácido β -mercaptopropiónico 0,5 mM, pH 11). Las transferencias se llevaron a cabo por el método de transferencia líquida, en una cuba de transferencia *Mini TRANS-BLOT Cell* (BioRad) durante 60 min. a 85 V (aproximadamente 300 mA). La calidad de la transferencia fue evaluada por tinción con Rojo Ponceau [PonceauS (Sigma) 0.1% en ácido acético glacial al 5%] durante 5 min., y luego lavando con agua ultrapura hasta observar los carriles transferidos con el bandeo de proteínas.

DetECCIÓN INMUNOLÓGICA

Para disminuir las interacciones inespecíficas, las membranas fueron bloqueadas en una solución de TBSt (Tris 50 mM, NaCl 150 mM pH 7,6, Tween 20 0,5%) con 5% de leche descremada en polvo, o.n. a 4°C. Se lavó en TBSt 2 veces consecutivas durante 15 min. cada una antes de pasar a la incubación con el anticuerpo primario en TBSt-leche 5%. Todos los anticuerpos primarios empleados fueron producidos en conejo. La concentración final del anticuerpo varió según el anticuerpo en cuestión: el anti-Mtch2 cedido por el Profesor Atan Gross (Yerushalmi *et al.* 2002) y el anti-caspasa-3 (Cell Signaling, #9660) se usaron a una dilución de 1:500, el anti- β -actina (Abcam, ab8227) se utilizó a una dilución final de 1:2000, y el anti-Mtch2 comercial (Sigma, SAAB3500013) se empleó a una concentración final de 1:200. Las incubaciones duraron entre 1 y 2 horas a temperatura ambiente y el excedente de anticuerpo se lavó 2 veces durante 15 min. cada una en TBSt, para luego incubar con anticuerpo secundario durante 1 hora también a temperatura ambiente. Se utilizó el anticuerpo secundario producido en cabra *Goat anti Rabbit IgG* acoplado a peroxidasa de rábano (HRP) (Pierce, #31460) a una concentración final de 1:10.000 en TBSt-leche 5%. El exceso de anticuerpo secundario fue lavado de las membranas 2 veces durante 10 min. con TBSt. Todas las incubaciones y lavados se realizaron con agitación.

Las membranas se incubaron en reactivo quimioluminiscente *HRP SuperSignal West Pico* (Pierce) durante 5 min. a temperatura ambiente protegidas de la luz, y se expusieron a un film de rayos X (Kodak) durante tiempos variables (de 10 seg. a 20 min.) en cuarto oscuro. Los films fueron revelados y fijados siguiendo los procedimientos habituales, y a continuación escaneados para su análisis.

3.5 Inmunohistoquímica

Preparado de cortes histológicos

El tejido disecado se colocó en PBS y se cortó en pequeños trozos de aproximadamente 5 mm de lado con bisturí. Se fijó durante 1 hora a 4°C en buffer PHEM (PIPES 60 mM, HEPES 25 mM, EGTA 10 mM, MgCl₂ 2 mM) conteniendo paraformaldehído (PFA) al 4% (preparado fresco). Se lavaron los trozos de tejido por 10 min. en buffer PHEM, para luego incubarlos 1 hora a 4°C en PHEM conteniendo 10% de sacarosa y a continuación o.n. en PHEM con 20% de sacarosa, también a 4°C. Al día siguiente se transfirieron los trozos

de tejido a una solución conteniendo 50% de PHEM/10% sacarosa y 50% de medio de congelación de tejidos (Jung), y se incubaron durante 30 min. a 4°C. Por último, los trozos de tejido se colocaron en un soporte adecuado y se cubrieron con medio de congelación durante 30 min. a temperatura ambiente antes de guardar las muestras a -20°C.

Se realizaron cortes de 10 µm de espesor en crióstato SLEE modelo MEV, y los mismos se colocaron sobre portaobjetos previamente recubiertos con poli-L-lisina (Sigma-Aldrich) según los procedimientos habituales, de modo de favorecer la adhesión de los mismos al vidrio. Los portaobjetos conteniendo los cortes fueron nuevamente conservados a -20 °C hasta su utilización.

Inmunodetección de Mtch2 en cortes

Los cortes de tejido se hidrataron durante 20 min. a temperatura ambiente en buffer PHEM. Se permeabilizó el tejido en buffer PHEM conteniendo 0.1% de Tween 20 durante 1 hora a temperatura ambiente. Se lavó 3 veces durante 5 min. cada una con PHEM, y se bloquearon los grupos aldehído y cetona libres con PHEM conteniendo 1% borohidruro de sodio (Sigma) durante 30 min. a temperatura ambiente. Se lavó 3 veces durante 5 min. con PHEM previo a bloquear el tejido con 5% suero fetal bovino (SFB), 0.1% albúmina de suero bovino (BSA), glicina 50mM (solución de bloqueo) en buffer PHEM por 30 min. a temperatura ambiente. A continuación se incubaron los cortes o.n. a 4°C con anticuerpo primario anti-Mtch2 (Sigma, SAB3500013) a dilución 1:100 en solución de bloqueo. Se lavó el excedente de anticuerpo 3 veces durante 10 min. cada una con 0.1% Tween 20, 50 mM glicina en PHEM, antes de incubar durante 1 hora a temperatura ambiente en solución de bloqueo conteniendo, ya sea un anticuerpo secundario de cabra anti-conejo conjugado a Cy2 (Millipore, AP132J; dilución 1:50) u otro conjugado a Rojo Texas (Sigma, SAB3700858; dilución 1:50), y protegiendo de la luz los fluorocromos. Se lavó el excedente de anticuerpo secundario 3 veces durante 10 min. cada una con 0.1% Tween 20, glicina 50 mM en PHEM, y los preparados se cubrieron con montante conteniendo *antifade* DABCO [1,4-Diazabicyclo (2.2.2) octane, Sigma] 2% y DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride, Sigma) en 50% glicerol, 50% PBS 0,01 M. El DAPI se utilizó para teñir los núcleos celulares, mientras que el DABCO se empleó para retardar el decaimiento de los fluorocromos presentes en los anticuerpos secundarios.

Co-detección de Mtch2 con Mitotracker® Red 580 (MTR580)

Los cortes se hidrataron durante 20 min. en PBS a temperatura ambiente y se incubaron 30 min. en solución de bloqueo (BSA 1%, Tween 20 en PBS). Se lavaron 2 veces durante 5 min. cada una en PBS previo a la incubación o.n. a 4°C en solución de bloqueo con el anticuerpo primario anti-Mtch2 comercial mencionado más arriba (dilución 1:100) en solución de bloqueo. Se lavó el excedente de anticuerpo primario y se incubaron los cortes durante 1 hora a temperatura ambiente en anticuerpo secundario de cabra anti-conejo conjugado a Cy2 (dilución 1:50). El excedente de anticuerpo secundario se lavó 2 veces en PBS (2 x 5 min.) y se permeabilizaron los cortes cubriéndolos durante 5 min. con acetona fría a -20°C. Se lavó con PBS y rápidamente se incubó 20 min. en solución de bloqueo conteniendo MTR580 (Invitrogen) a una concentración final de 200 nM. Se lavó el excedente de sonda 2 veces con PBS durante 5 min. y se cubrieron los preparados con el montante indicado más arriba.

Detección de Mtch2 y ensayo de TUNEL

Los cortes se hidrataron durante 20 min. en PBS a temperatura ambiente y se permeabilizaron durante 2 min. a 4°C en Tritón X-100 0.1% y citrato de sodio 0.1% en PBS. Se lavó 2 veces durante 5 min. en PBS y se incubaron los cortes en reacción de TUNEL (*In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein*, Roche) durante 1 hora a 37°C protegidos de la luz. Todos los pasos a continuación se realizaron protegiendo los cortes de la luz. Se lavaron 3 veces los cortes en PBS durante 5 min. antes de bloquear los mismos por 30 min. en BSA 1%, Tritón X-100 0,1% en PBS (solución de bloqueo). Se retiró la solución de bloqueo y se incubó o.n. a 4°C con el anticuerpo primario anti Mtch2 (Sigma, SAB3500013) a dilución 1:100 en solución de bloqueo. Se lavó con PBS (2 x 10 min.) para eliminar el exceso de anticuerpo primario antes de incubar durante 1 hora en anticuerpo secundario anti-conejo conjugado a Rojo Texas (dilución 1:50), también en solución de bloqueo. Finalmente, se lavó con PBS (2 x 10 min.) el exceso de anticuerpo secundario y se cubrieron los preparados con el montante.

3.6 Cuantificación Celular por Citometría de Flujo

Para poder discernir diferencias cuantitativas en los niveles de expresión de Mtch2 entre las distintas poblaciones celulares, definidas según su contenido de ADN, se realizó la inmunomarcación de la proteína en una suspensión de células de testículo de rata de 40

dpp. A tales efectos las células en suspensión fueron fijadas, permeabilizadas y expuestas al anticuerpo anti-Mtch2, las poblaciones celulares sometidas a inmunocitoquímica, a su vez fueron teñidas con IP previo a su evaluación por citometría de flujo.

Suspensiones celulares

Testículos disecados desprovistos de la túnica albugínea se cortaron en trozos de 3 mm de lado y se homogeneizó el tejido utilizando un equipo *Medimachine*TM (Becton Dickinson, BD) mediante un protocolo desarrollado en nuestro laboratorio (Rodríguez-Casuriaga *et al.*, 2009). Brevemente, los trozos de testículo se colocaron dentro de una unidad disgregadora (*Medicon*, BD) junto con 1 mL de PBS y se homogeneizaron durante 1 min. El homogenizado fue filtrado sucesivamente con *Filcons* (BD) y malla de nylon con 50 μm y 25 μm de diámetro de poro, respectivamente. Se estimó la cantidad de células obtenidas por conteo en cámara Neubauer y se ajustó la concentración a $1,5 - 2 \times 10^6$ células por tubo.

Inmunocitoquímica

Este protocolo fue adaptado por nosotros a partir del protocolo *Flow Cytometry Protocol for Intracellular Staining Using Conjugated Secondary Antibodies*, obtenido de <http://www.enogene.com/articleview.php?id=30>. Brevemente, se retiró el PBS de las células por centrifugación a 500 g durante 5 min. a 4°C. Las células se fijaron resuspendiendo el precipitado suavemente en 200 μL de PFA al 4% (preparado fresco) en PBS. Se incubaron durante 15 min. a temperatura ambiente y se lavaron 2 veces en PBS centrifugando 5 min. a 500 g y a 4°C cada vez, y eliminando el sobrenadante. Las células fueron resuspendidas en 100 μL de PBS, y se permeabilizaron agregando 9 volúmenes de metanol frío. Se mezcló suavemente por inversión y las células se incubaron 30 min. a -20°C. A continuación se lavaron 2 veces en PBS, centrifugando a 500 g (5 min.) a 4°C. Las células fueron resuspendidas en solución de bloqueo (BSA 1% en PBS) y se incubaron durante 20 min. a temperatura ambiente. Se agregó el anticuerpo primario anti-Mtch2 comercial (Sigma, SAAB3500013) a una dilución final de 1:100, y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Se removió el excedente de anticuerpo lavando en solución de bloqueo (2x), centrifugando a 500 g (5 min.) a 4°C. A continuación se resuspendieron las células en 100 μL de solución de bloqueo conteniendo el anticuerpo secundario protegido de la luz y se incubó por 30 min. a temperatura ambiente antes de remover el excedente mediante una

centrifugación de 5 min. (500 g, 4°C) y eliminando el sobrenadante. Por último se resuspendieron las células en 500 µL de PBS, y el ADN se tiñó con ioduro de propidio (IP, 50 µg/mL) durante 10 min. protegido de la luz.

Mediciones citométricas

Para realizar las mediciones citológicas y de fluorescencia se utilizó un citómetro de flujo con clasificador celular FACSVantage (BD) equipado con un láser de argón con emisión a 488 nm, (Coherent, Innova 304) y un sistema de enfriamiento por circulación de agua. La intensidad del láser fue fijada en 100 mW. La fluorescencia de IP fue colectada en FL2 utilizando un filtro de banda de 575/26, mientras que la fluorescencia verde (correspondiente a Mtch2) fue colectada en FL1, utilizando un filtro de banda 530/30.

Se utilizó el Kit *DNA QC Particles* (BD) para optimizar la detección de fluorescencia, verificar la linealidad del equipo y permitir la discriminación de dobletes. Se empleó el programa *CELLQuest* (BD) para el análisis de los siguientes parámetros: dispersión frontal (FSC-H), dispersión lateral (SSC-H), e intensidad total de fluorescencia (FL1 y FL2). Se realizaron histogramas en donde se graficaron intensidad de fluorescencia de IP vs cantidad de eventos, intensidad de fluorescencia de IP vs intensidad de fluorescencia de Mtch2 e intensidad de fluorescencia de Mtch2 vs cantidad de eventos.

3.7 Ensayos de Hipertermia Moderada

El tratamiento experimental de hipertermia moderada fue adaptado del trabajo del grupo de Lue y colaboradores (Lue *et al.*, 1999; Sinha Hikim *et al.*, 2003), utilizándose para estos ensayos un baño de agua termostatzado. Cuatro ratas macho de 50 dpp fueron expuestas a hipertermia moderada de 42°C durante 15 min., mientras que cuatro ratas macho de la misma edad (grupo control) fueron expuestas a una temperatura de 23°C. Las ratas fueron previamente anestesiadas utilizando una dosis de pentobarbital sódico (40 mg/kg peso) según la bibliografía citada, e introducidas en el baño desde la cintura hasta la cola, manteniéndose los torsos y cabezas fuera del baño (con el baño regulado a 42°C ó 23°C, según se tratase del grupo tratado o control). Se les permitió recuperarse de la anestesia a temperatura ambiente y se sacrificaron según lo establecido por la CHEA a tiempos de 30 min., 60 min., 3 horas y 6 horas (un individuo sometido a hipertermia y un individuo control a cada tiempo) postratamiento, con sobredosis de pentobarbital sódico y dislocación

cervical. Los testículos fueron disecados para la realización de análisis por Western blot y cortes histológicos para ensayos de inmunohistoquímica y TUNEL, según las metodologías descritas en las secciones 3.4 y 3.5.

3.8 Análisis de Secuencias y Estudios Estadísticos

Todas las secuencias obtenidas fueron en primera instancia editadas utilizando el programa “Bioedit Sequence Alignment Editor” (North Carolina State University, U.S.A.). La secuencia del gen y de la proteína *Mtch2* de la rata fueron obtenidas de la página ensembl (<http://www.ensembl.org>; [ENSRNOT00000011846](http://www.ensembl.org/ENSRNOT00000011846)), y los alineamientos se realizaron mediante el programa blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>), empleando la herramienta “blast-two-sequences”. El programa *online* RegRNA (Huang *et al.*, 2006; <http://regrna.mbc.nctu.edu.tw/>) se utilizó para la búsqueda de secuencias regulatorias a nivel de regiones UTR.

Por su parte, los análisis estadísticos efectuados en esta tesis se realizaron mediante ANOVA de una vía, utilizando el programa PAST versión 2.17 (Hammer *et al.*, 2001), y asumiendo un valor estándar de $p=0,05$.

RESULTADOS

4.1 Estudios de expresión del gen *Mtch2* y caracterización de la secuencia codificante en el testículo de la rata

RT-PCR a alto número de ciclos

Como se señaló anteriormente, *Mtch2* había surgido de un experimento de *mRNA Differential Display* como un gen expresado diferencialmente en las células en profase meiótica (espermocitos paquítenicos) en comparación con las células posmeióticas (espermátidas redondas) de la rata. Por otra parte, experimentos de RT-PCR a bajo número de ciclos (semicuantitativos) confirmaron dicho patrón de expresión, a la vez que indicaron que se trataría de un gen diferencialmente expresado en el testículo en relación a otros órganos de la rata (incluidos epidídimo y ovario), y en el testículo adulto en relación al testículo de neonatos. En tal sentido, debe tenerse en cuenta que en las reacciones de RT-PCR semicuantitativo se logró observar una intensa banda producto de amplificación en los espermocitos (e incluso en espermátidas y testículo total de adulto) con sólo 18 ciclos de amplificación (**figura 1.4**). Ello nos sugiere que el ARNm de *Mtch2* es muy abundante en el testículo, particularmente en las células meióticas.

Cuando se aumentó el número de ciclos de PCR de 18 a 40 se observó amplificación de *Mtch2* en todas las muestras analizadas (**figura 4.1**). Esto indica que, *Mtch2* se expresa en todos los tejidos analizados, y que las cantidades de producto obtenido se equiparan al efectuarse 40 ciclos de amplificación, condiciones en que se pierde la proporcionalidad (si bien aún en estas condiciones la banda que se aprecia es más intensa en testículo adulto). Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos por otros autores (Yerushalmi *et al.*, 2002; Yu *et al.*, 2008; Willer *et al.*, 2009; Kulyté *et al.*, 2011), indicando que *Mtch2* es transcrito en varios tejidos, pero muestran que las cantidades de transcrito de este gen en el testículo, y en particular en las células en profase meiótica, serían abrumadoramente más elevadas.

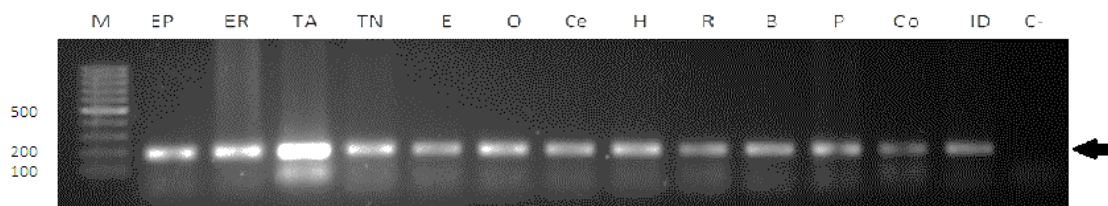


Figura 4.1. *Mtch2* se expresa en todos los tipos celulares y tejidos analizados cuando estudiamos su expresión a alto número de ciclos. Electroforesis en gel de agarosa en que se migraron los productos de PCR de *Mtch2* a 40 ciclos de amplificación, teñidos con bromuro de etidio. M- marcador de peso molecular (*GeneRuler™ 100 bp “DNA Ladder”*; *Fermentas*), EP- espermatoцитos paquiténicos, ER- espermátidas redondas, TA- testículo adulto (40 dpp), TN- testículo de neonato (1 dpp), E- epidídimo, O- ovario, Ce- cerebro, H- hígado, R- riñón, B- bazo, P- pulmón, Co- corazón, ID- intestino delgado y C-- control negativo. Con la flecha negra se indica el producto de amplificación de 183 pb del extremo 3' de *Mtch2*.

Rastreo en genoteca de espermatoцитos paquiténicos del ADNc completo de *Mtch2*

Como hemos mencionado, la expresión diferencial de genes es un evento ampliamente distribuido a nivel del testículo de los mamíferos (ver Introducción). Con la finalidad de determinar la secuencia completa del transcripto de *Mtch2* expresado en el testículo, la secuencia obtenida a partir de los experimentos de “ARNm differential display”, correspondiente a parte de la región UTR 3' de *Mtch2*, se empleó como sonda para el rastreo de una genoteca de ADNc de espermatoцитos paquiténicos de rata. De este modo, se esperaba determinar si el ARNm expresado en este tejido era idéntico a las secuencias presentes en el Genbank, o si se trataba de variantes (isoformas) específicas de testículo.

Como primera aproximación se investigó la presencia en la genoteca de clones conteniendo la secuencia de *Mtch2*. Esto se realizó efectuando PCR a partir de diferentes diluciones de la genoteca. Se observó amplificación incluso cuando 250.000 ufp fueron utilizadas como molde (**figura 4.2**).

Además de confirmar la presencia del transcripto de interés en la genoteca, la amplificación de *Mtch2* a partir de la misma nos dio una noción de la cantidad de ufp que tendríamos que plaquear para aumentar las probabilidades de identificar exitosamente clones conteniendo un ADNc correspondiente a nuestro transcripto de interés.

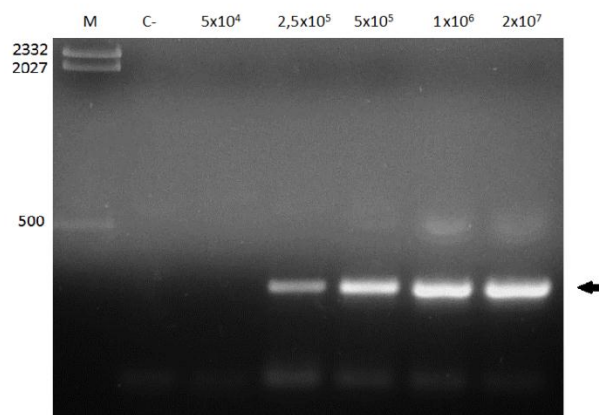


Figura 4.2. La secuencia correspondiente a la región 3'UTR de *Mtch2* se encuentra presente en la genoteca. Electroforesis en gel de agarosa del producto de amplificación por PCR de parte de la secuencia de *Mtch2*. M- marcador de peso molecular (Lambda *HindIII*), C-- control negativo. En los carriles siguientes se indican las distintas cantidades de ufp utilizadas como molde para la reacción de PCR en cada caso. Con la flecha negra se indica el producto de amplificación de 183 pb de *Mtch2*.

Basado en los resultados anteriores, se plaquearon en principio $2,5 \times 10^5$ ufp para el rastreo primario, esperando obtener clones positivos, de modo de aumentar las chances de lograr una cobertura total del ADNc. Se cortaron del agar 11 playas de lisis que dieron positivas durante la primera ronda de rastreo, y se realizaron 2 rondas sucesivas de purificación de las playas positivas con la finalidad de analizar clones puros. Se finalizó el rastreo de cada clon al observarse señal positiva en todas las playas de lisis. Un ejemplo del modo como se procedió con este rastreo se muestra en la figura 4.3 para dos de los clones purificados. Una vez alcanzada la pureza total de los clones aislados se prosiguió con la escisión *in vivo* (ver Materiales y Métodos) con la finalidad de liberar los fagémidos.

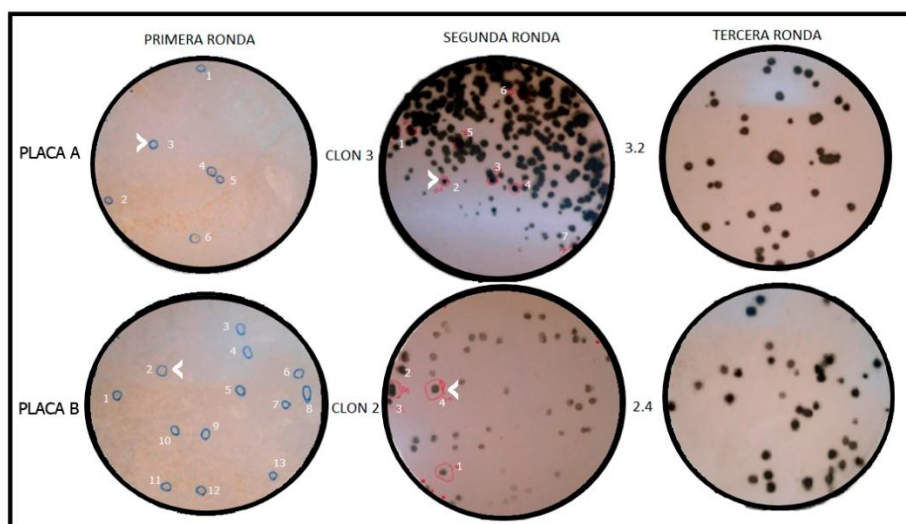


Figura 4.3. Sucesivas rondas de rastreo permitieron aislar clones puros. Purificación de playas de lisis positivas para *Mtch2* de la genoteca de ADNc de espermatozoides paquítenicos de rata. En las filas superior e inferior se observan 2 ejemplos de 3 rondas de purificación. Las puntas de flecha señalan aquellas playas de lisis seleccionadas para su purificación.

Como resultado de la escisión *in vivo* se obtuvieron los plásmidos puros, correspondientes a las 11 playas de lisis seleccionadas en la ronda primaria de rastreo, los que fueron analizados para la presencia de insertos por digestión con enzimas de restricción. Las digestiones permitieron liberar insertos en un rango de tamaños de 400 a alrededor de 2200 pb (**figura 4.4.A**).

Se secuenciaron finalmente los 11 clones (ver Anexo), y las secuencias obtenidas se compararon con la información disponible sobre *Mtch2* en la base de datos Ensembl (ENSRNOT00000011846). De los 11 clones estudiados, el 1 y 2 resultaron idénticos entre sí. Todos los clones presentaban homología de secuencia con *Mtch2*. Del total de clones estudiados, sólo el número 11 se extendió lo suficiente en sentido 3' - 5' como para abarcar el total de la región codificante de *Mtch2*, incluyendo 18 pb de la región 5'UTR (**figura 4.4.B**; ignoramos hasta dónde se extiende el clon 9, dado que fue el único que sólo se secuenció parcialmente).

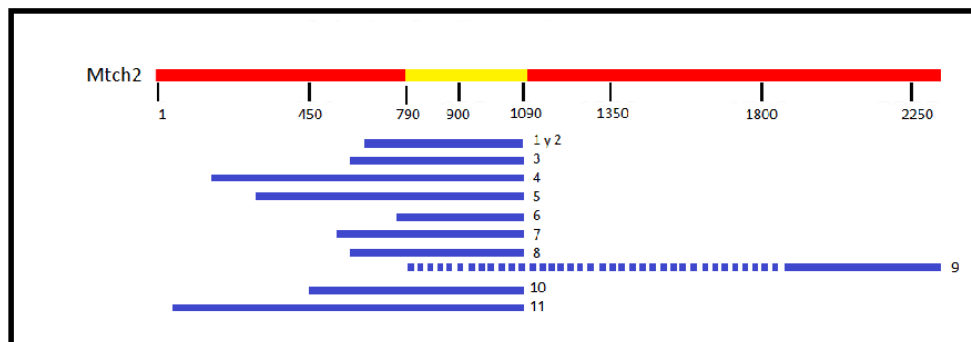
Únicamente el clon 9 presentó identidad con las últimas bases presentes en la región 3'UTR de la forma canónica, en tanto los 9 clones restantes cubrieron únicamente 116 pb *downstream* del codón *stop* ya descrito (**figura 4.4.B**), presentando a continuación la cola de poli A, lo que indica la existencia de una isoforma de *Mtch2* procesada con un 3' UTR más corto que el descrito para la forma canónica. El análisis de las secuencias muestra la existencia de un posible sitio de poliadenilación alternativo "TATACA" (Edwalds-Gilbert *et al.*, 1997), entre las posiciones 1053 y 1059, que podría dar origen a este transcripto de menor tamaño.

En suma, en espermatoцитos paquiténicos de rata adulta joven se expresarían dos variantes del gen *Mtch2*, la forma clásica o canónica y un transcripto que a pesar de no presentar diferencias a nivel codificante presenta una región 3' UTR 1233 b más corta que la descrita (**figura 4.5.C**; ver Anexo).

A

clon	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
numero de bases estimadas	600	600	700	800	700	400	700	1700	2200	800	1100
bases con homología a <i>Mtch2</i>	595	595	626	937	798	387	633	626	467	648	1046

B



C

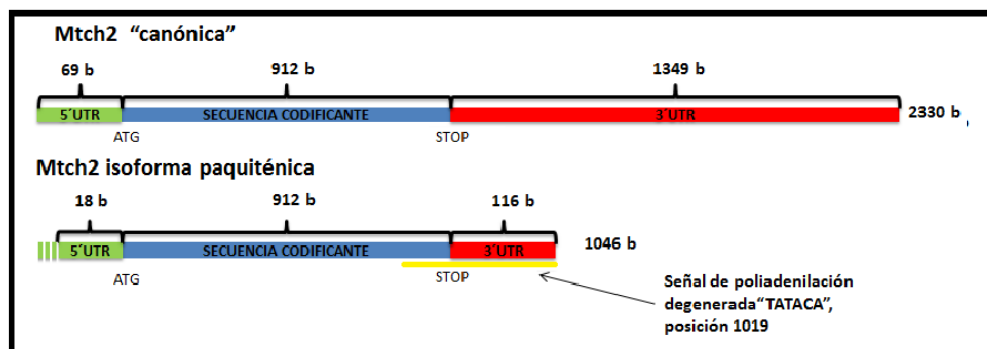


Figura 4.4. En espermatocitos paquiténicos de rata, *Mtch2* expresa tanto la forma canónica del ARNm como una variante transcripcional con una región 3'UTR más corta. A. Tabla resumiendo los tamaños de los insertos contenidos en los fagémidos aislados. B. Representación gráfica de la cobertura de los distintos clones obtenidos y secuenciados. En rojo en la parte superior de la imagen se representa la secuencia canónica del ARNm de *Mtch2* previamente descrito. En amarillo se indica la región con homología a la sonda empleada. En la parte inferior se aprecia la cobertura de los diferentes clones aislados durante el rastreo de *Mtch2* en la genoteca de espermatocitos paquiténicos. C. Arriba representación esquemática de *Mtch2* canónica e isoforma paquiténica abajo. En azul se representa la secuencia codificante mientras que en verde se representa la región 5'UTR y en rojo la región 3' UTR. La línea amarilla indica la región que presenta homología con la sonda empleada en el rastreo. Las líneas punteadas representan regiones que no fueron secuenciadas pero que deben estar presentes.

4.2 Patrón de expresión de la proteína *Mtch2*

Estudios de expresión de la proteína *Mtch2* en distintos tejidos de la rata

Tras haber estudiado el patrón de expresión del gen *Mtch2* en la rata, se procedió a estudiar su perfil de expresión proteica. Como primer paso nos propusimos evaluar la

especificidad de un anticuerpo anti-Mtch2 generado contra una mezcla de péptidos producidos a partir de la secuencia de *Mtch2* humana (Yerushalmi *et al.*, 2002), cedido por el profesor Atan Gross, del Instituto Weizmann, y que funcionaba en ratón pero aún no había sido testado en rata. A tales efectos, se efectuó un ensayo de Western blot con dicho anticuerpo, empleando un lisado total de testículo adulto de rata de 40 dpp. Como controles positivo y negativo respectivamente, se cargaron extractos proteicos de fraccionamientos subcelulares enriquecidos en mitocondrias de hígado pertenecientes a ratones WT y KO para el gen *Mtch2* (cedidos por Gross). Como se aprecia en la figura 4.5.A, se observó como era esperable una banda en el carril correspondiente a mitocondrias de hígado del ratón WT, pero no en el caso de mitocondrias aisladas del individuo KO. Con respecto al carril correspondiente al lisado total de testículo de rata, el anticuerpo detectó una banda con una migración relativa por encima de 30 kDa, en concordancia con el peso molecular predicho para *Mtch2* en esa especie (\cong 34 kDa), y muy similar al tamaño de *Mtch2* de ratón (Yerushalmi *et al.*, 2002; Grinberg *et al.*, 2005; Zaltsman *et al.*, 2010).



Figura 4.5. *Mtch2* se expresa en el testículo adulto de la rata de 40 dpp. A. Western blot de la proteína *Mtch2* con anticuerpo desarrollado y cedido por A. Gross. Carril 1– 10 μ g de proteína de lisado total de testículo de 40 dpp, carril 2– 50 μ g de proteína de fracción mitocondrial obtenida a partir de ratones WT (Zaltsman *et al.*, 2010) y carril 3– 50 μ g de proteína de fracción mitocondrial obtenida a partir de ratones KO *Mtch2*^{-/-} (Zaltsman *et al.*, 2010). B. Western blot de la proteína *Mtch2* con anticuerpo comercial (Sigma, SAAB3500013). Carril 1– 50 μ g de proteína de lisado total de testículo de 40 dpp, carril 2– 50 μ g de proteína de fracción mitocondrial obtenida a partir de ratones KO *Mtch2*^{-/-} (Zaltsman *et al.*, 2010). A la izquierda de ambas figuras se consignan los pesos moleculares (kDa) de las bandas del marcador de peso molecular (*PageRuler*TM *Protein Ladder*, Fermentas).

En primer lugar podemos concluir que el anticuerpo diseñado contra *Mtch2* humana es capaz de reconocer a la proteína homóloga de rata. En segundo lugar, este resultado aporta la primera evidencia sobre la expresión de la proteína *Mtch2* en el testículo. Por otra parte, este resultado sugiere que *Mtch2* sería abundante en el testículo ya que no se había logrado nunca inmunolocalizar la proteína a partir de extractos totales de hígado u otro de los tejidos analizados, habiéndose debido recurrir por ello a la utilización de fracciones mitocondriales purificadas (Yerushalmi *et al.*, 2002; Grinberg *et al.*, 2005; Zaltsman *et al.*,

2010; Kulyté *et al.*, 2011). En cambio, en el testículo se identifica claramente una banda a partir de tan sólo 10 µg de proteína de lisado total del tejido (**figura 4.5.A**).

Sin embargo, dado que el anticuerpo en cuestión no era capaz de reconocer a su proteína blanco en ensayos de inmunohistoquímica, es decir en su forma nativa (A. Gross, comunicación personal), se recurrió también a la utilización de un anticuerpo comercial anti-Mtch2 (ver Materiales y Métodos). A los efectos de validar los resultados obtenidos con ambos anticuerpos, se procedió a repetir el experimento de Western blot con el anticuerpo comercial. Como se aprecia en la figura 4.5.B, se observa una banda a la altura esperada, indicándonos que el anticuerpo comercial es capaz de reconocer la misma, única banda de Mtch2 de manera específica. La diferencia en la intensidad de la banda obtenida obedece a que en el gel de la figura 4.5.B se cargó cinco veces más proteína que en el de la figura 4.5.A, como se explica al pie de la misma.

En conclusión, ambos anticuerpos reconocieron una banda de idéntico tamaño, asegurando la especificidad de la interacción antígeno-anticuerpo al evaluar los resultados subsiguientes. A partir de este resultado, se utilizaron ambos anticuerpos indistintamente para los ensayos de Western blot, en tanto para los experimentos de inmunohistoquímica se empleó el anticuerpo comercial.

A continuación se procedió a comparar la expresión de Mtch2 en el testículo con la observada en otros tejidos. A tales efectos, se realizaron experimentos de Western blot en los que se incluyeron cantidades equivalentes de lisados proteicos de rata macho de 40 dpp de cerebro, hígado, epidídimo, intestino delgado, pulmón y riñón, junto con un lisado de testículo. La banda de 34 kDa reactiva con el anticuerpo anti-Mtch2 se detectó únicamente en el lisado total de testículo (**figura 4.6.A**). Por otra parte, el control de β-actina empleado corroboró la presencia de cantidades comparables de lisado proteico en todos los carriles. A mayores tiempos de exposición se observó una banda correspondiente al anticuerpo anti-Mtch2 en tejidos como hígado y cerebro, manteniéndose la diferencia cuantitativa a favor del testículo (datos no mostrados).

En conjunto, estos resultados indican que Mtch2 se expresa en mayor grado en el testículo de la rata respecto a otros órganos, en concordancia con los resultados observados a nivel de ARNm en la RT-PCR semicuantitativa de *Mtch2* mostrados previamente.

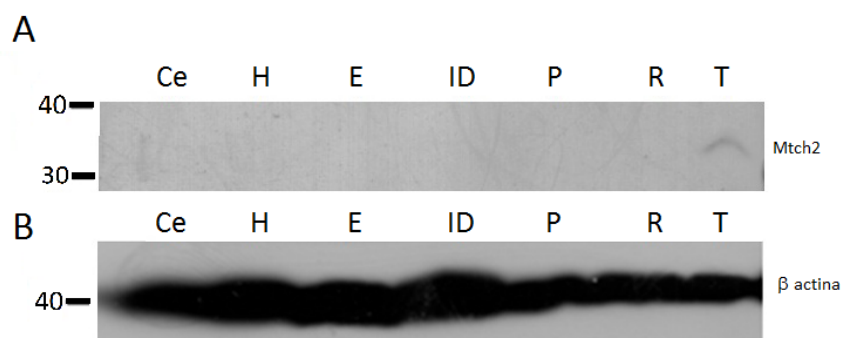


Figura 4.6. Mtch2 se expresa en el testículo adulto de 40 dpp a mayores niveles que en otros tejidos. A. Western blot con anticuerpo anti-Mtch2 contra lisados proteicos de varios tejidos de rata de 40 dpp. Ce= cerebro, H= hígado, E= epidídimo, ID= intestino delgado, P= pulmón, R= riñón y T= testículo. B. Western blot con anticuerpo anti β-actina contra las mismas muestras, como control de carga. A la izquierda de ambas figuras se consignan los pesos moleculares (kDa) de las bandas del marcador de peso molecular (*PageRulerTM Protein Ladder*, Fermentas).

La presencia de la proteína Mtch2 en distintos tejidos se estudió también por inmunohistoquímica al microscopio confocal de fluorescencia, en criosecciones de tejido de 10 μm de espesor.

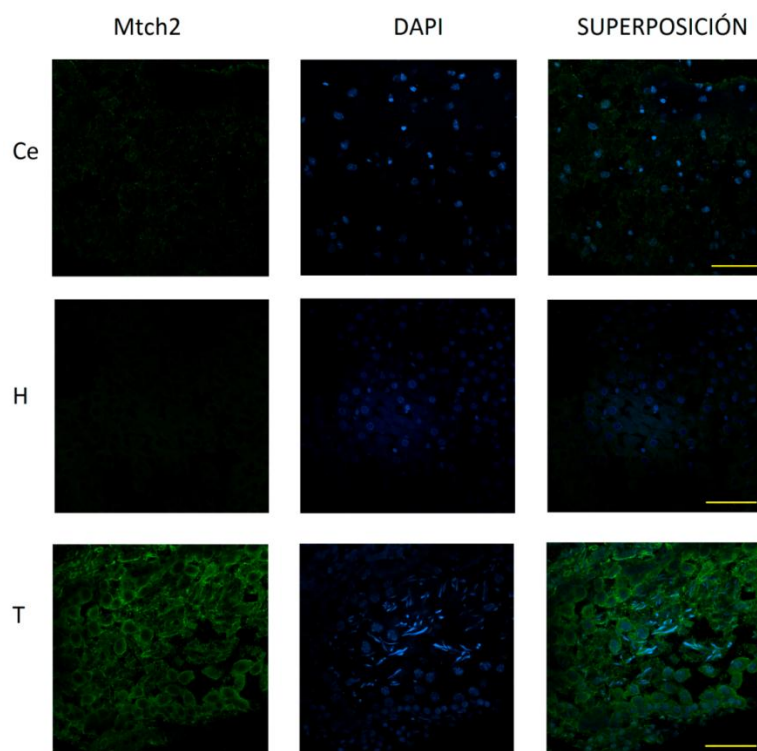


Figura 4.7. Mtch2 se localiza a nivel del citoplasma, presentando mayores niveles de expresión en el testículo respecto al cerebro y al hígado de la rata adulta. Ce= cerebro, H= hígado y T= testículo. Primera columna- inmunofluorescencia de Mtch2 (verde), segunda columna- tinción nuclear con DAPI (azul) y tercera columna- superposición de imágenes. Barra de escala: 50 micrómetros.

Los análisis de inmunohistoquímica mostraron mayor presencia del antígeno en los cortes de testículo respecto a cerebro e hígado (**figura 4.7**), en concordancia con los resultados obtenidos por Western blot, y también con los antecedentes observados a nivel de ARNm. Por otra parte, en los tres tejidos se observa que el antígeno es de localización citoplásmica, como sería esperable para una proteína mitocondrial.

Mtch2 en el testículo, ¿es de localización mitocondrial?

Como se mencionó anteriormente (ver Introducción, sección 1.2), no son infrecuentes los casos en los que proteínas con una determinada función en las células somáticas sean reclutadas en el testículo para desempeñar una función diferente, incluso localizándose en un compartimento celular diferente (revisado por Geisinger, 2008). Por ese motivo, nos propusimos averiguar si Mtch2 en el testículo se localizaba en la mitocondria, al igual que lo descrito para otros tejidos y tipos celulares (Yerushalmi *et al.*, 2002; Grinberg *et al.*, 2005; Zaltsman *et al.*, 2010). Para ello se co-localizó a Mtch2 con una sonda específica *Mitotracker Red 580* (MTR580) para la marcación de mitocondrias, en cortes de testículo de ratas de 40 dpp.

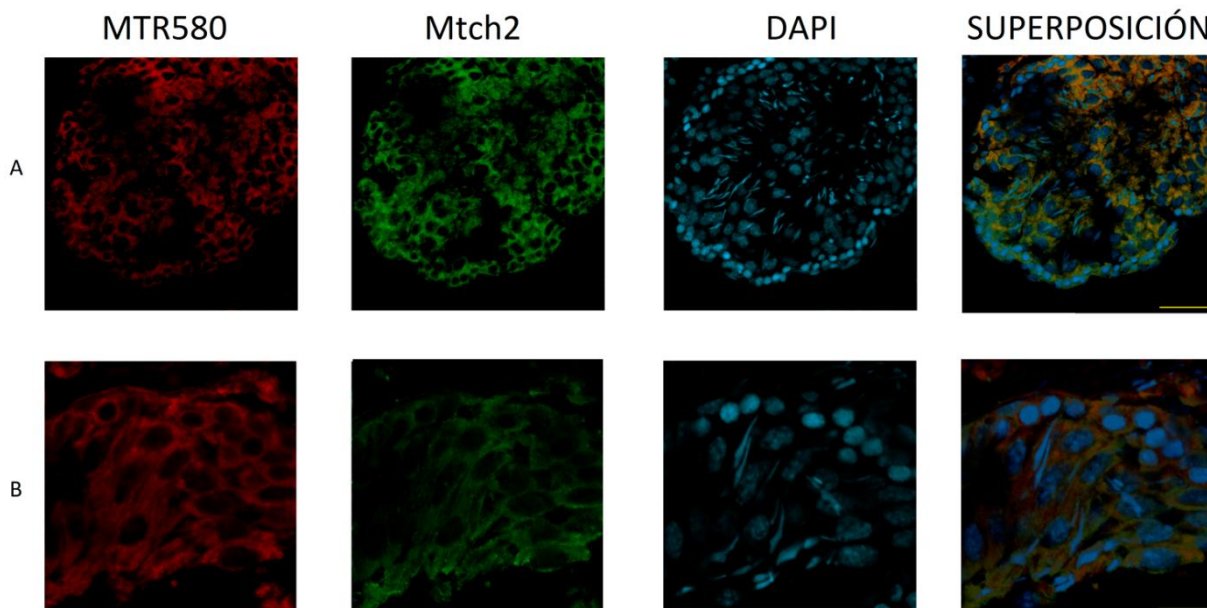


Figura 4.8. En el testículo de la rata la señal de Mtch2 co-localiza con la sonda *Mitotracker Red 580* (MTR580). Inmunohistoquímica de testículo de rata de 40 dpp. A. Imagen a menor aumento. B. Detalle a mayor aumento. Primera columna - MTR580 (en rojo), segunda columna - Mtch2 (en verde), tercera columna - tinción nuclear con DAPI (en azul) y cuarta columna- superposición de imágenes. Barra de escala: en A corresponde a 50 micrómetros, en B a 20 micrómetros.

Como se observa en la **figura 4.8**, la sonda MTR580 emite una señal de localización citoplasmática, con un perfil punteado. Al realizar la superposición de las señales, se puede apreciar que MTR580 y Mtch2 colocalizan. Por lo tanto, podemos concluir que en el testículo Mtch2 se localiza a nivel mitocondrial.

Caracterización de la expresión de Mtch2 durante el desarrollo posnatal del testículo de la rata

Con el objeto de evaluar el perfil de expresión a lo largo del desarrollo de la línea germinal masculina, se estudió la expresión de Mtch2 a través de las distintas etapas del desarrollo posnatal del testículo de la rata mediante ensayos de Western blot e inmunohistoquímica al microscopio confocal de fluorescencia.

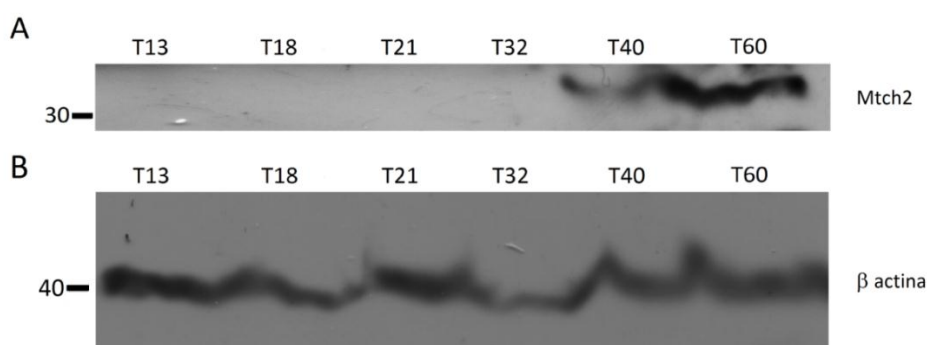


Figura 4.9. Mtch2 presenta mayores niveles de expresión en el testículo adulto respecto a etapas previas del desarrollo. A. Western blot de la proteína Mtch2. T13- lisado de testículo de 13 dpp, T18- lisado de testículo de 18 dpp, T21- lisado de testículo de 21 dpp, T32- lisado de testículo de 32 dpp, T40- lisado de testículo de 40 dpp y T60- lisado de testículo de 60 dpp. B. Western blot de la proteína β -actina contra las mismas muestras, como control de carga. A la izquierda de la figura se consignan los pesos moleculares (kDa) de las bandas del marcador de peso molecular (*PageRuler™ Protein Ladder*, Fermentas) que migran a altura similar.

Los experimentos de Western blot detectaron la banda de 34 kDa en lisados totales de testículo de rata adulta (40 y 60 dpp) y no en otras edades estudiadas (**figura 4.9**). Dado que los niveles de β -actina detectados en todos los carriles son similares, podemos afirmar que la expresión de Mtch2 en el testículo de rata aumenta con la edad del individuo. Mtch2 se expresa a mayores niveles en el testículo adulto en relación a etapas previas del desarrollo posnatal, y en el testículo de rata adulta (60 dpp) que en el de ratas adultas jóvenes (40 dpp). Vale aclarar que a mayores tiempos de exposición se detectó la banda en lisado total de testículo de edades previas, siempre manteniéndose las diferencias cuantitativas aquí descritas (datos no mostrados).

El estudio de la expresión de Mtch2 a lo largo de distintas etapas clave en el desarrollo postnatal del testículo de la rata por inmunolocalización sobre cortes histológicos,

se realizó empleando cortes de individuos de las mismas edades que los utilizados en los experimentos de Western blot, e incluyendo además cortes de testículo de animales de 7 dpp (**figura 4.10**).

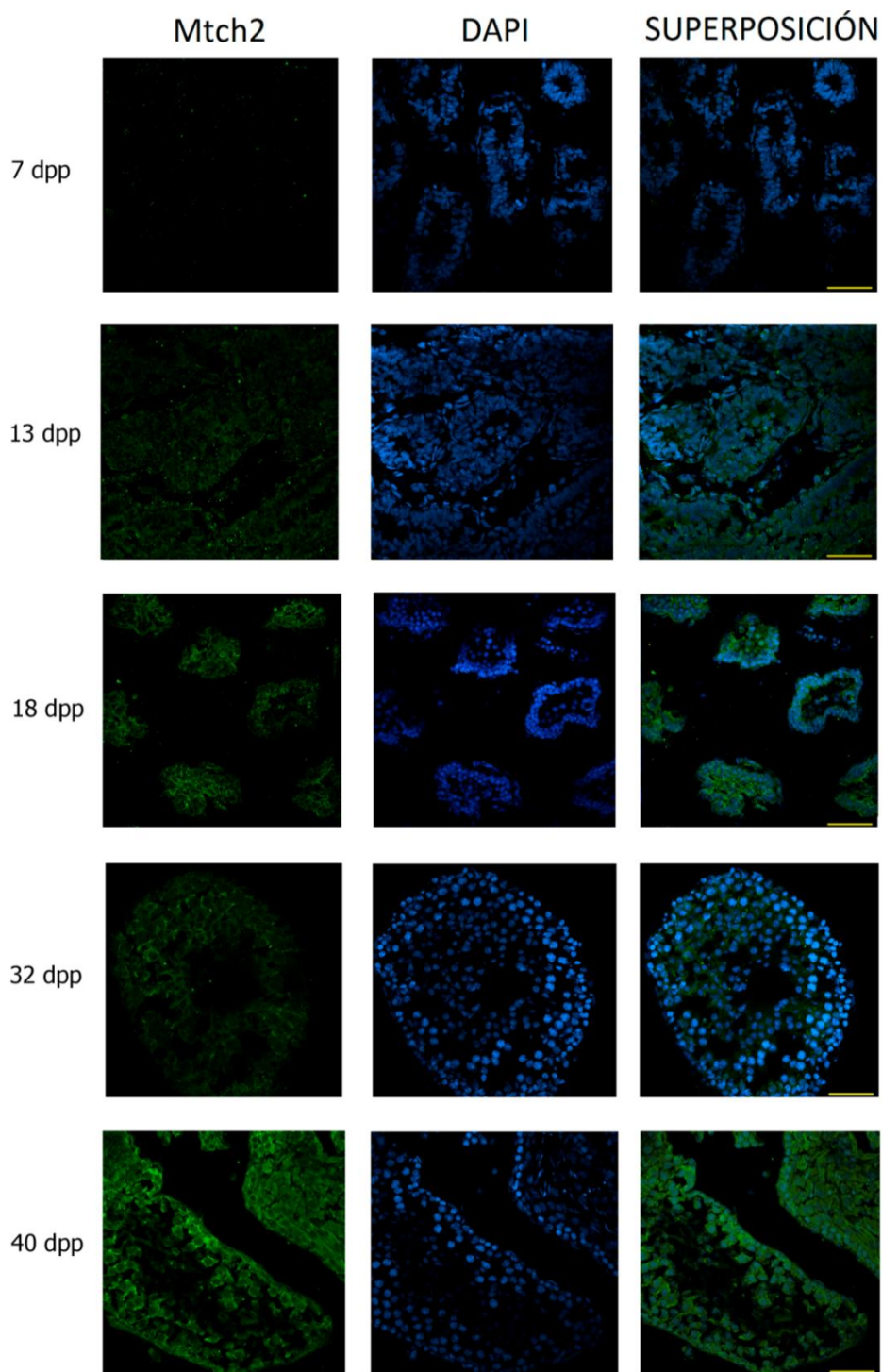


Figura 4.10. Mtch2 presenta mayores niveles de expresión en el testículo adulto respecto a etapas previas del desarrollo. Inmunohistoquímica sobre cortes de testículo de rata. A la izquierda de cada fila se consignan las edades de los individuos utilizados en cada caso (7, 13, 18, 32 y 40 dpp). Primera columna - inmunofluorescencia de Mtch2 (verde), segunda columna - tinción nuclear con DAPI (azul), tercera columna - superposición de imágenes. Barra de escala: 50 micrómetros.

En el testículo de 7 dpp, donde aún no se ha iniciado la meiosis y los cordones seminíferos están compuestos exclusivamente por espermatogonias y células somáticas, no detectamos la presencia de Mtch2, mientras que en el testículo de 13 dpp (inicio de la meiosis) comienza a visualizarse una débil señal para el anticuerpo anti-Mtch2. Esta señal se mantiene a niveles aparentemente similares al menos hasta los 32 dpp.

En el testículo adulto (40 dpp) la señal es evidentemente más intensa respecto a etapas previas del desarrollo (**figura 4.10**), nuevamente indicando que la expresión de la proteína Mtch2 aumenta al alcanzarse la adultez. Esto concuerda con los resultados observados mediante la técnica de Western blot. A su vez, es coherente con los análisis de RT-PCR semicuantitativa, que permitieron detectar el ARNm de Mtch2 en testículo adulto pero no en testículo de individuos neonatos.

En la figura 4.11 se observan a mayor aumento secciones de túbulos/cordones de algunas de las edades estudiadas. Se aprecia con claridad el aumento en los niveles de Mtch2 en el testículo de individuos de 40 dpp.

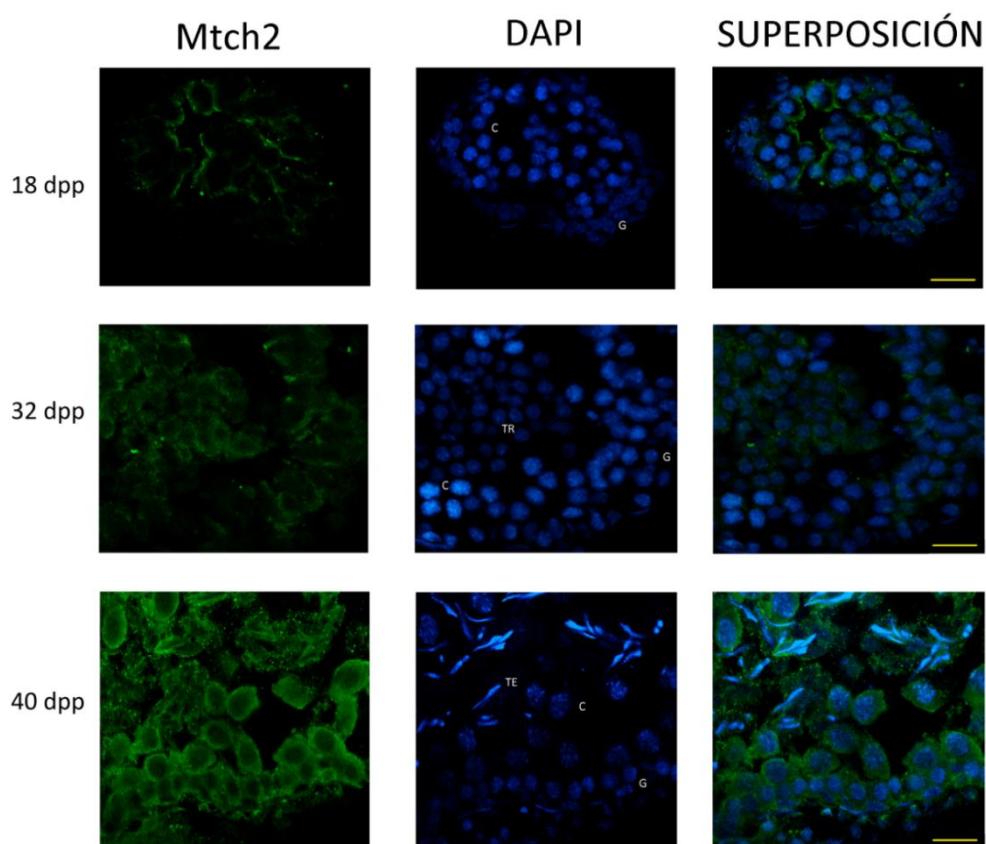


Figura 4.11. Observación del patrón de expresión de Mtch2 en testículo de ratas de diferentes edades, observado a mayor aumento. A la izquierda de cada fila se consignan las edades de los individuos utilizados en cada caso (18, 32 y 40 dpp). Primera columna- inmunofluorescencia de Mtch2 (verde), segunda columna - tinción nuclear con DAPI (azul), tercera columna - superposición de imágenes. G- espermatogonia, C- espermatocito, TR- espermatida redonda y TE- espermatida elongada. Barra de escala: 20 micrómetros.

Por otra parte, parece evidenciarse señal para Mtch2 en todos los tipos celulares, en las diferentes edades estudiadas. En tal sentido, si bien en algunos cortes pareció observarse que la señal era más intensa a nivel de los espermatoцитos (por ejemplo, véase la imagen de 18 dpp de la **figura 4.11**), los estudios de inmunohistoquímica no resultan concluyentes al respecto.

Estudios de localización de Mtch2 en diferentes estadios del ciclo del epitelio seminífero

Como resultado del análisis de numerosas imágenes obtenidas en cortes de testículo adulto (40-60 dpp), se detectó la existencia de diferencias en la distribución e intensidad de fluorescencia de Mtch2 en diferentes túbulos observados. Esto nos llevó a analizar la posibilidad de que existieran diferencias en cuanto a la expresión y distribución de Mtch2 entre distintas asociaciones celulares del epitelio seminífero, por lo que se procedió a identificar túbulos en diferentes estadios del epitelio y se describió la expresión de Mtch2 en ellos.

Como se aprecia en la figura 4.12, en los estadios II-III se pueden identificar tanto espermatogonias como espermatoцитos, espermátidas redondas y elongadas. La forma y posición de las espermátidas elongadas nos permiten diferenciar estos estadios de estadios de los posteriores ya que sus núcleos se encuentran próximos a la luz del túbulo y su ADN aún no ha alcanzado el máximo estado de compactación.

En los estadios IV-V, al igual que en los anteriormente descritos, se observan espermatogonias, espermatoцитos, espermátidas redondas y elongadas, pero los núcleos de las espermátidas elongadas presentan un mayor nivel de compactación de la cromatina que en estadios previos. A su vez, estas espermátidas elongadas se localizan en una posición más cercana a la membrana basal (más alejadas de la luz) respecto a etapas anteriores, en concordancia con los eventos finales que ocurren durante la espermiación (ver Russel *et al.*, 1990).

Con respecto a los estadios X-XI, éstos se caracterizan por la ausencia de espermátidas redondas y la presencia de espermátidas elongadas en sus primeros pasos de diferenciación (etapas 10 y 11 de la espermiogénesis). Los núcleos de estas espermátidas son diferenciables debido a que si bien no son redondos, aún no han adquirido la forma clásica de “coma” que se observa en etapas posteriores de la espermiogénesis. Esta

particularidad, junto con la ausencia de espermátidas redondas y la presencia de espermatoцитos con núcleos grandes nos permitieron reconocer estos estadios.

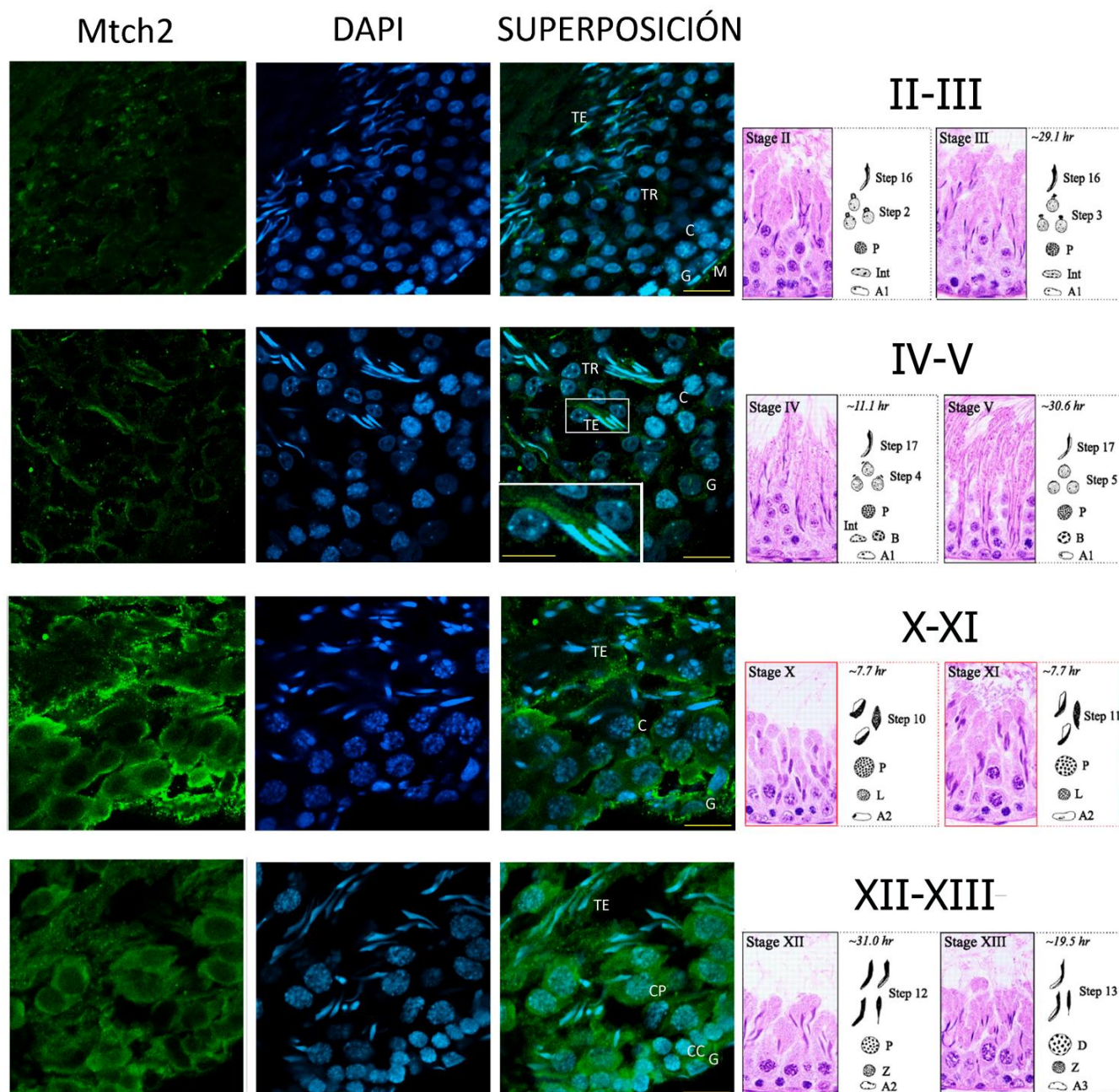


Figura 4.12. Mtch2 presenta diferentes perfiles de expresión en distintas asociaciones celulares del epitelio seminífero. Inmunohistoquímica de testículo de rata adulta. Se observan, de arriba hacia abajo: estadios II-III, estadios IV-V, estadios X-XI y estadios XII-XIII. Primera columna - Mtch2 (en verde), segunda columna - tinción nuclear con DAPI (en azul), tercera columna -superposición de imágenes. En la segunda fila se muestra dentro de un recuadro al detalle la presencia del antígeno a nivel de la pieza media de las espermátidas. Barra de escala: 20 micrómetros. Barra dentro del recuadro: 10 micrómetros. A la derecha de las inmunofluorescencias se muestran tinciones con hematoxilina-eosina y esquemas de las asociaciones celulares de rata correspondientes, en cada caso, junto con la duración aproximada de cada una en horas. Los estadios X-XI están enmarcados en rojo para señalar el momento aproximado en el que los espermatoцитos leptoténicos atraviesan la barrera hematotesticular para entrar al compartimento adluminal. En estos esquemas PL señala los espermatoцитos preleptoténicos, L los espermatoцитos leptoténicos, Z los espermatoцитos cigoténicos, P los espermatoцитos paquiténicos y D los espermatoцитos diploténicos (modificado de Mruck *et al.*, 2008).

Por último, los estadios XII-XIII, al igual que los estadios X-XI, carecen de espermátidas redondas, una característica que hace a estos túbulos fácilmente identificables. Estos estadios constan claramente de dos hileras de espermatoцитos, unos más periféricos con núcleo más pequeño (probablemente espermatoцитos cigoténicos), y otros más centrales y de mayor tamaño (seguramente espermatoцитos paquiténicos o diploténicos). Además de las características morfológicas ya expuestas, los estadios XII-XIII fueron determinados en base a la morfología de los núcleos de las espermátidas elongadas, que van adquiriendo su clásica forma de “coma”.

Si analizamos la distribución de Mtch2 en cada una de las asociaciones de células germinales se pueden observar diferencias en cuanto a la cantidad de antígeno presente, siendo ésta mayor en los estadios X-XIII en relación a los estadios II-V aquí identificados. Esta diferencia en los niveles de Mtch2 entre estadios, que se aprecia claramente en la figura 4.12, fue consistente en todos los cortes analizados.

El antígeno en túbulos en estadio IV-V puede ser detectado en todos los tipos de células germinales presentes, tanto en espermatogonias, como en espermatoцитos y espermátidas redondas. Es más, si observamos las espermátidas elongadas presentes en esta asociación celular (últimas etapas del proceso de espermiogénesis), podemos notar que Mtch2 se localiza a nivel de la pieza media de la espermátida en elongación (**figura 4.12**, fila 2, recuadro a mayor aumento).

Más allá de las observaciones anteriormente descritas, como hemos mencionado, a nivel global parece detectarse señal para Mtch2 en todos los tipos celulares presentes en los diferentes estadios.

Análisis de la expresión testicular de Mtch2 en los distintos tipos celulares

Como hemos visto, al analizar los resultados de inmunofluorescencia encontramos que en el testículo adulto se encontraron altas concentraciones del antígeno respecto a etapas previas del desarrollo, y a su vez se encontraron diferencias entre distintos estadios del epitelio seminífero. Además, se demostró que los niveles de expresión de la proteína Mtch2 en el testículo eran mayores que en otros tejidos, reproduciendo a nivel proteico lo previamente observado a nivel de ARNm. Sin embargo, las observaciones realizadas hasta el momento no permitían determinar si las diferencias cuantitativas observadas a nivel de la expresión del ARNm de *Mtch2* entre espermatoцитos paquiténicos y espermátidas redondas

se mantenían a nivel proteico. Si bien algunas observaciones de inmunofluorescencia en cortes sugerían una mayor concentración de Mtch2 en los espermatocitos (a modo de ejemplo, ver **figura 4.11**, 18 dpp), los resultados no eran concluyentes.

Como aproximación para identificar las células meióticas y posmeióticas se diferenciaron las células presentes en el testículo por su contenido de ADN, mediante citometría de flujo esta tinción permite distinguir 3 poblaciones celulares en el testículo, con distintos contenidos de ADN: C, 2C y 4C (**figura 4.13**). La población C está formada por espermátidas (haploides), tanto redondas como elongadas. La población 2C está conformada por células somáticas y espermatogonias y, en menor proporción espermatocitos secundarios, mientras que la población 4C está constituida por espermatocitos primarios y en menor medida células somáticas en fase G2 (Malkov *et al.*, 1998). Normalmente los espermatozoides se visualizan como un pico sub-haploide, resultado del alto grado de compactación que tiene la cromatina en este tipo de células (Zante *et al.*, 1977).

Como se aprecia en la figura 4.13, las poblaciones celulares en el testículo de rata de 40 dpp muestran las siguientes proporciones: C: 72%, 2C: 17% y 4C: 11%, similares a lo observado por Malkov *et al.* (1998). Los datos citométricos indican que bajo nuestras condiciones experimentales el ADN se tiñe de manera eficiente, conservando la relación estequiométrica entre los picos C, 2C y 4C. No se discrimina aún claramente un pico sub-haploide dado que, por lo visto, este individuo no poseía la madurez sexual suficiente como para presentar una cantidad notoria de espermatozoides.

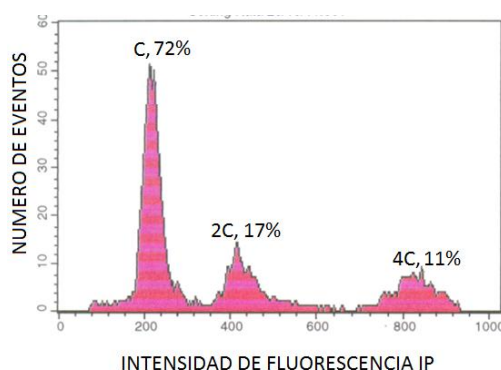


Figura 4.13. El testículo adulto de la rata presenta 3 poblaciones con contenido de ADN diferente. Tinción de suspensión celular de testículo de 40 dpp con IP. Histograma en el que se representa intensidad de fluorescencia del IP vs cantidad de eventos. Los porcentajes relativos de las poblaciones celulares testiculares C, 2C y 4C están indicados dentro del histograma.

Mediante el uso de un citómetro FACS-Vantage se determinó la intensidad de fluorescencia roja y verde de cada evento o célula, siendo estos datos un reflejo del

contenido de ADN y de la concentración de antígeno Mtch2, respectivamente. Como control experimental un grupo de células no fue expuesto al anticuerpo primario, y este control nos permitió establecer los niveles de fluorescencia intrínseca de las propias células, haciendo posible de esta manera cuantificar los niveles del antígeno.

Como se observa en la figura 4.14, el experimento permitió diferenciar tres poblaciones, con contenidos de ADN C, 2C y 4C. A su vez, los niveles de fluorescencia del control son claramente inferiores a los de las células que fueron expuestas al anticuerpo primario anti-Mtch2, por lo que podemos adjudicar la señal detectada en dichas suspensiones celulares a la fluorescencia emitida como consecuencia de la detección de Mtch2.

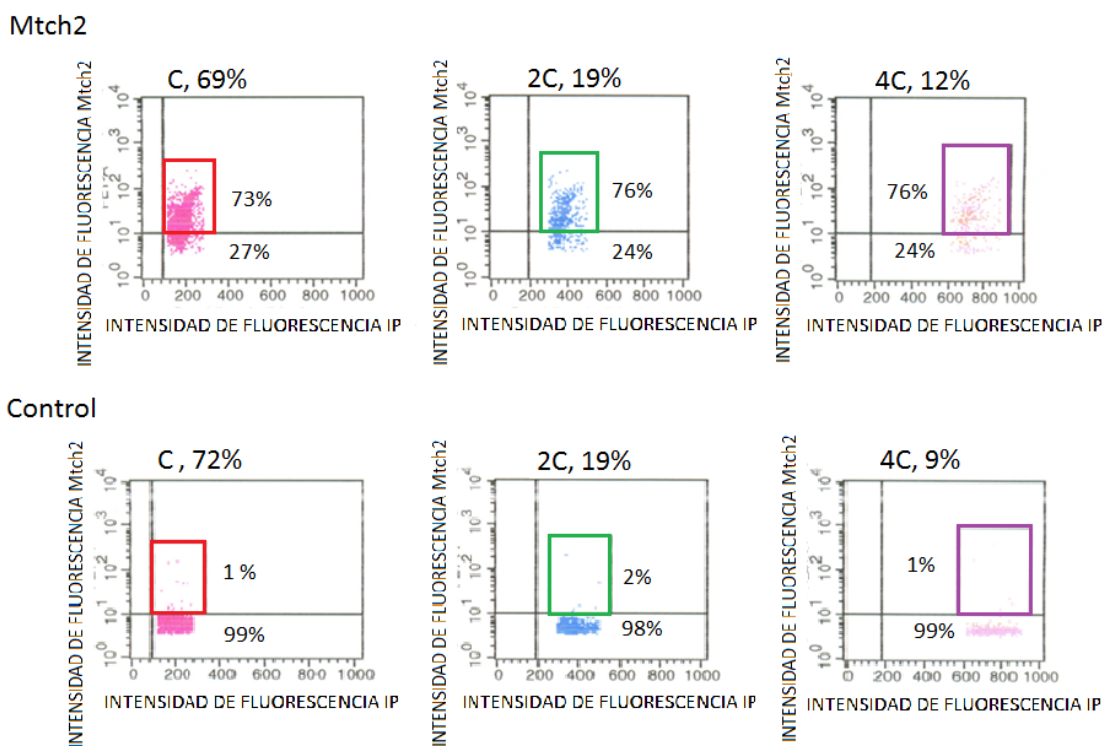
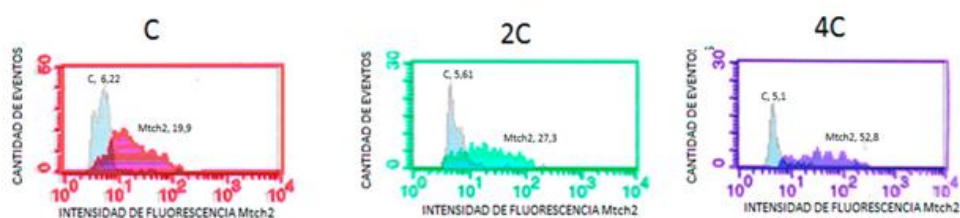


Figura 4.14. Inmunodetección de la expresión de Mtch2 en suspensión de células de testículo adulto mediante citometría de flujo. Inmunocitoquímica contra Mtch2 en suspensión celular de testículo de 40 dpp teñida con IP. En la primera fila se observa la detección de Mtch2 mientras que la segunda fila representa el control experimental en el que no se incluyó anticuerpo primario. En los 6 histogramas se representa intensidad de fluorescencia del IP vs intensidad de fluorescencia de Mtch2. La primera columna representa la población de células con contenido de ADN C, la segunda 2C y la tercera 4C. En la parte superior de cada histograma se indica el porcentaje correspondiente a esa población, del total de eventos analizados. En cada histograma se encuentran enmarcados dentro de recuadros aquellos eventos que emiten fluorescencia como resultado de la detección de Mtch2 (rojo para la población C, verde para la población 2C y violeta para la población 4C), y se indica qué porcentaje del total de eventos representa.

Para poder establecer diferencias cuantitativas en los niveles de expresión de Mtch2 entre las distintas poblaciones, se determinó la intensidad de fluorescencia media de aquellos eventos que se consideraron positivos para la detección de Mtch2 (**figura 4.14**, Mtch2 y control, eventos contenidos dentro de recuadros coloreados). Dicho valor se tomó como un reflejo de los niveles del antígeno, obteniéndose resultados reproducibles a lo largo de 7 experimentos (**figura 4.15**).

En la figura 4.15.A se superpusieron los histogramas de intensidad de fluorescencia de Mtch2 vs cantidad de eventos, obtenidos para el grupo expuesto al anticuerpo anti-Mtch2 y para el grupo control (sin anticuerpo primario), para las tres poblaciones celulares.

A



B

Intensidad de Fluorescencia de Mtch2 (u.a.)			
	C	2C	4C
exp 1	21,68	28,6	106,65
exp 2	21,32	33,13	69,06
exp 3	19,5	26,78	55,88
exp 4	12,9	19,5	38
exp 5	15,47	20,82	25,18
exp 6	21,76	27,28	34,03
exp 7	26,85	35,65	41,02
promedio	19,93	27,39	52,83

C

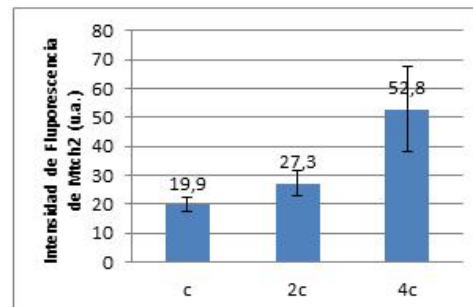


Figura 4.15. Se inmunodetectan mayores niveles de Mtch2 en la población de contenido 4C, respecto a las poblaciones 2C y C. Inmunocitoquímica de Mtch2 e intensidad media de fluorescencia correspondiente a Mtch2 vs contenido de ADN en células de testículo de 40 dpp. A. Se observan tres histogramas en los que se grafica intensidad de fluorescencia de Mtch2 vs cantidad de eventos. En rojo (contenido de ADN C), verde (contenido de ADN 2C) y violeta (contenido de ADN 4C) se representan las muestras expuestas al anticuerpo primario, mientras que en celeste se representan dentro de cada histograma las muestras control sin anticuerpo primario. Dentro de cada histograma se indica el promedio de la intensidad de fluorescencia media de los eventos analizados de 7 repeticiones, tanto para las muestras expuestas al anticuerpo primario como las muestras control. Nótese que la intensidad de fluorescencia de los eventos expuestos al anticuerpo anti Mtch2 presentan un corrimiento hacia la derecha respecto a las muestras control. B. Tabla en la que se indican los valores de intensidad de fluorescencia de Mtch2 en unidades arbitrarias (u.a.) para cada uno de los experimentos realizados discerniendo entre poblaciones con contenido C, 2C y 4C de ADN. C. Gráfico de barras en el que se indican los valores de fluorescencia media de Mtch2 en u.a. para cada población definida según su contenido de ADN. Para cada promedio se muestran los respectivos desvíos estándar.

Analizando los histogramas en la figura 4.15.A, vemos que los eventos control (representados en los 3 histogramas mediante el color celeste) se acumulan en un pico angosto con baja intensidad de fluorescencia. El hecho de que el pico sea angosto y alto significa que gran cantidad de eventos presentaron una intensidad de fluorescencia similar. A su vez podemos indicar que los eventos control presentan una intensidad de fluorescencia baja respecto a los eventos que fueron expuestos a anticuerpo primario, reflejándose este fenómeno en el corrimiento de los eventos hacia la izquierda sobre el eje en que se representa intensidad de fluorescencia correspondiente a Mtch2. El corrimiento de los eventos expuestos al anticuerpo primario hacia valores de mayor intensidad de fluorescencia es un reflejo de la detección del antígeno Mtch2. Tanto la población C, 2C, como la 4C presentan mayores niveles de fluorescencia que sus respectivos grupo control, indicando por lo tanto que la proteína se expresa en todos los tipos celulares dentro del testículo, en concordancia con lo observado por inmunofluorescencia.

A diferencia del grupo control donde vemos un pico único y marcado, todos los eventos expuestos a Mtch2 (grupo C, 2C y 4C) presentan una distribución similar a una campana; esto significa que números variables de eventos presentaron diferentes intensidades de fluorescencia (siempre mayores a los respectivos controles). Si consideramos el promedio de fluorescencia entre todos los eventos en los que se detecta Mtch2 como una medida que refleja las cantidades de antígeno, las tres poblaciones celulares C, 2C y 4C presentaron diferencias cuantitativas entre sí. La población con contenido de ADN 4C presentó mayores niveles de fluorescencia que las poblaciones 2C y C (**figura 4.15.B y C**), y en ambos casos estas diferencias resultaron significativas ($p < 0,05$ y $p < 0,005$ respectivamente).

En conclusión, Mtch2 presenta los mayores niveles de expresión a nivel de la población con contenido 4C de ADN en el testículo de la rata joven adulta. Es decir, que la proteína Mtch2 se expresa diferencialmente en las células en profase meiótica, por lo tanto reproduciendo a nivel de proteína los resultados previamente obtenidos a nivel de ARNm (“differential display” y ensayos semicuantitativos de RT-PCR), que indicaban que el gen *Mtch2* se expresaba a mayores niveles en los espermatoцитos paquiténicos que en las espermátidas redondas.

Patrón peculiar de expresión de Mtch2 en algunas células aisladas

Una particularidad que se observó, más allá de las variaciones en los niveles de expresión de Mtch2 a través del desarrollo, es que en túbulos de distintas edades se apreciaba que algunas células presentaban un patrón diferencial de inmunomarcación de Mtch2, con un nivel de intensidad mucho mayor al de las células aledañas y una distribución peculiar que abarcaba a toda la célula, tanto a nivel del citoplasma como del núcleo. (**figura 16**)

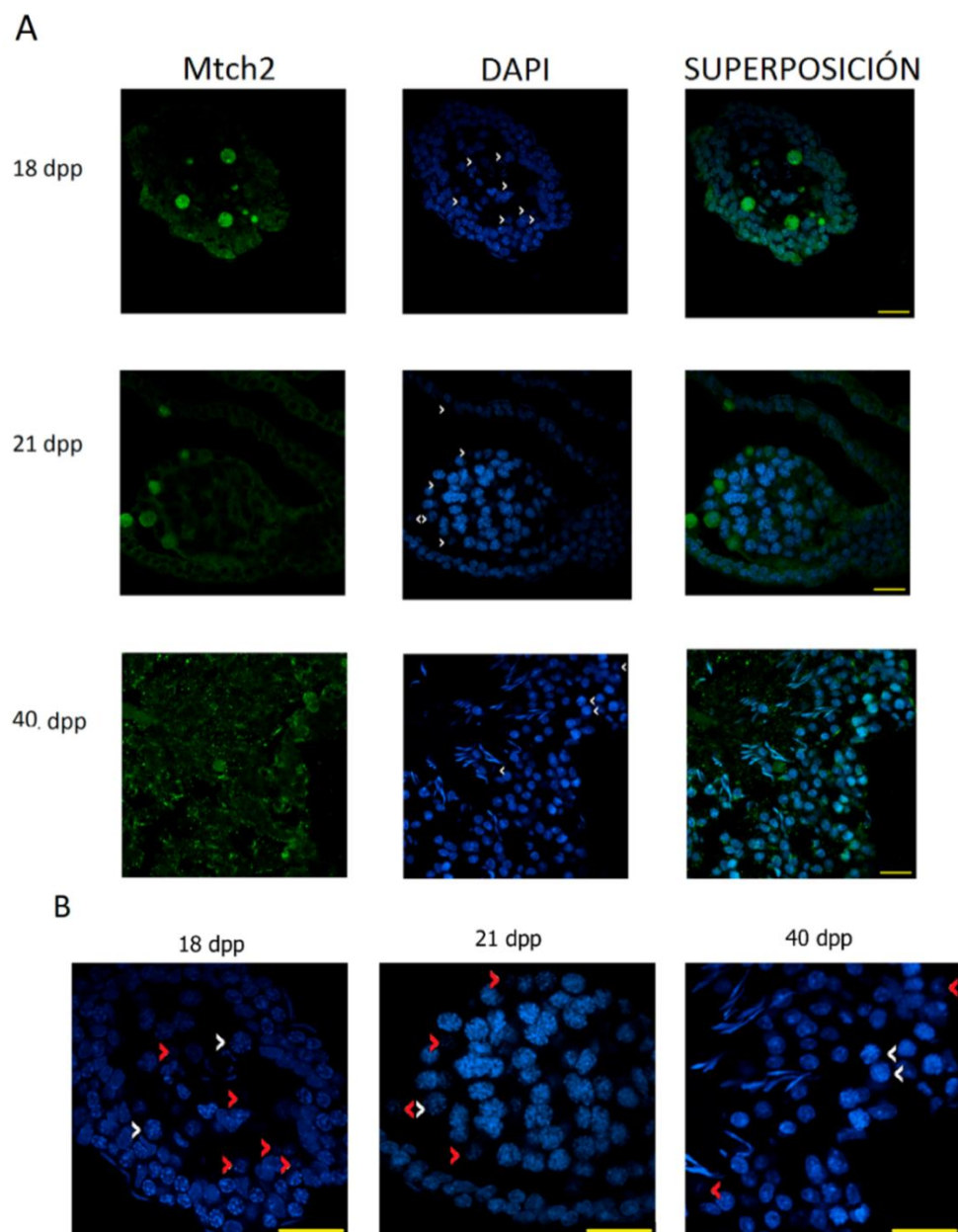


Figura 4.16. Células con patrones de inmunomarcación peculiar fueron halladas en cortes de cordones/ túbulos de distintas edades. A. Inmunofluorescencia en criosecciones de testículo de ratas de distintas edades (18, 21 y 40 dpp). Izquierda: Mtch2 (verde), centro: DAPI (azul), derecha: superposición de imágenes. Las puntas de flecha señalan los núcleos de las células marcadas intensamente. B. Imagen aumentada para mostrar los núcleos pertenecientes a células marcadas diferencialmente teñidos con DAPI. Las puntas de flecha rojas señalan los núcleos con morfología alterada, en tanto las puntas de flecha blancas indican los núcleos con morfología de apariencia normal. Barra de escala: 20 micrómetros.

A modo de ejemplo, en la figura 4.16.A se observan cortes de cordones/túbulos seminíferos de testículo de ratas macho de 18, 21 y 40 dpp, en los que el fenómeno referido resulta evidente. Se observa también que muchos de los núcleos correspondientes a las células con fuerte expresión de *Mtch2* presentan una morfología alterada respecto a los núcleos coexistentes dentro del mismo cordón/túbulo (**figura 4.16.B**). Curiosamente, la mayor parte de los núcleos que aparecen con morfología alterada, por su ubicación en el túbulo y células adyacentes, parecen corresponder a espermatoцитos.

4.3 Estudios de Muerte Celular Programada (MCP)

Como se mencionó en la Introducción de este trabajo, *Mtch2* ha sido asociada con aspectos de la MCP, y en hígado de ratón funcionaría como un receptor a nivel de MME para la proteína tBid, aumentando la susceptibilidad celular a señales de inducción de la MCP. Sin embargo, también nos hemos referido a la existencia de cierta evidencia que asocia polimorfismos en *Mtch2* con índices de masa corporal altos y aumento de expresión del gen en relación con obesidad femenina, además de un vínculo entre la reducción de la expresión de *Mtch2* y un aumento en la invasividad *in vitro* de ciertos tumores (ver Introducción).

Por otra parte, hemos descrito en la sección anterior la presencia de niveles muy elevados de expresión de la proteína en algunas células aisladas en el testículo de rata. Curiosamente, la mayoría de estas células se caracteriza por la presencia de una morfología nuclear alterada, que recuerda a la morfología que adquieren los núcleos durante el proceso de apoptosis (Kerr *et al.*, 1972).

La información existente, junto con los resultados obtenidos por nosotros para testículo de rata, nos llevaron a preguntarnos si *Mtch2* podría estar desempeñando, en el testículo, alguna función vinculada con la MCP. Con el objeto de intentar aproximarnos a una respuesta para esta pregunta, se llevaron a cabo una serie de estudios en el testículo de la rata bajo condiciones normales de desarrollo y bajo condiciones de inducción de la MCP testicular.

Inmunomarcación en testículo normal con anticuerpo anti-*Mtch2* y reacción de TUNEL

Como primer paso para analizar si la expresión de *Mtch2* se podía correlacionar con eventos de MCP, nos propusimos analizar el patrón de inmunolocalización de *Mtch2* en el

testículo de la rata en relación al marcador TUNEL (“Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling”). La técnica de TUNEL permite detectar la fragmentación del ADN que ocurre en células apoptóticas como resultado de la activación de diferentes nucleasas. El ADN nuclear se degrada generándose múltiples sitios 3'-hidroxi terminales libres, y estos sitios pueden ser detectados a través de la utilización de nucleótidos de deoxiuridina trifosfato marcados con moléculas fluorescentes y una enzima especializada llamada deoxinucleotidil transferasa (TdT), que cataliza la adición de deoxiribonucleosidos trifosfato en sitios 3'-hidroxi terminales libres. Como resultado, se incorpora el nucleótido marcado en los sitios en los que el ADN fue escindido en los núcleos de células apoptóticas (Gavrieli *et al.*, 1992). Dado que los mayores niveles de Mtch2 se habían detectado en testículo adulto, se decidió realizar estos estudios en individuos de 40 a 60 dpp.

Al analizar la presencia de células TUNEL-positivas en el testículo adulto, podemos apreciar que la fragmentación del ADN es un evento comúnmente observable a nivel de los túbulos seminíferos, encontrándose más de una célula TUNEL-positiva en algunos túbulos (**figura 4.17**, células indicadas con punta de flecha blanca).

Dada la morfología nuclear alterada en los núcleos de las células sometidas a MCP, es muchas veces difícil determinar de qué tipo celular en particular se trata. Sin embargo, si lo inferimos a partir de su localización a nivel del túbulo seminífero, al parecer los espermatocitos se ven afectados por la fragmentación del ADN, pero también se verían afectadas espermatogonias y espermatidas elongadas (ver **figura 4.17**).

Un fenómeno particular que se puede apreciar en muchas células TUNEL-positivas, cuando analizamos la distribución de Mtch2 (en rojo), es que estas células presentan una inmunomarcación diferencial del antígeno Mtch2. Este fenómeno, que se evidencia en la figura 4.17 (ver células señaladas con puntas de flecha), puede observarse con más claridad en la figura 4.18, en la que se muestran núcleos a gran aumento. La intensidad de la señal de Mtch2 es claramente superior en estas células TUNEL-positivas respecto a las células vecinas. Esto nos lleva a considerar la posibilidad de que aquellas células que habíamos observado que presentaban un patrón de inmunomarcación peculiar para Mtch2 junto con una morfología nuclear alterada (**figura 4.16**), fueran células destinadas a morir.

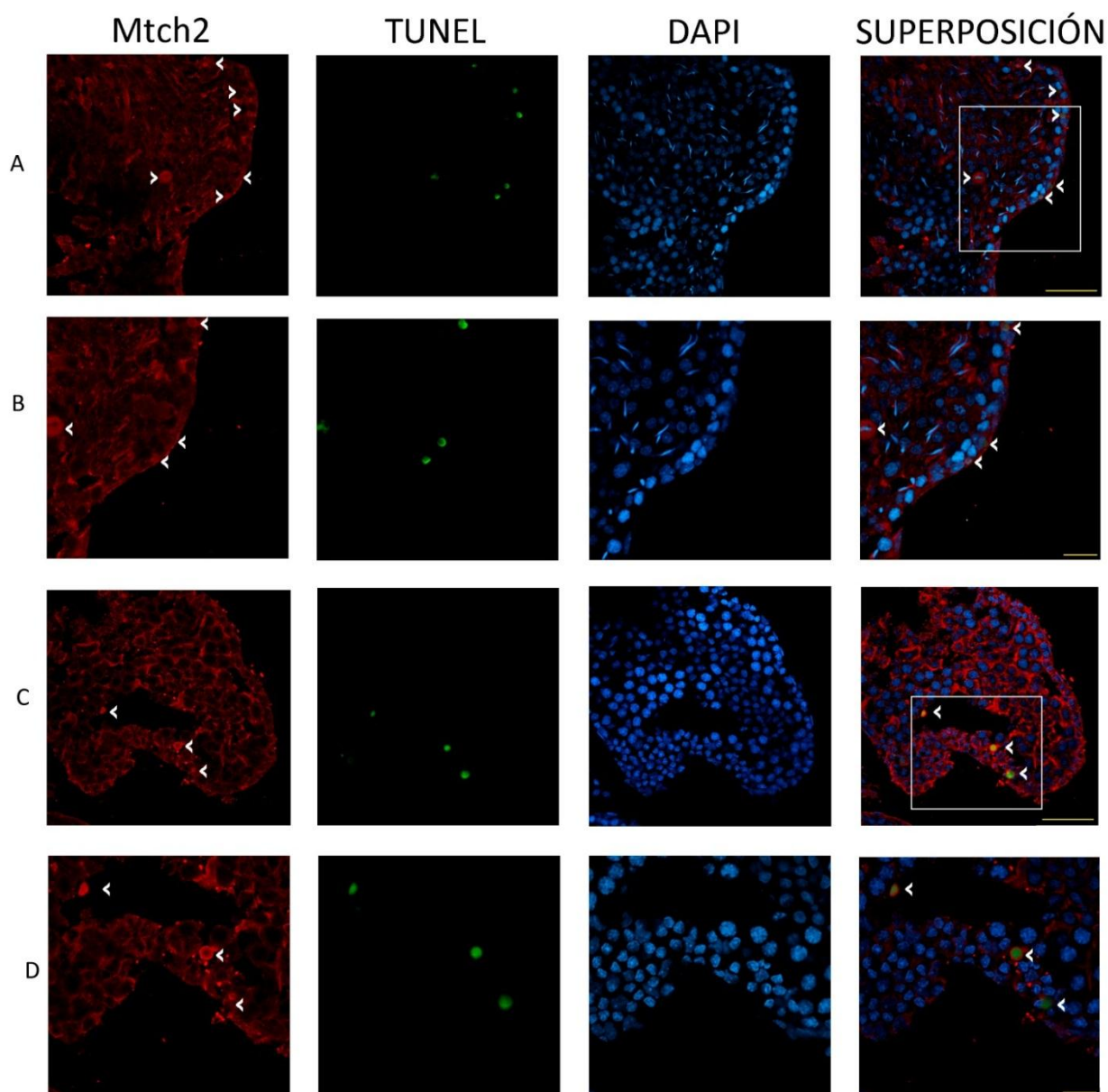


Figura 4.17. Detección de células TUNEL-positivas y co-localización con Mtch2 en túbulos seminíferos de rata. En A y C se muestran imágenes panorámicas de secciones de túbulos seminíferos de rata adulta joven sometidos a triple tinción con marcador TUNEL, anticuerpo anti-Mtch2 y DAPI. En B y D se muestran, a mayor aumento, las regiones enmarcadas en recuadros en la última columna de A y B respectivamente. Primera columna - inmunolocalización de Mtch2 (en rojo), segunda columna - reacción de TUNEL (en verde), tercera columna - tinción del ADN con DAPI (en azul), cuarta columna –superposición de imágenes. Barras de escala: (A, C) 50 micrómetros, (B, D) 20 micrómetros. Las puntas de flecha señalan células TUNEL-positivas.

Por otra parte, si bien no estamos aún en condiciones de asegurar que las células TUNEL-positivas que coincidentemente presentan elevados niveles de expresión de Mtch2 sean espermatoцитos (y mucho menos que se trate de espermatoцитos exclusivamente), al menos en varios ejemplos, las características aún visibles en dichos núcleos en degeneración, así como su localización y células circundantes, sugieren que se trataría de dicho tipo celular (**figura 4.18**, A, B y E, por ejemplo).

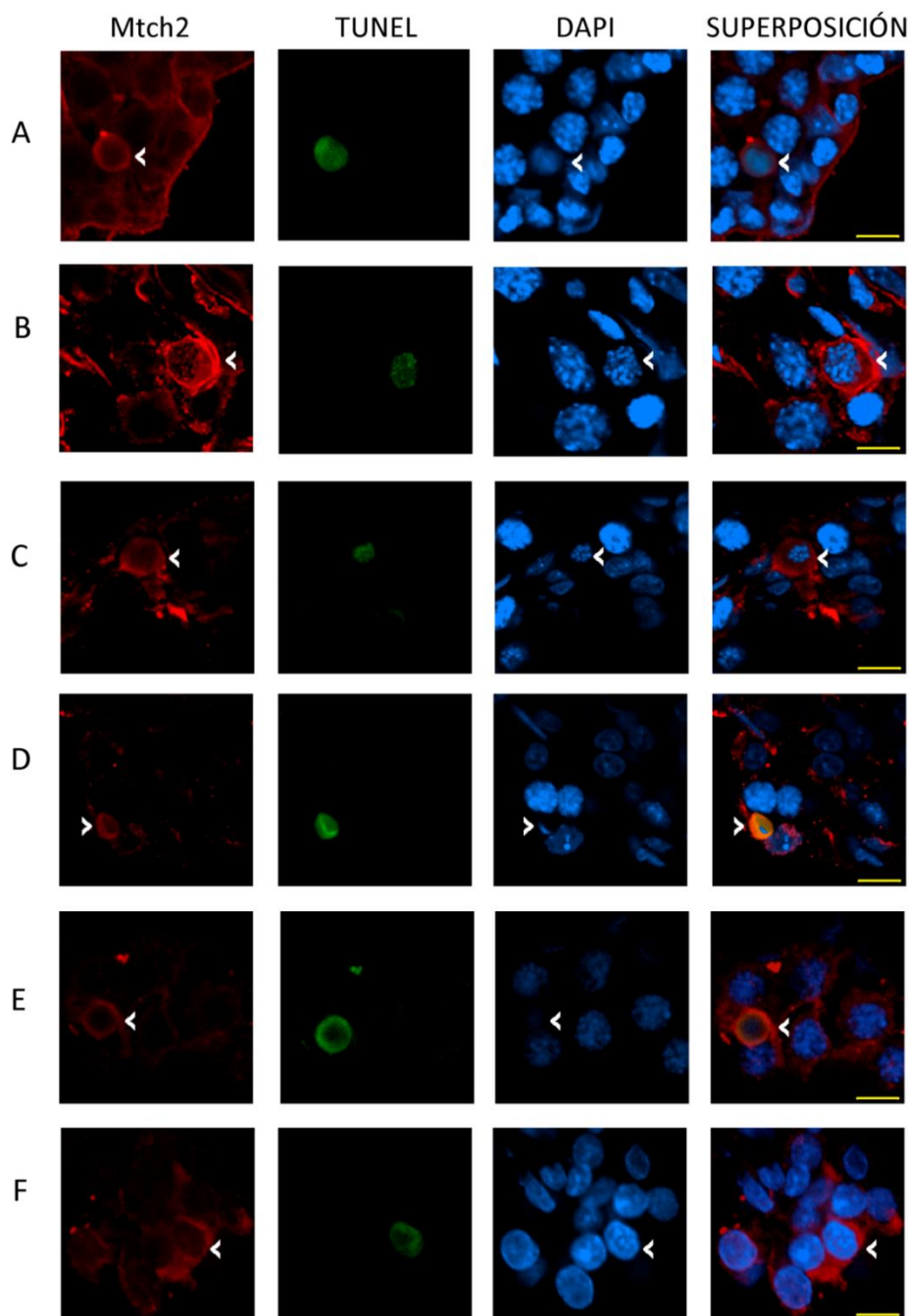


Figura 4.18. Se encuentran células TUNEL-positivas en las cuales el patrón de expresión de Mch2 es diferencial respecto al de las células vecinas. Triple tinción de testículo de rata adulta joven. Primera columna - inmunolocalización de Mch2 (en rojo), segunda columna - células TUNEL positivas (en verde), tercera columna - tinción del ADN con DAPI (en azul), cuarta columna – superposición. Barra de escala: 10 micrómetros. Con puntas de flecha blancas se señalan células TUNEL-positivas.

Estudios de MCP y evaluación de la expresión de Mch2 en individuos sometidos a hipertermia moderada

Para evaluar mejor la relación de Mch2 con la MCP en el testículo, se expusieron ratas a condiciones de hipertermia escrotal moderada, técnica que ha sido aplicada en el pasado con excelentes resultados en estudios de expresión de proteínas involucradas en la

ejecución de programas apoptóticos a nivel testicular (Lue *et al.*, 1999; Sinha Hikim *et al.*, 2003). La finalidad fue intentar describir variaciones en el patrón de expresión de Mtch2 en el marco de un tratamiento que induce la MCP en células germinales, durante las primeras 6 horas postratamiento. Dentro de este lapso se alcanzan los mayores niveles de apoptosis, en particular a nivel de espermatoцитos paquiténicos y espermátidas redondas tempranas (Sinha Hikim *et al.*, 2003). Como control experimental se sometieron individuos a las mismas condiciones experimentales, pero a temperatura ambiente. Se realizaron extractos proteicos de testículo a las 0,5, 1, 3 y 6 horas.

Como control de funcionamiento del tratamiento de hipertermia, se analizó el patrón de expresión de caspasa 3 activa. La caspasa 3 en su forma activa representa un indicador de la inducción de apoptosis. Esta proteína es conocida como la caspasa efectora, dado que es la responsable de degradar diferentes dianas moleculares que tendrán como efecto final un desensamblaje programado de la célula (Green, 1998; Slee *et al.*, 2001).

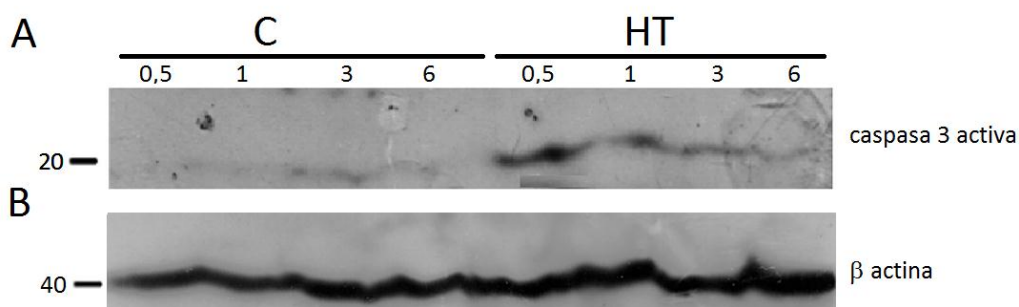


Figura 4.19. En testículos expuestos a hipertermia moderada hay mayores niveles de activación de caspasa 3. A. Western blot contra caspasa 3 activa. B. Western blot contra β -actina. Carriles 1 a 4, lisados totales de testículo control a 0.5, 1, 3 y 6 horas pos-exposición escrotal a temperatura ambiente. Carriles 5 a 8, lisados totales de testículo tratados a los mismos tiempos pos-exposición escrotal a hipertermia moderada. A la izquierda de la figura se consignan los pesos moleculares (kDa) de las bandas del marcador de peso molecular (*PageRulerTM Protein Ladder*, Fermentas) que migran a altura similar.

Al analizar el clivaje de caspasa 3 durante el tratamiento de hipertermia moderada, se nota que el grupo tratado presenta mayores niveles de caspasa 3 activa respecto al grupo control. Dado que en el control de carga (β -actina) se aprecia que en todos los carriles hay cantidades equiparables de proteína total, podemos concluir que existe una activación de caspasa 3 inmediatamente tras la exposición de los testículos a hipertermia moderada.

A continuación se realizaron cortes de testículos de los individuos expuestos a hipertermia moderada y del grupo control, y se efectuaron ensayos de inmunolocalización

de Mtch2 en conjunto con marcación de TUNEL. Como se observa en la figura 4.20, al analizar el marcador de TUNEL, se aprecia que existe un aumento de fragmentación del ADN entre las 3 y 6 horas postratamiento, en concordancia con los resultados previamente publicados respecto a la hipertermia moderada y la MCP en el testículo (Lue *et al.*, 1999; Sinha Hikim *et al.*, 2003).

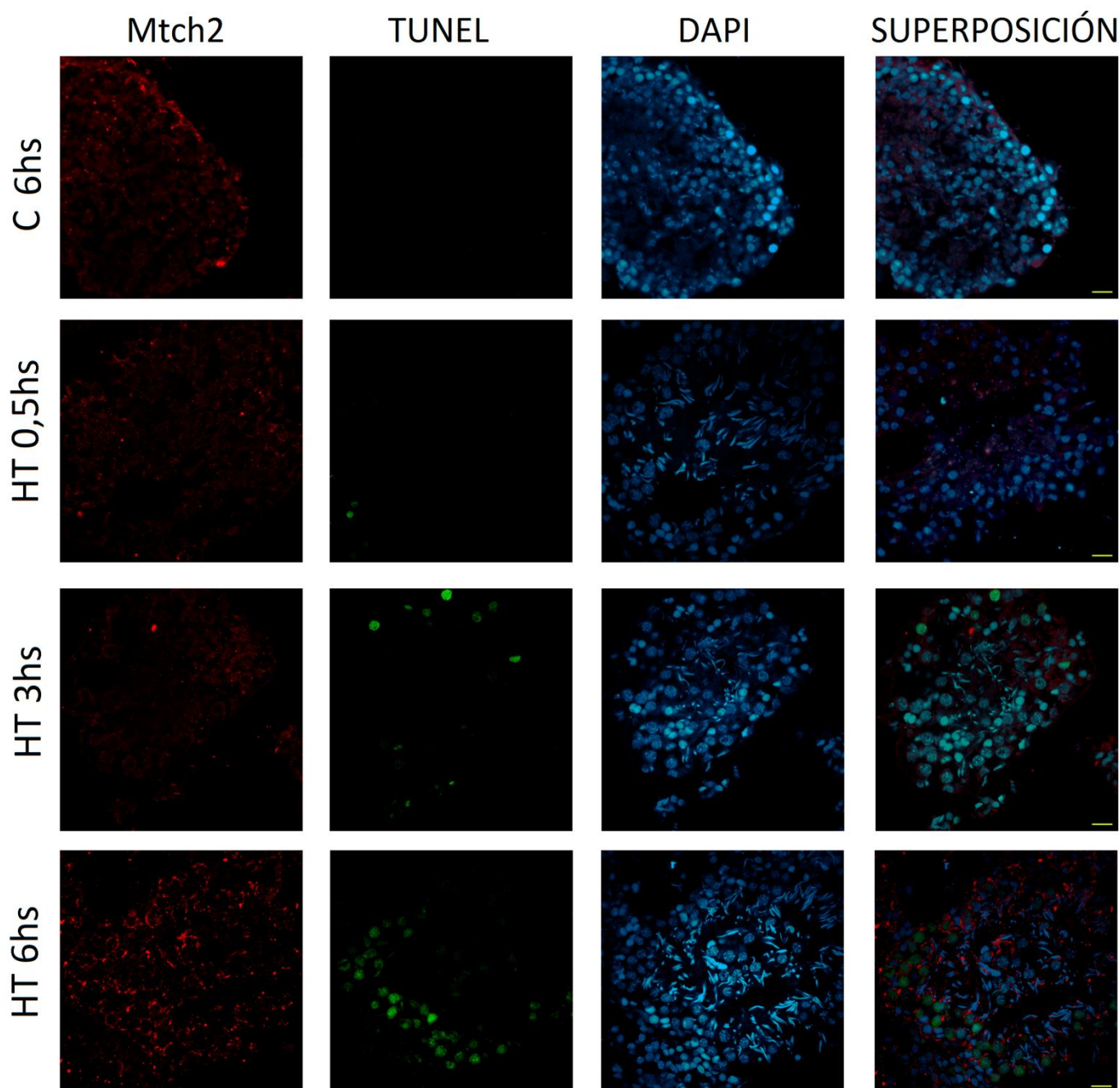


Figura 4.20. Entre las 3 y 6 horas postratamiento de hipertermia moderada aumentan la incidencia de marcación de TUNEL y la expresión de Mtch2. Triple tinción de testículo de rata adulta joven. Primera columna - inmunolocalización de Mtch2 (en rojo), segunda columna - células TUNEL positivas (en verde), tercera columna- tinción del ADN con DAPI (en azul), cuarta columna – superposición de imágenes. A la izquierda de la figura se indican, en horas, los tiempos de tratamiento. C: control a las 6 horas postratamiento a temperatura ambiente. HT: hipertermia. Barra de escala: 20 micrómetros.

Analizamos a las 6 hs postratamiento cuáles son las asociaciones de células germinales en las que detectamos mayor incidencia de la MCP mediante la técnica de TUNEL. De acuerdo a lo indicado en la bibliografía, se detectó un incremento de la MCP a nivel de estadios I-IV y XII-XIV (Sinha Hikim *et al.*, 2003). A modo ilustrativo, en la figura 4.21 se muestran un túbulo en estadios I-II donde la MCP afecta principalmente a las espermatidas redondas, y un túbulo en estadio XII-XIII donde la MCP afecta a los espermatocitos.

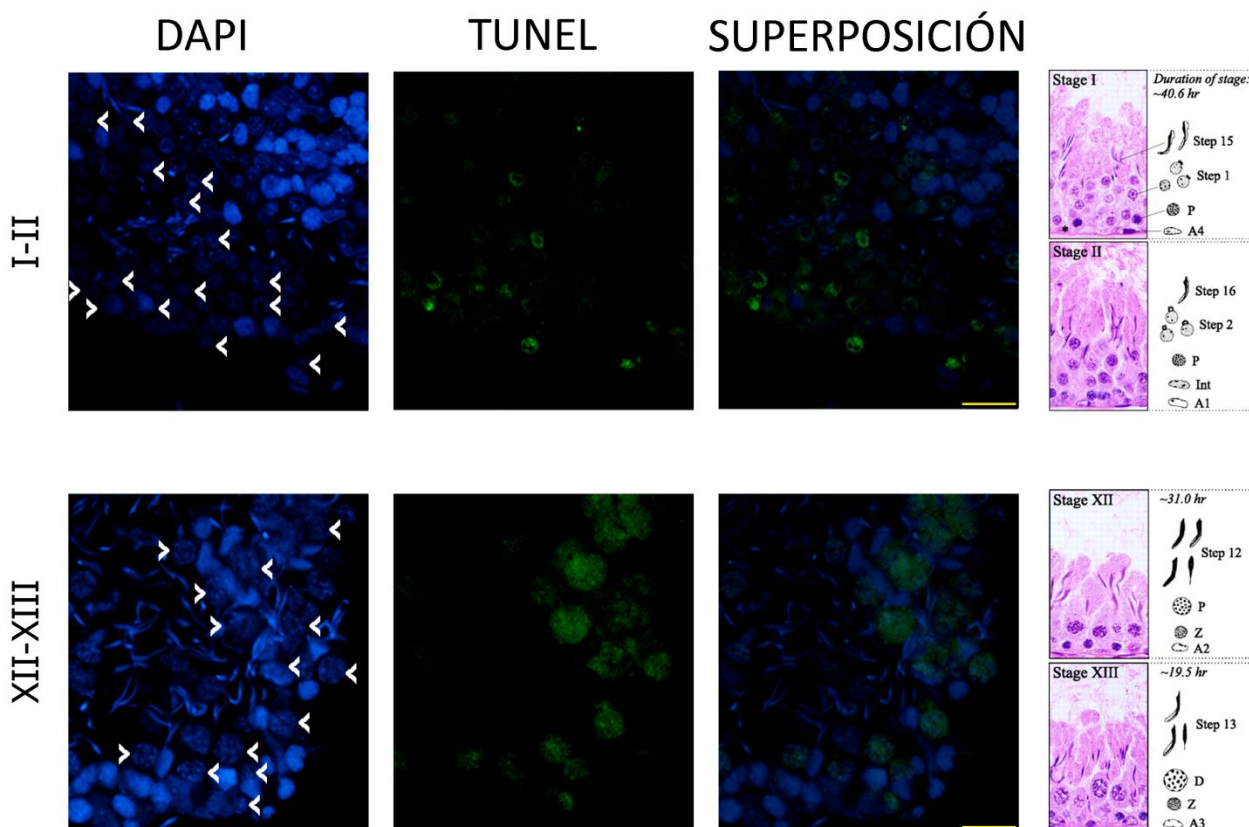


Figura 4.21. A las 6 horas postratamiento de hipertermia moderada aumentan la incidencia de marcación de TUNEL en espermatidas redondas en estadios I-II y en espermatocitos en estadios XII-XIII. Identificación de células TUNEL-positivas en distintas asociaciones celulares de testículo expuesto a hipertermia moderada, a las 6 hs. postratamiento. Primera columna - tinción del ADN con DAPI (en azul), segunda columna - células TUNEL positivas (en verde), tercera columna- superposición de imágenes. Cuarta columna – esquemas de sección transversal del epitelio seminífero de la rata teñido con hematoxilina-eosina y una ilustración de las distintas células germinales asociadas en cada estadio en particular, junto con la duración aproximada del mismo (en horas). En estos esquemas Z señala los espermatocitos cigoténicos, P los espermatocitos paquiténicos y D los espermatocitos diploténicos (modificado de Mruck *et al.*, 2008). Barra de escala: 20 micrómetros.

Con respecto a la señal de Mtch2, a nivel global los niveles de fluorescencia parecen homogéneos tanto en el grupo tratado hasta las 3 horas postratamiento, como en el grupo control incluso luego de 6 horas. A las 6 horas postratamiento de hipertermia, en cambio, se

nota un aumento de la fluorescencia de Mtch2 respecto a los demás tiempos de tratamiento, y respecto al control incubado durante 6 horas a temperatura ambiente (**figura 4.20**). Este incremento de señal parece bastante homogéneo en todo el túbulo, y coincide con el pico de MCP.

Comparación del patrón de expresión de Mtch2 con el de marcadores clásicos de apoptosis (caspasa 3 activada) en el testículo

Como hemos descrito anteriormente en este trabajo, se han detectado mayores niveles de expresión de Mtch2 en el testículo adulto de rata que en el juvenil. Si bien en el testículo adulto existen niveles relativamente importantes de apoptosis (Dunkel *et al.*, 1997; ver también figura 4.17, en que se observan varios núcleos TUNEL-positivos en testículo adulto), los niveles de caspasa suelen ser mayores en el testículo en desarrollo que en el adulto. Particularmente, a los 21 dpp en la rata se ha descrito un pico de apoptosis mediado por caspasa3 (Jahnukainen *et al.*, 2004).

Con el objeto de comprobar si efectivamente el pico temporal de expresión de Mtch2 no coincidía con el de caspasa 3, realizamos un nuevo experimento de Western blot empleando ambos anticuerpos. Como se observa en la figura 4.22, Mtch2 se detecta en el testículo de ratas de 40 dpp pero no el de 21 dpp, reproduciendo los resultados que ya habíamos obtenido previamente. Con respecto a los experimentos con el anticuerpo anti-caspasa 3, nuestros resultados reproducen los previamente reportados (Jahnukainen *et al.*, 2004), mostrando una mayor expresión a los 21 dpp, y confirmando que el pico temporal de expresión testicular para ambas proteínas no es coincidente.

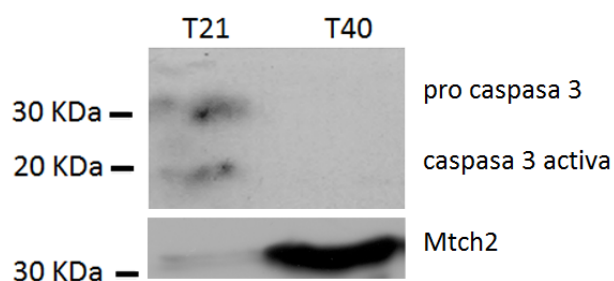


Figura 4.22. Se detectan mayores niveles de pro-caspasa 3 y caspasa 3 activa en testículo de 21 dpp en relación al testículo de 40 dpp. Western blot contra caspasa 3 y Mtch2. Carril 1- lisado total de testículo de rata de 21 dpp, carril 2 – lisado total de testículo de rata de 40 dpp. A la izquierda de la figura se consignan los pesos moleculares (kDa) de las bandas del marcador de peso molecular (*PageRuler™ Protein Ladder*, Fermentas) que migran a altura similar.

Al detectarse caspasa 3 en el testículo de 21 dpp, apreciamos un perfil de 2 bandas. La banda superior, a la altura de 30 kDa corresponde a la forma inactiva de la caspasa 3, también denominada pro-caspasa. La banda inferior, situada levemente por debajo de los 20 kDa, corresponde a la forma activada de la caspasa 3. Como se observa, tanto los niveles de pro-caspasa 3 como los de caspasa 3 activada son menores en el testículo adulto respecto al testículo de 21 dpp. Mtch2 presenta un perfil de expresión opuesto, con mayores niveles a los 40 dpp si se compara a los 21 dpp.

DISCUSIÓN

Como antecedente de este trabajo, en un experimento de *mRNA Differential Display* realizado en nuestro laboratorio, *Mtch2* había surgido como un gen expresado de manera diferencial en espermatoцитos paquiténicos respecto a espermátidas redondas, en el testículo de la rata adulta. A su vez, mediante RT-PCR a bajo número de ciclos (semicuantitativa), se confirmó dicho patrón de expresión, y también se determinó que en la rata, este gen era expresado de manera diferencial en el testículo adulto respecto al testículo del neonato y respecto a otros tejidos.

A lo largo de la presente tesis se estudió el perfil de expresión de *Mtch2* tanto a nivel de ARNm como a nivel proteico. Se investigó la expresión del gen en diferentes tejidos y en momentos clave del desarrollo de la línea germinal masculina. Asimismo, se analizó el patrón de inmunolocalización a través de distintas asociaciones celulares del epitelio seminífero, en los diferentes tipos celulares que se pueden encontrar en el testículo, y a nivel subcelular. Por último, se estudió el patrón de expresión de *Mtch2* en relación con marcadores de MCP bajo condiciones normales de desarrollo de la línea germinal y en el marco de un tratamiento que induce MCP en las células germinales.

5.1 Una variante transcripcional con UTR corto

Aunque se encontraron evidencias de la expresión de la forma canónica de *Mtch2*, a partir de una genoteca de ADNc de espermatoцитos paquiténicos de rata, se aisló una isoforma expresada por el gen no descrita previamente en las bases de datos. Podemos afirmar la prevalencia de esta isoforma sobre el transcrito canónico de *Mtch2*, al menos en espermatoцитos paquiténicos, ya que del análisis de 10 clones hemos identificado 9 que corresponden a la nueva variante, y sólo uno al transcrito canónico. Ya que todos los clones contenían una cola poli A de tamaño variable, podemos suponer que se trata de transcritos reales, procesados

La isoforma que *Mtch2* expresa en los espermatoцитos paquiténicos (no disponemos de información relativa a otros tipos celulares del testículo) es una variante transcripcional que a pesar de no presentar diferencias a nivel codificante, presenta una región 3' UTR de sólo 116 b, es decir, 1233 b más corta que la descrita. Es importante señalar que la sonda

empleada para el rastreo, de 327 pb (comprendiendo los 116 pb del 3' UTR y 211 pb de la región codificante), es capaz de identificar clones conteniendo cualquiera de ambas isoformas (**figura 4.4**).

En las células germinales, un importante número de ARNm difieren en tamaño y estructura respecto a transcritos de los mismos genes en células somáticas. Estas variantes se pueden producir a través de la utilización de sitios alternativos de inicio de la transcripción, sitios alternativos de procesamiento ("splicing") y sitios alternativos de poliadenilación, y generan lo que se conoce como transcritos alterados de células espermatogénicas (Kleene, 2001).

En particular la presencia de transcritos con regiones 3'UTR más cortas ya ha sido descrita previamente en el testículo, pudiendo estas variaciones tener efectos sobre la eficiencia de traducción de los transcritos (Yu *et al.*, 2006). En el testículo se expresa una subunidad alternativa del complejo de poliadenilación, que permite el reconocimiento de señales de poliadenilación "degeneradas" (Wallace *et al.*, 1999). De hecho, estudios *in silico* permitieron localizar un posible sitio alternativo de poliadenilación, secuencia "TATACA" (Edwalds-Gilbert *et al.*, 1997) entre las posiciones 1053 y 1059 a partir del codón ATG del ARNm de *Mtch2*. Aunque lo descrito en la literatura indica que usualmente los sitios alternativos de poliadenilación se ubican corriente abajo de los sitios canónicos, existen algunos casos en que ocurre lo opuesto (Kleene 2001). Por otra parte, en la rata durante la pubertad la FSH modula la utilización de sitios de poliadenilación alternativos, llevando a variaciones en la estabilidad de ciertos transcritos (Foulkes *et al.*, 1993). Quizás el aumento de las cantidades de transcripto de *Mtch2* en el testículo (y en particular en los espermatozoides) esté relacionado con esta utilización de sitios alternativos de poliadenilación modulada a nivel endócrino por la hormona FSH.

La poliadenilación alternativa ha surgido como un mecanismo utilizado para el control de la expresión génica, donde variaciones en el largo de la región 3'UTR afectan la disponibilidad de sitios de unión para proteínas de unión al ARN y micro ARNs, influenciando el destino final de los ARNm (revisado por Di Giammartino *et al.*, 2011). Una posibilidad que surge de los resultados aquí discutidos es que la variante transcripcional testicular (¿paquiténica?), al presentar un 3' UTR más corto pueda carecer de ciertas secuencias blanco para la unión de proteínas reguladoras, para la unión de micro ARNs, o carecer de posibles estructuras secundarias que puedan tener efectos ulteriores. Análisis

bioinformáticos utilizando el programa RegRNA (Huang *et al.*, 2006) no mostraron la presencia de estructuras secundarias ni secuencias consenso en la región 3' UTR de la forma canónica que pudieran por ejemplo tener algún efecto represor, y que pudiera ser de interés eliminar para la expresión diferencial de un transcripto durante la espermatogénesis. Tal vez secuencias de este tipo no se encuentren presentes en el 3' UTR de *Mtch2*, o quizá éste contenga algún tipo de motivo aún no descrito e incorporado a las bases de datos.

La variante transcripcional de testículo aquí descrita no presenta diferencias a nivel codificante, indicándonos que no existe ningún motivo para que se genere un sesgo en la inmunolocalización de la proteína *Mtch2* traducida a partir de ambas isoformas de ARNm.

5.2 Perfil de expresión del gen *Mtch2* y su producto proteico en el testículo

Si bien estudios de RT-PCR semicuantitativa realizados en nuestro laboratorio mostraron que *Mtch2* se expresaba diferencialmente en el testículo respecto a otros tejidos analizados de la rata, la bibliografía disponible al inicio de este trabajo indicaba que *Mtch2* se expresaba en una variedad de tejidos como cerebro, hígado, pulmón, riñón, páncreas, bazo y tejido adiposo, además del testículo (Yerushalmi *et al.*, 2002; Zaltsman *et al.*, 2010). Dicha información fue comprobada por nosotros a través de RT-PCR a alto número de ciclos, donde el ARNm de *Mtch2* fue detectado en todos los tejidos analizados. Podemos concluir por lo tanto que aunque *Mtch2* no se expresa exclusivamente en el testículo (Schultz *et al.*, 2003, estiman que sólo un 4% del genoma es exclusivo de este tejido), su expresión es diferencial, ya que en dicho tejido el transcripto se encuentra a muy elevados niveles en comparación con los demás tejidos.

La expresión diferencial de genes en el testículo es un fenómeno ampliamente registrado en la bibliografía (Pang *et al.*, 2006; Johnston *et al.*, 2008 y Geisinger 2008), y muchos ARNm se expresan a altísimos niveles en células germinales respecto a células somáticas (Kleene, 2001). Ciertos autores sostienen que la sobreexpresión se debe a una traducción ineficiente, y que con esta estrategia se contrarrestan los efectos de dicha baja eficiencia traduccional (Mathews *et al.*, 1996). Es más, muchos ARNm que en la línea germinal se expresan a elevados niveles, sin embargo nunca llegan a traducirse. Por este motivo, resultaba importante para nosotros poder responder a la interrogante de si el ARNm de *Mtch2* era traducido en el testículo.

Experimentos de Western blot e inmunohistoquímica nos permitieron demostrar, por primera vez, la existencia de la proteína Mtch2 en el testículo. A su vez, dichas técnicas pusieron en evidencia que la proteína Mtch2 se expresa diferencialmente en el testículo respecto a otros tejidos, indicando que la diferencia cuantitativa observada inicialmente a nivel transcripcional se mantiene en el perfil de expresión proteico. Es de remarcar el hecho de que en el testículo Mtch2 pudo ser identificada a partir de lisados totales. De acuerdo a la bibliografía disponible a partir de los experimentos realizados en otros tejidos, al día de hoy sólo se lograba su detección a partir de fracciones subcelulares enriquecidas en mitocondrias (Grinberg *et al.*, 2005; Zaltsman *et al.*, 2010). La posibilidad de purificar Mtch2 a partir de testículo permitirá la obtención de mayores cantidades de proteína, y trabajar con tejido entero en lugar de purificar la fracción mitocondrial, todo lo cual sin duda hará posible la realización de ensayos con dicha proteína con mayor facilidad.

Mediante estudios de inmunohistoquímica se determinó que Mtch2 en el testículo es una proteína de localización citoplásmica, y que puede ser detectada en mayor o menor medida en todos los tipos celulares presentes a nivel del túbulo seminífero en el testículo adulto. Ensayos de colocalización con una sonda específica para mitocondria, permitieron comprobar que en el testículo la proteína se localiza a nivel de este organelo, en coherencia con los resultados publicados para hepatocitos por otros autores (Yerushalmi *et al.*, 2002; Grinberg *et al.*, 2005 y Zaltsman *et al.*, 2010). Este resultado no es menor, pues como ya se mencionó en la Introducción, existen proteínas que difieren en cuanto a su localización subcelular en células germinales respecto a las células somáticas (Ursini *et al.*, 1999).

Cuando estudiamos el perfil de expresión de Mtch2 en el testículo a través de distintas edades, observamos que la proteína se expresa a niveles superiores en el testículo adulto (40 y 60 dpp) en comparación con etapas previas del desarrollo. Mayores tiempos de exposición permitieron detectarla en testículos de menores edades (21 y 13 dpp), mientras que no logramos detectarla a los 7 dpp. Esto nos sugiere que la proteína comienza a expresarse en una edad cercana a los 13 dpp. Según Malkov *et al.* (1998) es durante esta etapa que comienza la meiosis, dada por la aparición de espermatoцитos leptoténicos. Estos resultados estarían de acuerdo con los previamente obtenidos a nivel de ARNm, ya que se habían encontrado diferencias cuantitativas en los niveles de expresión de *Mtch2* entre testículo adulto y de neonatos de 1 dpp.

Por otra parte, la inmunodetección de Mtch2 en suspensiones celulares de testículo mediante citometría de flujo indicó diferencias estadísticamente significativas entre los niveles de fluorescencia presentes en la población con contenido de ADN 4C (espermatoцитos primarios) y la población C (células posmeióticas). Esto representa una reafirmación de los resultados obtenidos por *mRNA differential display* y RT-PCR semicuantitativo, que mostraban mayor expresión en los espermatoцитos que en las espermátidas. A su vez, los mayores niveles de expresión en la población 4C en comparación con la 2C (compuesta fundamentalmente por células somáticas testiculares y espermatogonias), son coherentes con el hecho de que no se haya logrado detectar la proteína a los 7 dpp, edad en la cual no existen aun espermatoцитos. Basado en las diferencias cuantitativas detectadas, el perfil de expresión génica y proteica para Mtch2 se ajusta a lo descrito por Sassone-Corsi en 2002, donde a nivel del testículo adulto existen tres conjuntos de genes, uno expresado preferentemente en las células premeióticas, otro en los espermatoцитos paquiténicos (donde incluiríamos a *Mtch2*), seguido de un tercer conjunto de genes de transcripción posmeiótica, expresado en espermátidas redondas.

También se detectaron variaciones en los perfiles de inmunomarcación de Mtch2 entre secciones de distintos túbulos seminíferos. Esto tiene sentido, ya que diferentes túbulos pueden presentar diferente composición celular. Ello nos indujo a evaluar la posible existencia de diferencias en el patrón de expresión de Mtch2 a través de distintas asociaciones celulares del epitelio seminífero, añadiendo por lo tanto un nuevo nivel de complejidad al patrón de expresión de Mtch2 en el testículo. De hecho, en la literatura se encuentran varios ejemplos de genes cuyo perfil de expresión difiere entre distintos estadios del epitelio seminífero (Zhu *et al.*, 1994; Penttila *et al.*, 1995; Wine & Chapin 1999; Sreepoorna *et al.*, 2009). Con respecto a Mtch2, en todos los estadios se detectó la proteína, pero se observó que la misma se expresa de manera diferencial en estadios más tardíos del ciclo del epitelio seminífero (X-XIII) en relación a los estadios más tempranos aquí descritos (II-V).

Si analizamos los eventos celulares y moleculares que ocurren en los estadios con altos niveles de expresión de Mtch2, destacamos que en los estadios X-XI corresponden a las etapas finales de la apertura de la barrera hematotesticular, que comienza durante el estadio VIII concomitantemente con el evento de espermiación (Mruck *et al.*, 2008). Durante la apertura de esta barrera se desensamblan las uniones especializadas entre células de

Sertoli, y los espermatocitos leptoténicos migran hacia la porción adluminal del túbulo seminífero (Siu & Cheng, 2004). Además, en los estadios XII-XIII tienen lugar las últimas fases de la profase meiótica (Russell *et al.*, 1990). Por otra parte, los mayores niveles de expresión de *Mtch2* coincidirían con aquellos estadios del epitelio seminífero en que se observan dos capas de espermatocitos en lugar de una (**figura 1.6**), lo cual es lógico si tenemos en cuenta que éstas son las células que más expresan la proteína.

Se ha reportado que en los estadios IX-XIV-I ocurre la expresión diferencial de receptores para FSH en células de Sertoli (Yan *et al.*, 1999). A su vez, sabemos que la FSH induce la síntesis por parte de las células de Sertoli de SCF (*stem cell factor*), factor parácrino que provoca un aumento de la expresión de algunos genes en células germinales (Yan *et al.*, 2000 y 2003; Furuchi *et al.*, 1996). Considerando que la expresión estadio-específica es una característica fundamental de las células espermatogénicas (Johnston *et al.*, 2008), y que *Mtch2* se expresa diferencialmente en los estadios X-XIII, una hipótesis atractiva sería que la expresión de *Mtch2* podría ser influenciada en algún grado por la FSH. Para testar esta hipótesis se debería estudiar la expresión de *Mtch2* bajo condiciones de privación de FSH.

5.3 *Mtch2* y la MCP

Zaltsman *et al.* (2010) indican que en el hígado de ratones *Mtch2*^{-/-} se detectó menor sensibilidad a estímulos apoptóticos, ubicando a esta proteína como un orquestador importante en el programa de MCP. Por su parte, la MCP representa un evento vital en el correcto desarrollo de la línea germinal. El testículo ha sido descrito como uno de los tejidos con mayores niveles de MCP espontánea; se ha estimado que hasta un 75% del rendimiento del epitelio seminífero se pierde por apoptosis (Huckins, 1978; Shaha *et al.*, 2010).

Bajo condiciones normales del desarrollo, es posible relacionar el patrón de expresión de *Mtch2* (alto en espermatocitos y en asociaciones celulares IX-XIII durante la adultez) con los elevados niveles de MCP espontánea a nivel de espermatocitos (asociaciones IX-XIV) en la espermatogénesis de la rata adulta existen elevados niveles de MCP espontánea a nivel de espermatocitos en las asociaciones IX –XIV (Ruwanpura *et al.*, 2007). Es decir, que *Mtch2* se detecta en mayor medida y por lo tanto se expresaría más, en aquellos estadios que comúnmente se ven afectados por la MCP durante el desarrollo normal de la gametogénesis masculina.

Por otra parte, hemos mencionado más arriba que existen en la literatura varios ejemplos de genes cuyo perfil de expresión difiere entre distintos estadios del epitelio seminífero. En muchos casos, se trata de moléculas involucradas en la regulación de la MCP, cuyos perfiles de expresión son dinámicos y varían dependiendo de las asociaciones celulares del epitelio seminífero. El hecho de que Mtch2 presente un perfil de expresión diferenciado con variaciones de este tipo recuerda al perfil de expresión de varias proteínas apoptóticas.

Finalmente, más allá de las diferencias observadas entre distintos tejidos, edades, asociaciones de células germinales y tipos celulares, en algunas células en particular Mtch2 presentó un patrón de expresión peculiar, con alta intensidad de señal y una localización no sólo citoplásmica sino también perinuclear y ocasionalmente nuclear. La mayor abundancia relativa de células presentando esta peculiar inmunomarcación fue en testículos de 18-21 dpp, observándose este fenómeno también a nivel del testículo adulto. Según la literatura, entre los 16 y 25 dpp en el testículo de la rata se puede apreciar un pico de apoptosis relacionado con ajustes en el número de células germinales que una célula de Sertoli puede sustentar adecuadamente (Jeyaraj *et al.*, 2003). En ese sentido, pudimos constatar la existencia de ese pico a través de la detección de elevados niveles de caspasa 3 activa a esta edad. Curiosamente, una buena proporción de estas células inmunomarcadas diferencialmente con el anticuerpo anti-Mtch2, a su vez presentó morfología nuclear alterada, sugiriendo que se trataba de células cuya integridad se encontraba comprometida. Es más, si esto fuera cierto, no podríamos descartar que aquellas células que no presentaban alteraciones evidentes en la morfología nuclear correspondieran, por ejemplo, a células en etapas iniciales de MCP.

A raíz de todo lo expuesto, se intentó averiguar si podía existir una relación entre el patrón de expresión de Mtch2 y la MCP en el testículo adulto de la rata, para lo cual el patrón particular de inmunodetección se procuró relacionar con la ocurrencia de MCP a través de colocalización con el marcador de MCP TUNEL.

En cuanto a la técnica de TUNEL, se detectaron en el testículo adulto varias células marcadas por TUNEL, indicando fragmentación del ADN, proceso clave en el desmantelamiento celular que ocurre durante la MCP (Kerr *et al.*, 1972). Nuestros resultados demostraron congruencia con lo previamente descrito para dicho órgano (Kerr, 1992; Huckins, 1978; Shaha *et al.*, 2010 y otros autores). Con respecto a la colocalización de Mtch2

con TUNEL, la proteína presentó una señal más intensa en células TUNEL-positivas respecto a sus vecinas TUNEL-negativas. Aunque también se detectó en otros tipos celulares, este fenómeno se observó principalmente en células que, tanto por sus características nucleares en la tinción con DAPI y ubicación en los cortes transversales de túbulos seminíferos, probablemente corresponden a espermatoцитos. Interpretamos estas variaciones en cuanto a distribución y niveles de expresión de Mtch2 como probables indicios de una participación de la proteína en los eventos moleculares, de señalización o ejecución, que ocurren durante el desensamblaje de células apoptóticas en la línea germinal.

Un factor que podría explicar el patrón de inmunolocalización peculiar de Mtch2 observado en células destinadas a morir, es que durante el desmantelamiento que sufren las células en la apoptosis la integridad de la envoltura nuclear se pierde, lo que facilitaría el ingreso del antígeno al núcleo. Otro factor que podría eventualmente afectar la distribución de Mtch2 en células apoptóticas es el hecho de que durante la apoptosis las mitocondrias se fisionan y adquieren una localización perinuclear en “clusters” (De Vos *et al.*, 1998; Sheridan *et al.*, 2008); en consecuencia, el patrón de localización de Mtch2 en células TUNEL-positivas podría ser un efecto colateral de la distribución mitocondrial particular que ocurre durante la MCP.

Con el fin de profundizar en el establecimiento de una relación entre la expresión de Mtch2 y la MCP, se decidió estudiar la expresión de Mtch2 a nivel de la línea germinal bajo condiciones de inducción de la MCP. A tales efectos, se realizó exposición escrotal a hipertermia moderada, tratamiento que aumenta la MCP en el túbulo seminífero. Una de las particularidades de este tratamiento, y a su vez uno de sus principales atractivos para nosotros, es que está descrito que este tratamiento afecta principalmente a espermatoцитos en túbulos que se encuentran en los estadios XII-XIV (Lue *et al.*, 1999; Sinha Hikim *et al.*, 2003), el tipo celular y los estadios donde nosotros detectamos mayores niveles de Mtch2.

La exposición escrotal a hipertermia moderada desembocó en un aumento en la detección de marcadores apoptóticos respecto a los grupos control. En el grupo tratado se detectaron mayores niveles de clivaje de caspasa 3, indicando que la caspasa efectora por excelencia se encuentra activada, un indicio importante de la activación de la MCP. Además, entre las 3 y 6 horas postratamiento se detectó un notorio incremento en el número de células TUNEL-positivas. Como se describió en Resultados, se encontró que, en concordancia con los resultados previamente publicados (Sinha Hikim *et al.*, 2003), la apoptosis afectó

principalmente a espermátidas tempranas en túbulos en estadios I-IV, y espermatoцитos de túbulos en estadios más tardíos, XII-XIV.

Al analizar el patrón de expresión de Mtch2, observamos que los niveles detectados de la proteína a las 6 horas postratamiento son mayores en relación a tiempos previos, y en relación al grupo control. Esto nos indica que los niveles de Mtch2 aumentan en algún momento entre las 3 y 6 horas postratamiento, demostrando que el aumento en la expresión de Mtch2 coincide temporalmente con el aumento de MCP inducida. Nuevamente, este resultado vincula, de algún modo, a Mtch2 con la MCP.

5.4 Mtch2: ¿qué función cumple en la línea germinal?

Tras haber disecado distintos aspectos de la expresión de Mtch2 en el testículo, nos proponemos integrar dicha información para buscar algunas explicaciones plausibles al perfil diferencial y peculiar de expresión de Mtch2 en dicho órgano, y en relación con la espermatogénesis.

Bajo condiciones normales, el patrón diferencial de expresión de Mtch2 en espermatoцитos tal vez refleje de alguna manera una susceptibilidad incrementada de los mismos a gatillar los mecanismos de MCP. Como han descrito previamente Zaltsman *et al.* (2010), en el hígado Mtch2 provee a la célula de un marco proteico que efectiviza la permeabilización de la MME y los eventos que esto conlleva. Es posible que las células meióticas, al presentar niveles elevados de Mtch2, permitan con mayor facilidad la ocurrencia de las interacciones necesarias para provocar la permeabilización de la MME. En consecuencia, los espermatoцитos presentarían una mayor predisposición a desencadenar los eventos moleculares que ocurren durante la apoptosis. De hecho y en apoyo a esta hipótesis, los espermatoцитos son uno de los tipos celulares que más sufre apoptosis, tanto durante la primera onda espermatogénica como en el testículo adulto (Jahnukainen *et al.*, 2004; Ruwanpura *et al.*, 2007).

Ahora, ¿cómo se explica el hecho de que en células apoptóticas Mtch2 presente mayores niveles de expresión respecto a sus vecinas no alteradas? No hay evidencias que señalen a Mtch2 como una molécula ejecutora dentro de las vías de MCP. Es más, como resultado de los experimentos de exposición a hipertermia, podemos decir que la inducción de Mtch2 en el testículo no ocurre antes de la activación de caspasa 3: mientras a los 30 minutos de tratamiento ya se observa un aumento en la cantidad de caspasa activada (**figura**

4.19), el incremento en los niveles de Mtch2 recién se hace evidente entre las 3 y 6 horas. Los picos de acumulación de ambas proteínas durante el desarrollo posnatal del testículo tampoco son coincidentes, ya que en tanto se detectan mayores niveles de caspasa 3 activada a los 21 dpp (paralelo a un importante pico de apoptosis en la primera onda), los mayores niveles globales de Mtch2 a nivel de los túbulos se manifiestan en el adulto (y aún más en adultos de 60 dpp que en adultos jóvenes). A su vez y según los resultados aquí descritos, la inducción de la expresión testicular de Mtch2 tampoco sería previa temporalmente a la fragmentación que sufre el ADN nuclear (Mtch2 colocaliza con células TUNEL-positivas, es decir, células con ADN fragmentado). Es más, según lo detectado en los ensayos de hipertermia, los elevados niveles de expresión de Mtch2 se aprecian en túbulos repletos de células que se encuentran en las últimas etapas de dismantelamiento, células que bajo ningún concepto podrán generar espermatozoides.

La explicación de la presencia de elevados niveles de Mtch2 en células que experimentan apoptosis permanece como incógnita. ¿Acaso ocurre una inducción en la expresión de Mtch2 en estas células? Muchos actores moleculares involucrados en la MCP no requieren de una inducción de su expresión para actuar, sino que varían entre distintos estados de activación. Por ejemplo, las caspasas se activan proteolíticamente (e.g. Green, 1998), en tanto algunas proteínas de la familia BCL-2 cambian su estado de fosforilación (Zha *et al.*, 1996), o sufren variaciones alostéricas que afectan su actividad (Gross *et al.*, 1998). Por lo visto no es necesario ni obligatorio un aumento en la expresión proteica para que estas proteínas puedan ejercer sus propiedades pro-apoptóticas. Es más, en modelos *in-vitro*, la inducción de la expresión de *Mtch2* no aumenta la apoptosis, sino que causa una detención en el crecimiento celular, generando en cambio el arresto del ciclo celular en fase S (Leibowitz-Amit *et al.*, 2006).

En definitiva, la función de Mtch2 se relacionaría de algún modo con la MCP en el testículo pero, ¿cómo? Aún no lo sabemos, aunque una faceta de Mtch2 que no debe ser descartada es la posible relación con el metabolismo mitocondrial y sus modificaciones dinámicas durante los eventos celulares que caracterizan a la apoptosis. Para ello también debemos incorporar a la escena nuevos niveles de complejidad, en los cuales el rol de las proteínas de la familia BCL-2 se extiende a nuevos planos. La bibliografía más actualizada establece nexos entre miembros de la familia BCL-2 con el control de la morfología mitocondrial, en particular con los eventos moleculares que ocurren durante los procesos de

fusión y fisión de mitocondrias (Sheridan & Martin, 2010; Martinou & Youle, 2011; Otera & Mihara, 2012). Se descubrieron *foci* discretos a nivel de sitios de fisión mitocondrial, en los que se detectó la presencia de las proteínas Bak y Bax (Martinou & Youle, 2011). La fisión y fusión de mitocondrias representan eventos clave, tanto a nivel del metabolismo mitocondrial como de los eventos que ocurren durante la MCP. Es sabido que durante la apoptosis las mitocondrias pasan de presentarse en disposición filamentosa a una disposición fragmentada en partículas puntuadas (Frank *et al.*, 2001), y que la inhibición de la fisión mitocondrial provoca un retardo en la liberación de citocromo C afectando la ejecución de la apoptosis (Cipolat *et al.*, 2006).

La información y los resultados disponibles hasta ahora nos obligan a evaluar un posible involucramiento de Mtch2 en procesos relacionados con la dinámica mitocondrial. Esto puede hallar sustento en resultados obtenidos por otros autores, que hallaron un vínculo entre un polimorfismo de *Mtch2* y personas con elevados índices de masa corporal (Willer, *et al.*, 2009), una característica directamente relacionada con aspectos del metabolismo mitocondrial. Además, se detectó la expresión del gen y la proteína en tejido adiposo blanco y adipocitos con un aumento sustancial de la proteína Mtch2 en mujeres obesas (Kulyté *et al.*, 2011). Esto nos indica que no podemos perder de vista los aspectos metabólicos celulares, en los cuales la mitocondria juega un rol preponderante. De hecho, hoy sabemos que tanto las vías de señalización metabólica como las apoptóticas se encuentran inexorablemente interconectadas. Andresen & Kornbluh (2013) exponen de manera excelente el entramado de interacciones que se dan entre el metabolismo energético celular y la apoptosis, y cómo proteínas pertenecientes a la familia BCL-2 se involucran en dicho entramado. Quizás podamos añadir a Mtch2 a esta escena, y encontrarlo como un orquestador fundamental en estos procesos de vital importancia para la fisiología celular, la homeostasis tisular y el metabolismo de los seres vivos.

Con la información disponible hasta ahora no nos es posible aún encontrar una explicación simple a los altos niveles de expresión de Mtch2 en células apoptóticas. Sin embargo, los elevados niveles de esta proteína en el testículo así como su incremento concomitantemente con la MCP nos permiten sospechar que su función ha de ser importante durante la espermatogénesis, y particularmente durante la meiosis, dada la mayor presencia de Mtch2 en los espermatoцитos. Los resultados aquí presentados sin duda

contribuirán a facilitar los estudios tendientes a elucidar la función de esta proteína, favoreciendo el uso del testículo como órgano modelo.

Lógicamente, el incremento del conocimiento molecular acerca de los factores que operan en el desarrollo de las células germinales, así como de los procesos que tienen lugar durante el mismo (proliferación, diferenciación, apoptosis) es un paso importante para el desarrollo de terapias contra la infertilidad y otras patologías como el cáncer testicular, así como para el desarrollo de métodos de contracepción masculina (Shaha *et al.*, 2010). Mientras tanto, no debemos olvidar que la espermatogénesis es un proceso tremendamente complejo, donde diferenciación celular y apoptosis son dos caras de la misma moneda.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

A lo largo de la presente tesis se logró estudiar el perfil de expresión del gen *Mtch2* y su producto proteico durante la espermatogénesis de la rata. Encontramos que:

- *Mtch2* se expresa diferencialmente en el testículo respecto a otros tejidos.
- La localización de *Mtch2* en el testículo es mitocondrial, al igual que en los hepatocitos.
- Sus niveles de expresión testicular van en aumento desde el nacimiento hasta la madurez sexual, donde alcanza sus niveles máximos.
- En el testículo adulto la expresión de *Mtch2* varía entre distintas asociaciones de células germinales, detectándose mayores niveles de expresión en estadios más tardíos del ciclo del epitelio seminífero (estadios IX-XIV), coincidentemente con los estadios en que se detectan mayores niveles de MCP.
- A nivel celular detectamos mayores cantidades de *Mtch2* en células en profase meiótica (espermatoцитos) que en otros tipos celulares dentro de los túbulos seminíferos.
- A diferencia de lo ocurrido con otros transcritos diferenciales de la línea germinal, los niveles de expresión de la proteína *Mtch2* se corresponden con los niveles de transcritos, tanto a nivel tisular (existe más ARNm en el testículo que en otros tejidos), como de tipo celular dentro del testículo (el transcritos se detecta a mayores niveles en los espermatoцитos).
- En los espermatoцитos *Mtch2* expresa dos variantes, la canónica y una isoforma con una región 3'UTR más corta, lo que podría tener implicancias a nivel de la regulación postranscripcional del gen. No se analizó la eventual existencia de dicha isoforma también en otros tipos celulares del testículo.
- En células destinadas a morir por MCP (TUNEL-positivas) a nivel del testículo en condiciones normales, *Mtch2* presenta niveles de expresión superiores y una distribución que además de citoplasmática en algunos casos llegaba a ser peri-nuclear o nuclear y respecto a sus congéneres no afectadas.
- Una buena proporción de las células TUNEL-positivas que simultáneamente presentan inmunomarcación diferencial para *Mtch2* serían espermatoцитos I, a juzgar por su morfología

nuclear y ubicación en los cortes de túbulos seminíferos. Próximamente haremos co-localización de estos marcadores con un anticuerpo anti-Sycp3 (que reconoce el principal componente del elemento lateral de los complejos sinaptonémicos), de modo de confirmar definitivamente que se trata del tipo celular mencionado.

- Por otra parte, bajo condiciones de inducción de la MCP por hipertermia moderada, los niveles de Mtch2 en los túbulos seminíferos se incrementan coincidentemente con el aumento de MCP. Descubrimos que esta alteración del patrón de expresión de Mtch2 ocurre temporalmente después de la activación de la caspasa-3, y aparece concomitantemente con la fragmentación del ADN.

Para esclarecer el porqué de los altos niveles de expresión en el testículo adulto, se deberá develar qué aspectos regulatorios subyacen a su patrón de expresión. El rol que juegan las señales parácrinas y el sistema endócrino son algunas de las pistas que deberemos seguir para descubrir los mecanismos subyacentes al perfil de expresión observado.

Sabemos que el ratón KO para *Mtch2* es inviable ya que el feto detiene su desarrollo unos pocos días después de su concepción, por lo que se requerirá la generación de KO condicionales para testículo para diseccionar la función de Mtch2 durante el desarrollo de la línea germinal. El estudio del fenotipo a nivel de la línea germinal de individuos *Mtch2*^{-/-} seguramente contribuirá a identificar en qué etapa del desarrollo y mecanismos moleculares su función es clave.

Para develar los aspectos funcionales de Mtch2 en células sanas y células destinadas a morir es necesario conocer el crisol de interacciones proteicas que Mtch2 es capaz de llevar a cabo. La dificultad para encontrar modelos *in vitro* que recreen las condiciones presentes en el túbulo seminífero hacen de esto una tarea dificultosa, pero no imposible. El estudio del metabolismo mitocondrial y los mecanismos de MCP que rigen la homeostasis testicular serán claves para comprender la función de Mtch2 en el testículo. Hoy día sabemos que Mtch2 interactúa con la proteína tBid (Katz *et al* 2012), y se han propuesto modelos triméricos en los que también se involucra a Bax (Grinberg *et al* 2005); sin embargo, los resultados de otros autores (Leibowitz-Amit *et al.*, 2006; Kulyté *et al.*, 2011) nos advierten de que quizás la escena sea mucho más amplia de lo que pensamos.

Sin dudas es el momento de integrar toda la información disponible con el ánimo de comenzar a revelar a Mth2 como un nuevo actor involucrado en los eventos moleculares que interconectan el metabolismo mitocondrial con la MCP.

BIBLIOGRAFÍA

- Abraham M.C., Shaham S., Death without caspases, caspases without death. *Trends Cell Biol.* 2004; 14(4):184-193.
- Acehan D., Jiang X., Morgan D.G., Heuser J.E., Wang X., Akey C.W., Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. *Mol Cell.* 2002; 9(2):423-432.
- Adams J.M., Cory S., The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science.* 1998; 281(5381):1322-1326.
- Alfonso P.J., Kistler W.S., Immunohistochemical localization of spermatid nuclear transition protein 2 in the testes of rats and mice. *Biol Reprod.* 1993; 48(3):522-529.
- Allan D.J., Harmon B.V., Kerr J.F.R., Cell death in spermatogenesis. En: *Perspectives on Mammalian Cell Death, 1987* (pp. 229-258). Potten CS (ed.), London: Oxford University Press.
- Allden W.G., Undernutrition of the Merino sheep and its sequelae during early post-natal life on reproduction and growth in later life. *Aust J Agric Res.* 1979; 30(5):939-948.
- Andersen J.L., Kornbluth S., The Tangled Circuitry of Metabolism and Apoptosis *Mol Cell.* 2013; 49(3):399-410.
- Andrabi S.A., Dawson T.M., Dawson V.L., Mitochondrial and nuclear cross talk in cell death: parthanatos. *Ann N Y Acad Sci.* 2008; 11(47):233-241.
- Antonsson B., Montessuit S., Lauper S., Eskes R., Martinou J.C., Bax oligomerization is required for channel-forming activity in liposomes and to trigger cytochrome c release from mitochondria. *Biochem J.* 2000; 345(2):271-278.
- Aponte P.M., van Bragt M.P., de Rooij D.G., van Pelt A.M., Spermatogonial stem cells: characteristics and experimental possibilities. *APMIS.* 2005; 113(11-12):727-742.
- Arama E., Steller H., Agapite J., Caspase activity and a specific cytochrome c are required for sperm differentiation in *Drosophila*. *Dev Cell.* 2003; 4(5):687-697.
- Arco A.D., Satrústegui J., New mitochondrial carriers: an overview. *Cell Mol Life Sci.* 2005; 62(19-20):2204-2227.
- Baehrecke E.H., Autophagy: dual roles in life and death? *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005; 6(6):505-510.
- Barth A.D., Oko J., Abnormal Morphology of Bovine Spermatozoa. En: *Ames, 1989* (pp. 145-151). Galloway D. (ed.), Iowa: Iowa State University Press.
- Baum J.S., St George J.P., McCall K., Programmed cell death in the germline. *Semin Cell Dev Biol.* 2005; 16(2):245-259.
- Bellgrau D., Gold D., Selawry H., Moore J., Franzusoff A., Duke R.C., A role for CD95 ligand in preventing graft rejection. *Nature.* 1995; 377(6550):630-632.
- Benavente R., Fraune J., Schramm S., Alsheimer M., The mammalian synaptonemal complex: Protein components, assembly and role in meiotic recombination. *Exp Cell Res.* 2012; 318(12):1340-1346.
- Berry D., Molecular Animation of Cell Death Mediated by the Fas Pathway, *Sci. STKE.* 2007; (380):p. tr1.
- Billig H., Furuta I., Rivier C., Tapanainen J., Parvinen M., Hsueh A.J., Apoptosis in testis germ cells: developmental changes in gonadotropin dependence and localization to selective tubule stages. *Endocrinology.* 1995; 136(1):5-12.
- Blanc-Layrac G., Bringuier A.F., Guillot R., Feldmann G., Morphological and biochemical analysis of cell death in human ejaculated spermatozoa. *Cell Mol Biol.* 2000; 46(1):187-197.

- Blanco-Rodríguez J., Martínez-García C., Apoptosis precedes detachment of germ cells from the seminiferous epithelium after hormone suppression by short-term oestradiol treatment of rats. *Int J Androl.* 1998; 21(2):109-115.
- Blanco-Rodríguez J., Deoxyribonucleic acid replication and germ cell apoptosis during spermatogenesis in the rabbit. *J Androl.* 2002; 23(2):182-187.
- Blanco-Rodríguez J., Keep Cycling or die: the role of male germ apoptosis in spermatogenesis, <http://www.andrology.org/library/?Reviews> 2006.
- Boitani C., Geremia R., Rossi R., Monesi V., Electrophoretic pattern of polypeptide synthesis in spermatocytes and spermatids of the mouse. *Cell Differ.* 1980; 9(1):41-49.
- Braun R.E., Behringer R.R., Peschon J.J., Brinster R.L., Palmiter R.D., Genetically haploid spermatids are phenotypically diploid. *Nature.* 1989; 337(6205):373-376.
- Breckenridge D.G., Xue D., Regulation of mitochondrial membrane permeabilization by BCL-2 family proteins and caspases. *Curr Op Cell Biol.* 2004; 13(16):647-652.
- Bröker L.E., Kruyt F.A., Giaccone G., Cell death independent of caspases: a review. *Clin Cancer Res.* 2005; 11(9):3155-3162.
- Chacko A.D., Liberante F., Paul I., Longley D.B., Fennell D.A., Voltage dependent anion channel-1 regulates death receptor mediated apoptosis by enabling cleavage of caspase-8. *BMC Cancer.* 2010; 20(10):380-388.
- Chalmel F., Rolland A.D., Niederhauser-Wiederkehr C., Chung S.S., Demougin P., Gattiker A., Moore J., Patard J.J., Wolgemuth D.J., Jégou B., Priming M., The conserved transcriptome in human and rodent male gametogenesis. *PNAS.* 2007; 104(20):8346-8351.
- Cheng C.Y., Mruk D.D., Cell junction dynamics in the testis: Sertoli-germ cell interactions and male contraceptive development. *Physiol Rev.* 2002; 82(4):825-874.
- Cheng C.Y., Mruk D.D., Sertoli-Sertoli and Sertoli-germ cell interactions and their significance in germ cell movement in the seminiferous epithelium during spermatogenesis. *Endocr Rev.* 2004; 25(5):747-806.
- Cheng C.Y., Mruk D.D., The biology of spermatogenesis: the past, present and future. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2010; 365(1546):1459-63.
- Chipuk J.E., Moldoveanu T., Llambi F., Parsons M.J., Green D.R., The BCL-2 family reunion. *Mol Cell.* 2010; 37(3):299-310.
- Cipolat S., Rudka T., Hartmann D., Costa V., Serneels L., Craessaerts K., Metzger K., Frezza C., Annaert W., D'Adamo L., Derks C., Dejaegere T., Pellegrini L., D'Hooge R., Scorrano L., De Strooper B., Mitochondrial rhomboid PARL regulates cytochrome c release during apoptosis via OPA1-dependent cristae remodeling. *Cell.* 2006; 126(1):163-175.
- Clermont Y., Leblond C.P., Spermiogenesis of man, monkey, ram and other mammals as shown by the periodic acid-Schiff technique. *Am J Anat.* 1955; 96(2):229-253.
- Clermont Y., Perey B., Quantitative study of the cell population of the seminiferous tubules in immature rats. *Am J Anat.* 1957; 100(2):241-267.
- Cogliati S., Scorrano L., A BID on mitochondria with MTCH2. *Cell Res.* 2010; (20):863-865.
- Coultas L., Boulliet P., Loveland K.L., Meachem S., Perlman H., Adams J.M., Strasser A., Concomitant loss of proapoptotic BH3-only Bcl-2 antagonists Bik and Bim arrests spermatogenesis. *EMBO J.* 2005; 24(22):3963-3973.
- Cory S., Huang D.C., Adams J.M., The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene.* 2003; 22(53):8590-8607.
- Crow J.F., Advantages of sexual reproduction. *Dev Genet.* 1994; 15(3):205-213.

- Danial N.N., Korsmeyer S.J., Cell death: critical control points. *Cell*. 2004; 116(2):205-219.
- Dass B., Attaya E.N., Michelle Wallace A., MacDonald C.C., Overexpression of the CstF-64 and CPSF-160 polyadenylation protein messenger RNAs in mouse male germ cells. *Biol Reprod*. 2001; 64(6):1722-1729.
- Datta S.R., Katsov A., Hu L., Petros A., Fesik S.W., Yaffe M.B., Greenberg M.E., 14-3-3 proteins and survival kinases cooperate to inactivate BAD by BH3 domain phosphorylation. *Mol Cell*. 2000; 6(1):41-51.
- Davidoff M.S., Breucker H., Holstein A.F., Seidl K., Cellular architecture of the lamina propria of human seminiferous tubules. *Cell Tissue Res*. 1990; 262(2):253-261.
- De Iuliis G.N., Newey R.J., King B.V., Aitken R.J., Mobile phone radiation induces reactive oxygen species production and DNA damage in human spermatozoa in vitro. *PLoS One*. 2009; 4(7):e6446
- de Kretser D., Kerr J., The cytology of the testis. *En: The Physiology of Reproduction*, 1994 (pp. 837-932). Knobil E. (ed.), New York: Raven Press.
- de Rooij D.G., Griswold M.D., Questions about spermatogonia posed and answered since 2000. *J Androl*. 2012; 33(6):1085-1095.
- de Rooij D.G., Russell L.D., All you wanted to know about spermatogonia but were afraid to ask. *J Androl*. 2000; 21(6):776-798.
- De Vos K., Goossens V., Boone E., Vercammen D., Vancompernelle K., Vandenaabeele P., Haegeman G., Fiers W., Grooten J., The 55-kDa tumor necrosis factor receptor induces clustering of mitochondria through its membrane-proximal region. *J Biol Chem*. 1998; 273(16):9673-9680.
- Degterev A., Boyce M., Yuan J., A decade of caspases. *Oncogene*. 2003; 22(53):8543-8567.
- Di Giammartino D.C., Nishida K., Manley J.L., Mechanisms and consequences of alternative polyadenylation. *Mol Cell*. 2011; 43(6):853-866.
- Downs K.M., Harmann C., Developmental potency of the murine allantois. *Development*. 1997; 124(14):2769-2780.
- Dunkel L., Hirvonen V., Erkkilä K., Clinical aspects of male germ cell apoptosis during testis development and spermatogenesis. *Cell Death Differ*. 1997; 4(3):171-179.
- Eddy E.M., Male germ cell gene expression. *Recent Prog Horm Res*. 2002; (57):103-128.
- Edinger A.L., Thompson C.B., Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Curr Op Cell Biol*. 2004; 16(6):663-669.
- Edwards-Gilbert G., Veraldi K.L., Milcarek C., Alternative poly(A) site selection in complex transcription units: means to an end? *Nucleic Acids Res*. 1997; 25(13):2547-2561.
- Ekert P., Vaux D., Apoptosis and the immune system. *British Med Bull*., 1997; 53(3):591-603.
- Elliott D.J., Grellscheid S.N., Alternative RNA splicing regulation in the testis. *Reproduction*. 2006; 132(6):811-819.
- Fawcett D.W., The mammalian spermatozoon. *Dev Biol*. 1975; 44(2):394-436.
- Feig C., Peter M.E., How apoptosis got the immune system in shape. *Eur J Immunol*. 2007; 37(1):61-70.
- Foulkes N.S., Schlotter F., Pévet P., Sassone-Corsi P., Pituitary hormone FSH directs the CREM functional switch during spermatogenesis. *Nature*. 1993; 362(6417):264-7.
- Francavilla S., D'Abrizio P., Cordeschi G., Pelliccione F., Necozone S., Ulisse S., Properzi G., Francavilla F., Fas expression correlates with human germ cell degeneration in meiotic and post-meiotic arrest of spermatogenesis. *Mol Hum Reprod*. 2002; 8(3):213-220.
- Frank S., Gaume B., Bergmann-Leitner E.S., Leitner W.W., Robert E.G., Catez F., Smith C.L., Youle R.J., The role of dynamin-related protein 1, a mediator of mitochondrial fission, in apoptosis. *Dev Cell*. 2001; 1(4):515-525.

- Furuchi T., Masuko K., Nishimune Y., Obinata M., Matsui Y., Inhibition of testicular germ cell apoptosis and differentiation in mice misexpressing Bcl-2 in spermatogonia. *Development*. 1996; 122(6):1703-1709.
- Galluzzi L., Kroemer G., Necroptosis: a specialized pathway of programmed necrosis. *Cell*. 2008; 135(7):1161-1163.
- Gambacorta M., Sfondrini G., Statistical evaluation in cryptorchids: light and electron microscopic study. *En: Cryptorchidism* (pp. 85-90), 1979 Bierich I.R., Giarola A. (ed.) New York: Academic Press.
- Gavrieli Y., Sherman Y., Ben-Sasson S.A., Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *Cell Biol*. 1992; 119(3):493-501.
- 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(1):385-388.
- Geisinger A., Spermatogenesis in Mammals: a very peculiar cell differentiation process. *En: Cell Differentiation Research Developments*, 2008 (pp. 97-123). Ivanova LB. (ed.) New York: Nova.
- Stern L., Kleene K.C., Gold B., Hecht N.B., Gene expression during mammalian spermatogenesis. Changes in populations of mRNA during spermiogenesis. *Exp Cell Res*. 1983; 143(1):247-255.
- Golstein P., Kroemer G., Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends Biochem Sci*. 2007; 32(1):37-43.
- Green D.R., Apoptotic pathways: the roads to ruin. *Cell*. 1998; 94(6):695-698.
- Grinberg M., Schwarz M., Zaltsman Y., Eini T., Niv H., Pietrokovski S., Gross A., Mitochondrial carrier homolog 2 is a target of tBID in cells signaled to die by tumor necrosis factor alpha. *Mol Cell Biol*. 2005; 25(11):4579-4590.
- Gross A., Jockel J., Wei M.C., Korsmeyer S.J., Enforced dimerization of BAX results in its translocation, mitochondrial dysfunction and apoptosis. *EMBO J*. 1998; 17(14): 3878-3885.
- Gross A., Yin X.M., Wang K., Wei M.C., Jockel J., Milliman C., Erdjument-Bromage H., Tempst P., Korsmeyer S.J., Caspase-cleaved BID targets mitochondria and is required for cytochrome c release, while BCL-XL prevents this release but not tumor necrosis factor-R1/Fas death. *J Biol Chem*. 1999; 274(2):1156-1163.
- Gross A., Mitochondrial carrier homolog 2: a clue to cracking the BCL-2 family riddle? *J Bioenerg Biomembr*. 2005; 37(3):113-119.
- Gross A., M(a)TCH-ing up mitochondrial apoptosis. *Cell Cycle*. 2010; 9(15):2925-2926.
- Guicciardi M.E., Leist M., Gores G.J., Lysosomes in cell death. *Oncogene*. 2004; 23(16):2881-2890.
- Guraya S.S., The comparative cell biology of accessory somatic (or Sertoli) cells in the animal testis. *Int Rev Cytol*. 1995; 160:163-220.
- Gutti R.K., Tsai-Morris C.H., Dufau M.L., Gonadotropin-regulated testicular helicase (DDX25), an essential regulator of spermatogenesis, prevents testicular germ cell apoptosis. *J Biol Chem*. 2008; 283(25):17055-17064.
- Hammer ØH., David AT., Ryan PD., Past: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeo Electron* 2001; 4(1):4-9.
- Heckert L.L., Griswold M.D., Expression of follicle-stimulating hormone receptor mRNA in rat testes and Sertoli cells. *Mol Endocrinol*. 1991; 5(5):670-677.
- Hess R.A., de Franca R.L., Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium. *Adv Exp Med Biol*. 2008; 636:1-15.
- Hockenbery D.M., Zutter M., Hickey W., Nahm M., Korsmeyer S.J., BCL2 protein is topographically restricted in tissues characterized by apoptotic cell death. *PNAS*. 1991; 88(16):6961-6965.
- Homma-Takeda S., Kugenuma Y., Iwamuro T., Kumagai Y., Shimojo N., Impairment of spermatogenesis in rats by methylmercury: involvement of stage- and cell- specific germ cell apoptosis. *Toxicology*. 2001; 169(1):25-35.

- Huang H.Y., Chien C.H., Jen K.H., Huang H.D., RegRNA: an integrated web server for identifying regulatory RNA motifs and elements. *Nucleic Acids Res.* 2006; 34(Web Server issue):W429-34.
- Huckins C., The morphology and kinetics of spermatogonial degeneration in normal adult rats: an analysis using a simplified classification of the germinal epithelium. *Anat Rec.* 1978; 190(4):905-926.
- Iguchi N., Tobias J.W., Hecht N.B., Expression profiling reveals meiotic male germ cell mRNAs that are translationally up- and down-regulated. *PNAS.* 2006; 103(20):7712-7717.
- Jahnukainen K., Chrysis D., Hou M., Parvinen M., Eksborg S., Söder O., Increased apoptosis occurring during the first wave of spermatogenesis is stage-specific and primarily affects midpachytene spermatocytes in the rat testis. *Biol Reprod.* 2004; 70(2):290-296.
- Jégou B., Spermatids are regulators of Sertoli cell function. *Ann N Y Acad Sci.* 1991; (637):340-353.
- Jeyaraj D.A., Grossman G., Petrusz P., Dynamics of testicular germ cell apoptosis in normal mice and transgenic mice overexpressing rat androgen-binding protein. *Reprod Biol Endocrinol.* 2003; 66(1):877-885.
- Johnson L., Lebovitz R.M., Samson W.K., Germ cell degeneration in normal and microwave-irradiated rats: potential sperm production rates at different developmental steps in spermatogenesis. *Anat Rec.* 1984; 209(4):501-507.
- Johnson L., Varner D.D., Roberts M.E., Smith T.L., Keillor G.E., Scrutchfield W.L., Efficiency of spermatogenesis: a comparative approach. *Anim Reprod Sci.* 2000; (60-61):471-480.
- Johnston D.S., Wright W.W., Dicaneloro P., Wilson E., Kopf G.S., Jelinsky S.A., Stage-specific gene expression is a fundamental characteristic of rat spermatogenic cells and Sertoli cells. *PNAS.* 2008; 105(24):8315-8320.
- Juriscova A., Lopes S., Meriano J., Oppedisano L., Casper R.F., Varmuza S., DNA damage in round spermatids of mice with a targeted disruption of the Pp1c γ gene and in testicular biopsies of patients with non-obstructive azoospermia. *Mol Hum Reprod.* 1999; 5(4):323-330.
- Katz C., Zaltsman-Amir Y., Mostizky Y., Kollet N., Gross A., Friedler A., Molecular basis of the interaction between proapoptotic truncated BID (tBID) protein and mitochondrial carrier homologue 2 (MTCH2) protein: key players in mitochondrial death pathway. *J Biol Chem.* 2012; 287(18):15016-15023.
- Kerr J.B., Wyllie A.H., Currie A.R., Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* 1972; 26(4):2392-2357.
- Kerr J.B., de Kretser D.M., Proceedings: The role of the Sertoli cell in phagocytosis of the residual bodies of spermatids. *J Reprod Fertil.* 1974; 36(2):439-440.
- Kerr J.B., Spontaneous degeneration of germ cells in normal rat testis: assessment of cell types and frequency during the spermatogenic cycle. *J Reprod Fertil.* 1992; 95(3):825-830.
- Kierszenbaum A.L., Tres L.L., The acrosome-acroplaxome-manchette complex and the shaping of the spermatid head. *Arch Histol Cytol.* 2004; 67(4):271-284.
- Kimmins S., Sassone-Corsi P., Chromatin remodelling and epigenetic features of germ cells. *Nature.* 2005; 434(7033):583-589.
- Kleene K.C., Wang M.Y., Cutler M., Hall C., Shih D., Developmental expression of poly(A) binding protein mRNAs during spermatogenesis in the mouse. *Mol Reprod Dev.* 1994; 39(4):355-364.
- Kleene K.C., Mechanisms of Development, The Official Journal of the ISDB 2001; 106(1-2):3-23.
- Knudson C.M., Tung K.S., Tourtellotte W.G., Brown G.A., Korsmeyer S.J., Bax-deficient mice with lymphoid hyperplasia and male germ cell death. *Science.* 1995; 270(5233):96-99.
- Koji T., Hishikawa Y., Germ cell apoptosis and its molecular trigger in mouse testes. *Arch Histol Cytol.* 2003; 66(1):1-16.

- Krajewski S., Krajewska M., Shabaik A., Wang H.G., Irie S., Fong L., Reed J.C., Immunohistochemical analysis of in vivo patterns of Bcl-X expression. *Cancer Res.* 1994; 54(21):5501-5507.
- Kroemer G., El-Deiry W.S., Golstein P., Peter M.E., Vaux D., Vandenabeele P., Zhivotovsky B., Blagosklonny M.V., Malorni W., Knight R.A., Piacentini M., Nagata S., Melino G., Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Nomenclature Committee on Cell Death. Cell Death Differ.* 2005; 12 (2):1463-1467.
- Kroemer G., Galluzzi L., Brenner C., Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev.* 2007; 87(1):99-163.
- Kroemer G., Galluzzi L., Vandenabeele P., Abrams J., Alnemri E.S., Baehrecke E.H., Blagosklonny M.V., El-Deiry W.S., Golstein P., Green D.R., Hengartner M., Knight R.A., Kumar S., Lipton S.A., Malorni W., Nuñez G., Peter M.E., Tschopp J., Yuan J., Piacentini M., Zhivotovsky B., Melino G., Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Nomenclature Committee on Cell Death 2009., Cell Death Differ.* 2009; 16(1):3-11.
- Kulyté A., Rydén M., Mejhert N., Dungner E., Sjölin E., Arner P., Dahlman I., MTCH2 in human white adipose tissue and obesity. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011; 96(10):1661-1665.
- Kuwana T., Newmeyer D.D., Bcl-2-family proteins and the role of mitochondria in apoptosis. *Curr Opin Cell Biol.* 2003; 15(6):691-699.
- Laemmli U.K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970; 227(5259):680-685.
- Leibowitz-Amit R., Tsarfaty G., Abargil Y., Yerushalmi G.M., Horev J., Tsarfaty I., Mimp, a mitochondrial carrier homologue, inhibits Met-HGF/SF-induced scattering and tumorigenicity by altering Met-HGF/SF signaling pathways *Cancer Res.* 2006; 66(17):8687-8697.
- Lesch B.J., Page D.C., Genetics of germ cell development. *Nat Rev Genet.* 2012; 13(11):781-794.
- Li L.Y., Luo X., Wang X., Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature.* 2001; 412(6842):95-99.
- Lindsten T., Ross A.J., King A., Zong W.X., Rathmell J.C., Shiels H.A., Ulrich E., Waymire K.G., Mahar P., Frauwirth K., Chen Y., Wei M., Eng V.M., Adelman D.M., Simon M.C., Ma A., Golden J.A., Evan G., Korsmeyer S.J., MacGregor G.R., Thompson C.B., The combined functions of proapoptotic Bcl-2 family members bak and bax are essential for normal development of multiple tissues. *Mol Cell.* 2000; 6(6):1389-1399.
- Lue Y.H., Sinha Hikim A.P., Swerdloff R.S., Im P., Taing K.S., Bui T., Leung A., Wang C., Single exposure to heat induces stage-specific germ cell apoptosis in rats: role of intratesticular testosterone on stage specificity. *Endocrinology.* 1999; 140(4):1709-1717.
- Luo X., Budihardjo I., Zou H., Slaughter C., Wang X., Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell.* 1998; 94(4):481-490.
- Lutter M., Fang M., Luo X., Nishijima M., Xie X., Wang X., Cardiolipin provides specificity for targeting of tBid to mitochondria. *Nat Cell Biol.* 2000; 2(10):754-761.
- Malkov M., Fisher Y., Don J., Developmental schedule of the postnatal rat testis determined by flow cytometry. *Biol Reprod.* 1998; 59(1):84-92.
- Marathe C.K., Shetty J., Dighe R.R., Selective immunoneutralization of luteinizing hormone results in the apoptotic cell death of pachytene spermatocytes and spermatids in the rat testis. *Endocrine.* 1995; 3(10):705-709.
- Martinou J.C., Youle R.J., Mitochondria in apoptosis: Bcl-2 family members and mitochondrial dynamics. *Dev Cell.* 2011; 21(1):92-101.

- Martinvalet D., Zhu P., Lieberman J., Granzyme A induces caspase-independent mitochondrial damage, a required first step for apoptosis. *Immunity*. 2005 ; 22(3):355-370.
- Marzo I., Brenner C., Zamzami N., Jürgensmeier J.M., Susin S.A., Vieira H.L., Prévost M.C., Xie Z., Matsuyama S., Reed J.C., Kroemer G., Bax and adenine nucleotide translocator cooperate in the mitochondrial control of apoptosis. *Science*. 1998; 281(5385):2027-2031.
- Mathews M.B., Sonenberg N., Hershey J.W.B., Origins and targets of translational control. En: *Translational Control in Biology and Medicine*, 2007 (pp. 1-10) Mathews M.B., Hershey J.W. (ed.). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press .
- Matzuk M.M., Lamb D.J., Genetic dissection of mammalian fertility pathways. *Nat Cell Biol*. 2002; 4 Suppl:s41-49.
- Meistrich M.L., Longtin J., Brock W.A., Grimes S.R Jr., Mace M.L., Purification of rat spermatogenic cells and preliminary biochemical analysis of these cells. *Biol Reprod*. 1981; 25(5):1065-1077.
- Meistrich M.L., Mohapatra B., Shirley C.R., Zhao M., Roles of transition nuclear proteins in spermiogenesis. *Chromosoma*. 2003; 111(8):483-488.
- Miyagi Y., Kerr S., Sugiyama A., Asai A., Shibuya M., Fujimoto H., Kuchino Y., Abundant expression of translation initiation factor EIF-4E in post-meiotic germ cells of the rat testis. *Lab Invest*. 1995; 73(6):890-898.
- Moreno R.D., Lizama C., Urzúa N., Vergara S.P., Reyes J.G., Caspase activation throughout the first wave of spermatogenesis in the rat. *Cell Tissue Res*. 2006; 325(3):533-540.
- Mruk D.D., Silvestrini B., Cheng C.Y., Anchoring junctions as drug targets: role in contraceptive development. *Pharmacol Rev*. 2008; 60(2):146-180.
- Nandi S., Banerjee P.P., Zirkin B.R., Germ cell apoptosis in the testes of Sprague Dawley rats following testosterone withdrawal by ethane 1,2-dimethanesulfonate administration: relationship to Fas? *Biol Reprod*. 1999; 61(1):70-75.
- Nantel F., Monaco L., Foulkes N.S., Masquillier D., LeMeur M., Henriksen K., Dierich A., Parvinen M., Sassone-Corsi P., Spermiogenesis deficiency and germ-cell apoptosis in CREM-mutant mice. *Nature*. 1996; 380(6570):159-162.
- Nguyen M., Millar D.G., Yong V.W., Korsmeyer S.J., Shore G.C., Targeting of Bcl-2 to the mitochondrial outer membrane by a COOH-terminal signal anchor sequence. *J Biol Chem*. 1993; 268(34):25265-25268.
- O'Donnell L., Stanton P.G., Wreford N.G., Robertson D.M., McLachlan R.I., Inhibition of 5 alpha-reductase activity impairs the testosterone-dependent restoration of spermiogenesis in adult rats. *Endocrinology*. 1996; 137(7):2703-2710.
- O'Donnell L., Robertson K.M., Jones M.E., Simpson E.R., Estrogen and spermatogenesis. *Endocr Rev*. 2001; 22(3):289-318.
- Oltvai Z.N., Millman C.L., Korsmeyer S.J., Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell*. 1993;74(4):609-619.
- Oltvai Z.N., Korsmeyer S.J., Checkpoints of dueling dimers foil death wishes. *Cell*. 1994; 79(2):189-192.
- Orth J.M., Gunsalus G.L., Lamperti A.A., Evidence from Sertoli cell-depleted rats indicates that spermatid number in adults depends on numbers of Sertoli cells produced during perinatal development. *Endocrinology*. 1988; 122(3):787-794.
- Orth J.M., Jester W.F., Li L.H., Laslett A.L., Gonocyte-Sertoli cell interactions during development of the neonatal rodent testis. *Curr Top Dev Biol*. 2000; 50:103-124.
- Otera H., Mihara K., Mitochondrial dynamics: functional link with apoptosis. *Int J Cell Biol*. 2012; (2012):1-10

- Ott M., Norberg E., Zhivotovsky B., Orrenius S., Mitochondrial targeting of tBid/Bax: a role for the TOM complex? *Cell Death Differ.* 2009; 16(8):1075-1082.
- Overholtzer M., Mailleux A.A., Mouneimne G., Normand G., Schnitt S.J., King R.W., Cibas E.S., Brugge J.S., A nonapoptotic cell death process, entosis, that occurs by cell-in-cell invasion. *Cell.* 2007; 131(5):966-979.
- Parvinen M., Regulation of the seminiferous epithelium. *Endocr Rev.* 1982; 3(4):404-417.
- Pawlowski W.P., Cande W.Z., Coordinating the events of the meiotic prophase. *Trends Cell Biol.* 2005; 15(12):674-681.
- Penttilä T.L., Hakovirta H., Mali P., Wright W.W., Parvinen M., Follicle-stimulating hormone regulates the expression of cyclic protein-2/cathepsin L messenger ribonucleic acid in rat Sertoli cells in a stage-specific manner. *Mol Cell Endocrinol.* 1995; 113(2):175-181.
- Pujianto D.A., Curry B.J., Aitken R.J., Prolactin exerts a prosurvival effect on human spermatozoa via mechanisms that involve the stimulation of Akt phosphorylation and suppression of caspase activation and capacitation. *Endocrinology.* 2010; 151(3):1269-1279.
- Puthalakath H., Huang D.C., O'Reilly L.A., King S.M., Strasser A., The proapoptotic activity of the Bcl-2 family member Bim is regulated by interaction with the dynein motor complex. *Mol Cell.* 1999; 3(3):287-296.
- Qiao H., Chen J.K., Reynolds A., Höög C., Paddy M., Hunter N., Interplay between synaptonemal complex, homologous recombination, and centromeres during mammalian meiosis. *PLoS Genet.* 2012; 8(6):e1002790.
- Raff M.C., Durand B., Gao F.B., Cell number control and timing in animal development: the oligodendrocyte cell lineage. *Int J Dev Biol.* 1998; 42(3):263-267.
- Rajkovic A., Yan M.S.C., Klysik M., Matzuk M., Discovery of germ cell-specific transcripts by expressed sequence tag database analysis. *Fertil Steril.* 2001; 76(3):550-554.
- Rédei G.P., *Encyclopedia of Genetics, Genomics, Proteomics and Informatics*, 3rd edition 2008, (1822 p.), Netherlands, Springer.
- Robertson K.M., Simpson E.R., Lacham-Kaplan O., Jones M.E., Characterization of the fertility of male aromatase knockout mice. *J Androl.* 2001; 22(5):825-830.
- Rodriguez I., Ody C., Araki K., Garcia I., Vassalli P., An early and massive wave of germinal cell apoptosis is required for the development of functional spermatogenesis. *EMBO J.* 1997; 16(9):2262-2270.
- Rodríguez-Casuriaga R., Geisinger A., López-Carro B., Porro V., Wettstein R., Folle G.A., Ultra-fast and optimized method for the preparation of rodent testicular cells for flow cytometric analysis. *Biol Proced Online.* 2009; (11): 184–195.
- Roser J.F., Regulation of testicular function in the stallion: an intricate network of endocrine, paracrine and autocrine systems. *Anim Reprod Sci.* 2008; 107(3-4):179-196.
- Roy A., Matzuk M.M., Deconstructing mammalian reproduction: using knockouts to define fertility pathways. *Reproduction.* 2006; 131(2):207-219.
- Rucker E.B., 3rd Dierisseau P., Wagner K.U., Garrett L., Wynshaw-Boris A., Flaws J.A., Hennighausen L., Bcl-x and Bax regulate mouse primordial germ cell survival and apoptosis during embryogenesis., *Mol Endocrinol.* 2000; 14(7):1038-1052.
- Russell L.D., Etlin R.A., Sinha Hikim A.P. *Histological and Histopathological Evaluation of the Testis*, (pp. 41-57) 1993, Clegg E (ed.). Clearwater: Cache River Press.
- Russell L.D., Chiarini-Garcia H., Korsmeyer S.J., Knudson C.M, Bax-dependent spermatogonia apoptosis is required for testicular development and spermatogenesis. *Biol Reprod.* 2002; 66(4):950-958.

- Ruwanpura S.M., McLachlan R.I., Stanton P.G., Meachem S.J., Follicle-stimulating hormone affects spermatogonial survival by regulating the intrinsic apoptotic pathway in adult rats. *Biol Reprod.* 2008; 78(4):705-713.
- Sakkas D., Moffatt O., Manicardi G.C., Mariethoz E., Tarozzi N., Bizzaro D., Nature of DNA damage in ejaculated human spermatozoa and the possible involvement of apoptosis. *Biol Reprod.* 2002; 66(4):1061-1067.
- Salvesen G.S., Duckett C.S., IAP proteins: blocking the road to death's door. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002; 3(6):401-410.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Ford N., *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. 1989, 3 vol. Nolan C., Ferguson M. (eds). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sassone-Corsi P., Unique chromatin remodeling and transcriptional regulation in spermatogenesis. *Science.* 2002; 296(5576):2176-2178.
- Schultz N., Hamra F.K., Garbers D.L., A multitude of genes expressed solely in meiotic or postmeiotic spermatogenic cells offers a myriad of contraceptive targets. *PNAS.* 2003; 100(21):12201-12206.
- Schwarz M., Andrade-Navarro M.A., Gross A., Mitochondrial carriers and pores: key regulators of the mitochondrial apoptotic program? *Apoptosis.* 2007; 12(5):869-876.
- Shaha C., Tripathi R., Mishra D.P., Male germ cell apoptosis: regulation and biology. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2010; 365(1546): 1501–1515.
- Sharpe R.M., McKinnell C., Kivlin C., Fisher J.S., Proliferation and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood. *Reproduction.* 2003; 125(6):769-784.
- Sheridan C., Delivani P., Cullen SP., Martin SJ., Bax- or Bak-induced mitochondrial fission can be uncoupled from cytochrome C release. *Mol Cell.* 2008; 31(4):570-85.
- Sheridan C., Martin S.J., Mitochondrial fission/fusion dynamics and apoptosis, *Mitochondrion, Mitochondria, Apoptosis and Cancer*, 2010; 10(6):640-648.
- Shima J.E., McLean D.J., McCarrey J.R., Griswold M.D., The murine testicular transcriptome: characterizing gene expression in the testis during the progression of spermatogenesis. *Biol Reprod.* 2004; 71(1):319-330.
- Shimizu S., Narita M., Tsujimoto Y., Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature.* 1999; 399(6735):483-487.
- Shiratsuchi A., Kawasaki Y., Ikemoto M., Arai H., Nakanishi Y., Role of class B scavenger receptor type I in phagocytosis of apoptotic rat spermatogenic cells by Sertoli cells. *J Biol Chem.* 1999; 274(9):5901-5908.
- Sinha Hikim A.P., Swerdloff R.S., Hormonal and genetic control of germ cell apoptosis in the testis. *Rev Reprod.* 1999; 4(1):38-47.
- Sinha Hikim A.P., Lue Y., Yamamoto C.M., Vera Y., Rodriguez S., Yen P.H., Soeng K., Wang C., Swerdloff R.S., Key apoptotic pathways for heat-induced programmed germ cell death in the testis. *Endocrinology.* 2003; 144(7):3167-3175.
- Siu M.K., Cheng C.Y. Extracellular matrix: recent advances on its role in junction dynamics in the seminiferous epithelium during spermatogenesis. *Biol Reprod.* 2004; 71(2):375-391.
- Slee E.A., Adrain C., Martin S.J., Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis. *J Biol Chem.* 2001; 276(10):7320-7326.
- Sperandio S., de Belle I., Bredesen D.E., An alternative, nonapoptotic form of programmed cell death. *PNAS.* 2000; 97(26): 14376–14381.
- Spradling A., Fuller M.T., Braun R.E., Yoshida S., Germline stem cells. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2011; 3(11):a002642.
- Stromhaug P.E., Klionsky D.J., Approaching the molecular mechanism of autophagy. *Traffic.* 2001; 2(8):524-31.

- Suominen J.S., Yan W., Toppari J., Kaipia A., The expression and regulation of Bcl-2-related ovarian killer (Bok) mRNA in the developing and adult rat testis. *Eur J Endocrinol.* 2001; 145(6):771-778.
- Susin S.A., Lorenzo H.K., Zamzami N., Marzo I., Snow B.E., Brothers G.M., Mangion J., Jacotot E., Costantini P., Loeffler M., Larochette N., Goodlett D.R., Aebersold R., Siderovski D.P., Penninger J.M., Kroemer G., Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature.* 1999; 397(6718):441-446.
- Sutovsky P., Manandhar G., Mammalian spermatogenesis and sperm structure: anatomical and compartmental analysis. *En: The Sperm Cell Production, Maturation, Fertilization, Regeneration*, 2006 (pp. 1-31). Barratt C.L.R., De Jonge C.J. (eds.). Cambridge: Cambridge University Press.
- Sutton K.A., Molecular mechanisms involved in the differentiation of spermatogenic stem cells. *Rev Reprod.* 2000; 5(2):93-98.
- Suzuki Y., Imai Y., Nakayama H., Takahashi K., Takio K., Takahashi R., A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death. *Mol Cell.* 2001; 8(3):613-621.
- Tam P.P., Snow M.H., Proliferation and migration of primordial germ cells during compensatory growth in mouse embryos. *J Embryol Exp Morphol.* 1981; 64:133-147.
- Tapanainen J.S., Tilly J.L., Vihko K.K., Hsueh A.J., Hormonal control of apoptotic cell death in the testis: gonadotropins and androgens as testicular cell survival factors. *Mol Endocrinol.* 1993; 7(5):643-650.
- Tesarik J., Greco E., Cohen-Bacrie P., Mendoza C., Germ cell apoptosis in men with complete and incomplete spermiogenesis failure. *Mol Hum Reprod.* 1998; 4(8):757-62.
- Thompson C.B., Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science.* 1995; 267(5203):1456-1462.
- Tsujimoto Y., Cossman J., Jaffe E., Croce C.M., Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science.* 1985 ;228(4706):1440-1443.
- Unni S.K., Modi D.N., Pathak S.G., Dhabalia J.V., Bhartiya D., Stage-specific localization and expression of c-kit in the adult human testis. *J Histochem Cytochem.* 2009; 57(9): 861–869.
- VanDemark N.L., Free M.J., Temperature effects. *En: The Testis*, 1970 (pp. 233–297). Johnson AD, Gomes WR, (eds.). New York: Academic Press.
- Vogelstein B., Lane D., Levine A.J., Surfing the p53 network. *Nature.* 2000; 408(6810):307-310.
- Walensky L.D., Gavathiotis E., BAX unleashed: the biochemical transformation of an inactive cytosolic monomer into a toxic mitochondrial pore. *Trends Biochem Sci.* 2011; 36(12):642-652.
- Wallace D.C., A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine. *Annu Rev Genet.* 2005; 39:359-407.
- Wang R.A., Nakane P.K., Koji T., Autonomous cell death of mouse male germ cells during fetal and postnatal period. *Biol Reprod.* 1998; 58(5):1250-1256.
- Wei M.C., Lindsten T., Mootha V.K., Weiler S., Gross A., Ashiya M., Thompson C.B., Korsmeyer S.J., tBID, a membrane-targeted death ligand, oligomerizes BAK to release cytochrome c. *Genes Dev.* 2000; 14(16):2060-2071.
- Wei M.C., Zong W.X., Cheng E.H., Lindsten T., Panoutsakopoulou V., Ross A.J., Roth K.A., MacGregor G.R., Thompson C.B., Korsmeyer S.J., Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science.* 2001; 292(5517):727-730.
- Weinbauer G.F., Nieschlag E., Endocrine control of germ cell proliferation in the primate testis. What do we really know? *Adv Exp Med Biol.* 1997; 424:51-58.
- Weismann, A., *The Germ-Plasm: A Theory of Heredity*, Translated by Parker W.N., Ronnfeldt H., 1893, London. Charles Scriben's Sons.

- Weng S.L., Taylor S.L., Morshedi M., Schuffner A., Duran E.H., Beebe S., Oehninger S., Caspase activity and apoptotic markers in ejaculated human sperm. *Mol Hum Reprod.* 2002; 8(11):984-991.
- White-Cooper H., Davidson I., Unique aspects of transcription regulation in male germ cells. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2011; 3(7). pii: a002626.
- Willer C.J., Speliotes E.K., Loos R.J., Li S., Lindgren C.M., Heid I.M., Berndt S.I., *et al.*, Six new loci associated with body mass index highlight a neuronal influence on body weight regulation. Genetic Investigation of Anthropometric Traits Consortium. *Nat Genet.* 2009; 41(1):25-34.
- Wine R.N., Chapin R.E., Adhesion and signaling proteins spatiotemporally associated with spermiation in the rat. *J Androl.* 1999 ; 20(2):198-213.
- Wing T.Y., Christensen A.K., Morphometric studies on rat seminiferous tubules. *Am J Anat.* 1982; 165(1):13-25.
- Xu C., Bailly-Maitre B., Reed J.C., Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions. *J Clin Invest.* 2005; 115(10):2656-2664.
- Yan W., Linderborg J., Suominen J., Toppari J., Stage-specific regulation of stem cell factor gene expression in the rat seminiferous epithelium. *Endocrinology.* 1999; 140(3):1499-1504.
- Yan W., Suominen J., Samson M., Jégou B., Toppari J., Involvement of Bcl-2 family proteins in germ cell apoptosis during testicular development in the rat and pro-survival effect of stem cell factor on germ cells in vitro. *Mol Cell Endocrinol.* 2000; 165(1-2):115-129.
- Yan W., Samson M., Jégou B., Toppari J., Bcl-w forms complexes with Bax and Bak , and elevated ratios of Bax/Bcl-w and Bak/Bcl-w correspond to spermatogonial and spermatocyte apoptosis in the testis. *Mol Endocrinol.* 2000a; 14(5):682-699.
- Yan W., Huang J.X., Lax A.S., Pelliniemi L., Salminen E., Poutanen M., Toppari J., Overexpression of Bcl-W in the testis disrupts spermatogenesis: revelation of a role of BCL-W in male germ cell cycle control. *Mol Endocrinol.* 2003; 17(9):1868-1879.
- Yan N., Lu Y., Sun H., Qiu W., Tao D., Liu Y., Chen H., Yang Y., Zhang S., Li X., Ma Y.J., Microarray profiling of microRNAs expressed in testis tissues of developing primates. *Assist Reprod Genet.* 2009; 26(4):179-186.
- Yin X.M., Wang K., Gross A., Zhao Y., Zinkel S., Klocke B., Roth K.A., Korsmeyer S.J., Bid-deficient mice are resistant to Fas-induced hepatocellular apoptosis. *Nature.* 1999 ; 400(6747):886-891.
- Yerushalmi G.M., Leibowitz-Amit R., Shaharabany M., Tsarfaty I., Met-HGF/SF signal transduction induces mimp, a novel mitochondrial carrier homologue, which leads to mitochondrial depolarization. *Neoplasia.* 2002; 4(6):510-522.
- Yu M., Sha H., Gao Y., Zeng H., Zhu M., Gao X., Alternative 3' UTR polyadenylation of Bzw1 transcripts display differential translation efficiency and tissue-specific expression. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006; 345(1):479-485.
- Yu K., Ganesan K., Tan L.K., Laban M., Wu J., Zhao X.D., Li H., Leung C.H., Zhu Y., Wei C.L., Hooi S.C., Miller L., Tan P., A precisely regulated gene expression cassette potently modulates metastasis and survival in multiple solid cancers., *PLoS Genet.* 2008; 4(7):e1000129.
- Zaltsman Y., Shachnai L., Yivgi-Ohana N., Schwarz M., Maryanovich M., Houtkooper R.H., Vaz F.M., De Leonardi F., Fiermonte G., Palmieri F., Gillissen B., Daniel P.T., Jimenez E., Walsh S., Koehler C.M., Roy S.S., Walter L., Hajnóczky G., Gross A., MTCH2/MIMP is a major facilitator of tBID recruitment to mitochondria. *Nat Cell Biol.* 2010; 12(6):553-562.
- Zamzami N., Kroemer G., The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001; 2(1):67-71.
- Zante J., Schumann J., Göhde W., Hacker U., DNA-fluorometry of mammalian sperm. *Histochemistry.* 1977; 54(1):1-7.

Zha J., Harada H., Yang E., Jockel J., Korsmeyer S.J., Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L). *Cell*. 1996; 87(4):619-628.

Zhang Q.H., Ye M., Wu X.Y., Ren S.X., Zhao M., Zhao C.J., Fu G., Shen Y., Fan H.Y., Lu G., Zhong M., Xu X.R., Han Z.G., Zhang J.W., Tao J., Huang Q.H., Zhou J., Hu G.X., Gu J., Chen S.J., Chen Z., Cloning and functional analysis of cDNAs with open reading frames for 300 previously undefined genes expressed in CD34+ hematopoietic stem/progenitor cells. *Genome Res*. 2000; 10(10):1546-1560.

Zheng S., Turner T.T., Lysiak J.J., Caspase 2 activity contributes to the initial wave of germ cell apoptosis during the first round of spermatogenesis. *Biol Reprod*. 2006; 74(6):1026-1033.

Zhu L.J., Cheng C.Y., Phillips D.M., Bardin C.W., The immunohistochemical localization of alpha 2-macroglobulin in rat testes is consistent with its role in germ cell movement and spermiation. *J Androl*. 1994; 15(6):575-582.

Zinkel S., Gross A., Yang E., BCL2 family in DNA damage and cell cycle control. *Cell Death Differ*. 2006; 13(8):1351-1359.

Zong W.X., Lindsten T., Ross A.J., MacGregor G.R., Thompson C.B., BH3-only proteins that bind pro-survival Bcl-2 family members fail to induce apoptosis in the absence of Bax and Bak. *Genes Dev*. 2001; 15(12):1481-1486.

ANEXO: Secuencias

>Mtch2

```

CGACACGTGATCTGGAACCGGCTGTGTGCGCTGGTGACTCCGTCTGTCCGTCCGTCCGCGGGTGCCATCATGGCGGACGCGGC
CAGTCAGGTGCTCCTGGGCTCCGGTCTCACCATCCTGTCCAGCCGCTCATGTACGTGAAAGTGCTCATCCAGGTGGGATATG
AGCCTCTTCTCCAACAATAGGACGGAATATTTTGGGCGACAAGTATATCAGCTTCTGGCCCTCTTTTGCTATGCTCAGCAC
ATTGCAAGCATCGATGGGAAGCGTGGGCTGTTACAGGCTTAACTCCAAGACTGTGTTTCCAGGAGTCTTGGAACTGTGGTCCA
TGGTAAAGTTTACAGTATTACCAGGAGTGTGAGAAACCTGAGGACTTAGGATCTGCAAATGTACAAAAAGAAATATCCATCCT
CCTTTGACCGAGTTATCAAAGAGACAACCTCGAGAGATGATTGCTCGTTCGTGCTACCCCTCATTACACATCCCTTCCACGTG
ATTACTCTGAGGTCCATGGTACAGTTTATCGGCAGAGAGTCTAAGTACTGCGGACTGTGTGACTCCATAGTAACCATCTACCG
GGAAGAAGGCATCGTAGGATTTTTTGGCGGCCTCATTCTCGCCTCCTAGGTGACATCATTTCTTTGTGGCTGTGTAACCTAC
TGGCTTATCTCATCAATACCTATGCACCTGGACAGTGGGGTCTTACCATGAATGAAATGAAAAGTTATTTCCCAAGCTGTACA
GGATTCCTTTGCCAGTATGTTGACATATCCCTTTGTGCTTGTATCTAATCTTATGGCTGTTAACAACCTGTGGGCTTGGTGG
ATCTCCTCCTTACTCCCCAATATATACTTCTTGGATAGATTGCTGGTGCATGCTACAAAAAGCGGGAATATGAGCCGAGGAA
ACAGCTTGTTTTTCCGGAAGGTTCTTGTGGGAAGACTTACTATTGTGACCTGAGAATGTTAATTTGAAGATGTGGAGCAGGG
ACAGTGACATTTCTATAGTCCCAATGCACAGAATTATGGGAGAGAATGTTGATTTCTATACAGTGGCAGCCTTTTTTAATAAT
CATTAAATCTTGGGAAAATGGAGGTGATTGGTGTCTGCTTTTGTGTTCTTTCTTAGCACAAACATCATTACCACACTAGTGT
CCCCAGTAGTTATTTGAAGTGGGGCATTATTTCTCCAATTTCTGTTTTAAACAGAAAACAGACGTATTTTCCATAAATATTA
AGCAGGTTGTCATGTAGATTTGAGTCAGGTTTGTCAAATGAAGAATAGAATTTCCAATTAGAAGGAACAAATCCATAAGAGTT
GATAAATTAAGAAAAGGATACCATGTGGGAGTTTATGATTACCTGAGTACATAGATGCTAGAAAAGTCAACAGCAACCAGCAGTC
TACCTCCACCATGTTTTCCAAGCAGTTGACCCATCTTATCTCTTAATGCTGCTGAGTAACTGTAGCTGTATGCTTCTGTTAG
TATAGAAGAGAAAGTTGTACACCAACAGAAAGGTCAGTTACACAGGCTTAAAGCAAGATTTGGGGAGAAAATATGATGGCT
TTCACTCCAAAGAAGCTCTTGAAGTCTTGTAGCACAAGAAGCAAAACACCCGTAGCACAACAGTAGCCCCCTCAGTGCTCAGTGCC
TCCAGGCTCTAAGGCTGTCTTCACTGGGATTCATTACTATAAGCTCCTGCTCCTAAGCATTTGTTTCTTTTGTGTTACTG
GAGAAGGTGAGTAGTTGTTTTCATTTGTGATGATGCCCTTGAAGAGTGTATCTGTACCTCTTATCTGTTGACAGGTTCTT
AGGATATTTGCCAGCTCGCATGTCCAGCCCTCAGTGAGGCTTGTAAAAACACTTACTGGAGGAAAATTCACTTTACAATGAA
AATTTCTCAACTCAGGCATTGAGATTCTATTCACCTCAGGCTTTTAAACGTCAGGTTAAAATGCTCGTAAGATGAGAAAAGCCCTA
AGGTGTCAAATGTTTAAAGTAAATTCACTGGTACTTTGCCAAATGAGTAAGCACTGACTTTGCTGCTTTTAGACTTCTGTCAA
GCAGCAGAGGCCATGATGTTAGGTAGTGTGAGCGGAGCAGGGTCTTCTGCTCAGGGTTAGGGAGGGATGCAACCAGAAGCTCAT
AAGTAGCTTAGTTTGAATGTCTTTGATGTCAAAGTACTTTGTCTCAAAGTAAATGTAATTTTATATTCATTTCAATACTA
TCTGCATCTGTTTTAATAAAAACATGTTTTGCATTACCTACTCTTTTCTCCAAAAAAGGTCAGTAAAAATGATCTAGGA
AATG
    
```

EN AMARILLO REGIONES UTR, EN GRIS REGIÓN CODIFICANTE Y EN VERDE REGIÓN 3'UTR AUSENTE EN LA ISOFORMA DE *MTCH2* AQUÍ DESCRITA.

>clon 1 y 2

```

TCTGAGGTCCATGGTACAGTTTATCGGCAGAGAGTCTAAGTACTGCGGACTGTGTGACTCCATAGTAACCATCTACCGGGAAG
AAGGCATCGTAGGATTTTTTGGCGGCCTCATTCTCGCCTCCTAGGTGACATCATTTCTTTGTGGCTGTGTAACCTCACTGGCT
TATCTCATCAATACCTATGCACCTGGACAGTGGGGTCTTACCATGAATGAAATGAAAAGTTATTTCCCAAGCTGTACAGGATT
CTTTGCCAGTATGTTGACATATCCCTTTGTGCTTGTATCTAATCTTATGGCTGTTAACAACCTGTGGGCTTGGTGGTGGATCTC
CTCCTTACTCCCCAATATATACTTCTTGGATAGATTGCTGGTGCATGCTACAAAAAGCGGGAATATGAGCCGAGGAAAACAGC
TTGTTTTTCCGGAAGGTTCTTGTGGGAAGACTTACTATTGTGACCTGAGAATGTTAATTTGAAGATGTGGAGCAGGGACAGT
GACATTTCTATAGTCCCAATGCACAGAATTATGGGAGAGAATGTTGATTTCTATACAGTGGCAGCCTTTTTTAATAATCATT
AATCTTGGGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
    
```

>clon 3

```

GCTACCCCTCATTACACATCCCTTCCACGTGATTACTCTGAGGTCCATGGTACAGTTTATCGGCAGAGAGTCTAAGTACTGCGG
ACTGTGTGACTCCATAGTAACCATCTACCGGGAAGAAGGCATCGTAGGATTTTTTGGCGGCCTCATTCTCGCCTCCTAGGTG
ACATCATTTCTTTGTGGCTGTGTAACCTCACTGGCTTATCTCATCAATACCTATGCACCTGGACAGTGGGGTCTTACCATGAAT
GAAATGAAAAGTTATTTCCCAAGCTGTACAGGATTCTTTGCCAGTATGTTGACATATCCCTTTGTGCTTGTATCTAATCTTAT
GGCTGTTAACAACCTGTGGGCTTGGTGGTGGATCTCCTCCTTACTCCCCAATATATACTTCTTGGATAGATTGCTGGTGCATGC
TACAAAAAGCGGGAATATGAGCCGAGGAAAACAGCTTGTTTTTCCGGAAGGTTCTTGTGGGAAGACTTACTATTGTGACCTG
AGAATGTTAATTTGAAGATGTGGAGCAGGGACAGTGACATTTCTATAGTCCCAATGCACAGAATTATGGGAGAGAATGTTGAT
TTCTATACAGTGGCAGCCTTTTTTAATAATCATTAACTCTTGGGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAA
    
```

>clon 4

ATATGAGCCTCTTCTCCAACAATAGGACGGAAATATTTTTGGGCGACAAGTATATCAGCTTCTTGGCCTCTTTTGTATGCTC
AGCACATTGCAAGCATCGATGGGAAGCTTGGGCTGTTACAGGCTTAACTCCAAGACTGTGTTGAGGAGTCCCTGGAAGTGTG
GTCCATGGTAAAGTTTTACAGTATTACCAGGAGTGTGAGAAACCTGAGGACTTAGGATCTGCAAATGTACAAAAAGAATATCC
ATCCTCCTTTGACCGAGTTATCAAAGAGACAACCTCGAGAGATGATTGCTCGTTCTGCTGCTACCCTCATTACACATCCCTTCC
ACGTGATTACTCTGAGGTCCATGGTACAGTTATCGGCAGAGAGTCTAAGTACTGCGGACTGTGTGACTCCATAGTAACCATC
TACCGGGAAGAAGGCATCGTAGGATTTTTTTCGGGCTCATTCTCGCCTCTAGGTGACATCATTCTTTGTGGCTGTGTAA
CTCACTGGCTTATCTCATCAATACCTATGCACTGGACAGTGGGGTCTCTACCATGAATGAAATGAAAAGTTATTTCCCAAGCTG
TCACAGGATCTTTGCCAGTATGTTGACATATCCCTTTGTGCTTGTATCTAATCTTATGGCTGTTAACAACCTGTGGGCTTGCT
GGTGGATCTCTCCTTACTCCCAATATATACTTCTTGGATAGATTGCTGGTGCATGCTACAAAAGCGGGAAATATGAGCCG
AGGAAACAGCTTGTTTTTCCGGAAGGTTCTTGTGGGAAGACTTACTATTGTGACCTGAGAATGTTAATTTGAAGATGTGGAG
CAGGGACAGTGACATTTCTATAGTCCCAATGCACAGAATTATGGGAGAGAATGTTGATTTCTATACAGTGGCACGCTTTTTTA
ATAATCATTTAATCTTGGGAA

>clon 5

CTGTGTTGAGGAGTCTTGGAACTGTGGTCCATGGTAAAGTTTTACAGTATTACCAGGAGTGTGAGAAACCTGAGGACTTAGG
ATCTGCAAATGTACAAAAAGAATATCCATCCTCCTTTGACCGAGTTATCAAAGAGACAACCTCGAGAGATGATTGCTCGTTCTG
CTGCTACCCTCATTACACATCCCTTCCACGTGATTACTCTGAGGTCCATGGTACAGTTTATCGGCAGAGAGTCTAAGTACTGC
GGACTGTGTGACTCCATAGTAACCATCTACCGGGAAGAAGGCATCGTAGGATTTTTTTCGGGCTCATTCTCGCCTCTTAGG
TGACATCATTCTTTGTGGCTGTGTAACCTCACTGGCTTATCTCATCAATACCTATGCACTGGACAGTGGGGTCTCTACCATGA
ATGAAATGAAAAGTTATTTCCCAAGCTGTACAGGATTCTTTGCCAGTATGTTGACATATCCCTTTGTGCTTGTATCTAATCTT
ATGGCTGTTAACAACCTGTGGGCTTGTGGTGGATCTCCTCCTTACTCCCAATATATACTTCTTGGATAGATTGCTGGTGCAT
GCTACAAAAGCGGGAAATATGAGCCGAGGAAACAGCTTGTTTTTCCGGAAGGTTCTTGTGGGAAGACTTACTATTGTGACC
TGAGAATGTTAATTTGAAGATGTGGAGCAGGGACAGTGACATTTCTATAGTCCCAATGCACAGAATTATGGGAGAGAATGTTG
ATTTCTATACAGTGGCACGCTTTTTTAATAATCATTTAATCTTGGGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

>clon 6

ATGAATGAAATGAAAAGTTATTTCCCAAGCTGTACAGGATTCTTTGCCAGTATGTTGACATATCCCTTTGTGCTTGTATCTAA
TCTTATGGCTGTTAACAACCTGTGGGCTTGTGGTGGATCTCCTCCTTACTCCCAATATATACTTCTTGGATAGATTGCTGGT
GCATGCTACAAAAGCGGGAAATATGAGCCGAGGAAACAGCTTGTTTTTCCGGAAGGTTCTTGTGGGAAGACTTACTATTGT
GACCTGAGAATGTTAATTTGAAGATGTGGAGCAGGGACAGTGACATTTCTATAGTCCCAATGCACAGAATTATGGGAGAGAAT
GTTGATTTCTATACAGTGGCACGCTTTTTTAATAATCATTTAATCTTGGGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAAA

>clon 7

GTTCTGCTGCTACCCTCATTACACATCCCTTCCACGTGATTACTCTGAGGTCCATGGTACAGTTTATCGGCAGAGAGTCTAAG
TACTGCGGACTGTGTGACTCCATAGTAACCATCTACCGGGAAGAAGGCATCGTAGGATTTTTTTCGGGCTCATTCTCGCCT
CCTAGGTGACATCATTCTTTGTGGCTGTGTAACCTCACTGGCTTATCTCATCAATACCTATGCACTGGACAGTGGGGTCTCTA
CCATGAATGAAATGAAAAGTTATTTCCCAAGCTGTACAGGATTCTTTGCCAGTATGTTGACATATCCCTTTGTGCTTGTATCT
AATCTTATGGCTGTTAACAACCTGTGGGCTTGTGGTGGATCTCCTCCTTACTCCCAATATATACTTCTTGGATAGATTGCTG
GTGCATGCTACAAAAGCGGGAAATATGAGCCGAGGAAACAGCTTGTTTTTCCGGAAGGTTCTTGTGGGAAGACTTACTATT
GTGACCTGAGAATGTTAATTTGAAGATGTGGAGCAGGGACAGTGACATTTCTATAGTCCCAATGCACAGAATTATGGGAGAGA
ATGTTGATTTCTATACAGTGGCACGCTTTTTTAATAATCATTTAATCTTGGGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAAA

>clon 8

GCTGCTACCCTCATTACACATCCCTTCCACGTGATTACTCTGAGGTCCATGGTACAGTTTATCGGCAGAGAGTCTAAGTACTG
CGGACTGTGTGACTCCATAGTAACCATCTACCGGGAAGAAGGCATCGTAGGATTTTTTTCGGGCTCATTCTCGCCTCCTAG
GTGACATCATTCTTTGTGGCTGTGTAACCTCACTGGCTTATCTCATCAATACCTATGCACTGGACAGTGGGGTCTCTACCATG
AATGAAATGAAAAGTTATTTCCCAAGCTGTACAGGATTCTTTGCCAGTATGTTGACATATCCCTTTGTGCTTGTATCTAATCT
TATGGCTGTTAACAACCTGTGGGCTTGTGGTGGATCTCCTCCTTACTCCCAATATATACTTCTTGGATAGATTGCTGGTGCAT
TGCTACAAAAGCGGGAAATATGAGCCGAGGAAACAGCTTGTTTTTCCGGAAGGTTCTTGTGGGAAGACTTACTATTGTGAC
CTGAGAATGTTAATTTGAAGATGTGGAGCAGGGACAGTGACATTTCTATAGTCCCAATGCACAGAATTATGGGAGAGAATGTT
GATTTCTATACAGTGGCACGCTTTTTTAATAATCATTTAATCTTGGGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AA

>clon 9 (secuencia parcial)

ATTTGTGATGATGCCCTTAAAAAGTGTATCTGTACCTCTTATCTGGTGACCAGGTTCTTAGGATATTGTCCAGCTCGCATGT
CAGACCCTCAGTGAGGCTTGTAAAAACACTTACTGGAGGAAAATTCACTTTACAATGAAAATTTCTCAACTCAGGCATTGAGA
TTCTATTCACTCAGGCCTTTTAAACGTGAGGTTAAAATGCTCGTAAGATGAGAAAGCCCTAAGGTGTCAATTTGTTAAGTAAAT

TCACTGGTACTTTGCCAAATGAGTAAGCACTGACTTTGCTGCTTTTAGACTTCTGTCAATGCAGCAGAGGCCATGATGTTAGG
TAGTGTGAGCGAGCAGGGTCTTCTGCTCAGGGTTAGGGAGGGATGCAACCAGAAGCTCATAAGTAGCTTAGTTTCAAATGTCT
TTGATGTCAAAAGTACTTTGTCTCAAAAGTAATGTAAATTTTATATTCTATTCAATACTATCTGCATCTGTTTTAATATAAAA
CATGTTTTGCATTACCTACTCTTTTCTCCAAAAAAGGTCAAGTAAAAATGATCTAGGAAAATGCAAAAAAAAAAAAAAAAAA

>clon 10

ATGATTGCTCGTTCTGCTGCTACCCTCATTACACATCCCTTCCACGTGATTACTCTGAGGTCCATGGTACAGTTTATCGGCAG
AGAGTCTAAGTACTGCGGACTGTGTGACTCCATAGTAACCATCTACCGGGAAGAAGGCATCGTAGGATTTTTTGGGGCCTCA
TTCCTCGCCTCCTAGGTGACATCATTTCTTTGTGGCTGTGTAACCTCACTGGCTTATCTCATCAATACCTATGCACTGGACAGT
GGGGTCTCTACCATGAATGAAATGAAAAGTTATTCCCAAGCTGTACAGGATCTTTTCCAGTATGTTGACATATCCCTTTGT
GCTTGTATCTAATCTTATGGCTGTTAACAACCTGTGGGCTTGTGGTGGATCTCCTCCTTACTCCCAATATATACTTCTTGGGA
TAGATTGCTGGTGCATGTACAAAAAGCGGAAATATGAGCCGAGGAAACAGCTTGTTTTTCCGGAAGGTTCTTGTGGGAAG
ACTTACTATTGTGACCTGAGAATGTTAATTTGAAGATGTGGAGCAGGGACAGTGACATTTCTATAGTCCCAATGCACAGAATT
ATGGGAGAGAATGTTGATTTCTATACAGTGGCAGCCTTTTTTAATAATCATTTAATCTTGGGGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAAAAAAAAAA

>clon 11

CGACACGTGATCTGGAACCGGCTGTGTGCTTGGTGACTCCGTCTGTCCGTCCCGTCCGCGGGTGCCATCATGGCGGACGCGG
CCAGTCAGGTGCTCCTGGGCTCCGGTCTCACCATCCTGTCCAGCCGCTCATGTACGTGAAAGTGCTCATCCAGGTGGGATAT
GAGCCTCTTCTCCAACAATAGGACGGAATATTTTTGGGCGACAAGTATATCAGCTTCCCTGGCCTCTTTTGTATGCTCAGCA
CATTGCAAGCATCGATGGGAAGCGTGGGCTGTTACAGGCTTAACTCCAAGACTGTGTTCCAGGAGTCTTGGTAACTGTGGTC
CATGGTAAAGTTTTACAGTATTACCAGGAGTGTGAGAAACCTGAGGACTTAATAATCATTTAGGATCTGCAAAATGTACAAAA
GAATATCCATCCTCCTTTGACCGAGTTATCAAAGAGACAACCTCGAGAGATGATTGCTCGTTCTGCTGCTACCCTCATTACACA
TCCCTTCCACGTGATTACTCTGAGGTCCATGGTACAGTTTATCGGCAGAGAGTCTAAGTACTGCGGACTGTGTGACTCCATAG
TAACCATCTACCGGGAAGAAGGCATCGTAGGATTTTTTGGGGCCTCATTCCTCGCCTCCTAGGTGACATCATTTCTTTGTGG
CTGTGTAACCTCACTGGCTTATCTCATCAATACCTATGCACTGGACAGTGGGGTCTTACCATGAATGAAATGAAAAGTTATTC
CCAAGCTGTACAGGATTTCTTCCAGTATGTTGACATATCCCTTTGTGCTTGTATCTAATCTTATGGCTGTTAACAACCTGTG
GGCTTGTGGTGGATCTCCTCCTTACTCCCAATATATACTTCTTGGATAGATTGCTGGTGCATGCTACAAAAAGCGGGAAT
ATGAGCCGAGGAAACAGCTTGTTTTTCCGGAAGGTTCCCTTGTGGGAAGACTTACTATTGTGACCTGAGAATGTTAATTTGAAG
ATGTGGAGCAGGGACAGTGACATTTCTATAGTCCCAATGCACAGAATTATGGGAGAGAATGTTGATTTCTATACAGTGGCAGC
CTTTTTTAATAATCATTTAATCTTGGGGAAA