

**Universidad de la República**  
**Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas**  
**Area Biología - Subárea Biología Celular y Molecular**

**Tesis de Doctorado:**

**Análisis de la espermatogénesis del cobayo  
mediante citometría de flujo,  
y desarrollo de un método de purificación  
de células en profase meiótica temprana.**

**Rosana Rodríguez-Casuriaga**

**Directores: Dr. Gustavo Folle  
Dra. Adriana Geisinger**  
**Co-director: Dr. Ricardo Benavente**

**Tribunal de Tesis: Dra. Cristina Arruti  
Dra. Nibia Berois  
Dra. Mónica Marín  
Dra. Sylvia Dematteis**

**Departamento de Biología Molecular, IIBCE  
2011**

*A la memoria de:*

*Mi padre, ejemplo de alegría,  
lucha y superación en la vida,  
y de quien siempre recibí  
apoyo incondicional.*

*Mi maestro, Rodolfo Wettstein,  
quien fuera el orientador original de este trabajo,  
y a quien prometí que el mismo  
no quedaría inconcluso.*

## **AGRADECIMIENTOS**

*A mis orientadores, los de ayer y los de hoy, por su apoyo constante y los importantes aportes que realizaron durante el desarrollo de esta tesis. Deseo particularmente agradecer a Adriana Geisinger y Gustavo Folle, quienes tuvieron una activa participación en la incorporación de la citometría de flujo al presente trabajo.*

*A mi co-orientador Ricardo Benavente, por sus valiosos aportes y consejos que ayudaron a llevar a cabo esta tesis, y por ser un referente directo siempre dispuesto a colaborar.*

*A Rodolfo Wettstein, quien lamentablemente ya no se encuentra con nosotros, por haberme brindado siempre su apoyo y haber compartido generosamente sus ideas y conocimientos.*

*Al Servicio de Citometría de Flujo y Clasificación Celular (SECIF) del IIBCE, con el cual, a raíz del presente proyecto, se estableció una fructífera colaboración que se planea continuar. Cabe destacar que sin la excelente disposición de sus integrantes para acomodar en su agenda las extensas jornadas de trabajo para la puesta a punto, análisis y clasificación celular, no hubiese sido posible desarrollar este trabajo.*

*Deseo particularmente agradecer al actual técnico citometrista del SECIF, Federico Santifiaque, cuya excelencia técnica y disposición fueron fundamentales para alcanzar los objetivos planteados.*

*Asimismo, agradezco a Beatriz López-Carro por el apoyo constante que nos brindó en el SECIF, compartiendo la alegría ante los logros y ofreciendo posibles soluciones cuando surgían complicaciones.*

*A Valentina Porro, actual técnica citometrista en el IPMon, por su aporte técnico en los estudios preliminares en el FACSVantage del SECIF, y luego en la comparación de resultados obtenidos con el MoFlo.*

*A mis compañeros del Departamento de Biología Molecular del IIBCE, por su afecto y apoyo durante el desarrollo de esta tesis.*

*A Merial Montevideo S.A., y en particular al personal de su bioterio, principalmente Héctor y Mario, quienes generosamente donaron todos los cobayos necesarios para los estudios desarrollados.*

*A Juan Carlos Rosillo, actual técnico de la plataforma de Microscopía Electrónica de Transmisión del IIBCE, por su asistencia en el uso del ultramicrotomo.*

*A Marcela Díaz, actual técnica de la plataforma de Microscopía Confocal del IIBCE, por su asistencia y el entrenamiento brindado para el uso del microscopio confocal láser.*

*Al PEDECIBA, en sus 25 años de vida, por posibilitar la realización de estudios de postgrado en nuestro país, y por brindarme una beca de Doctorado.*

*A las fuentes que ayudaron a financiar el presente trabajo: Fondo Clemente Estable (FCE 10.171), CSIC (I+D C-022) y alícuotas PEDECIBA.*

*Al IIBCE que a través de la aprobación de una remuneración complementaria a quienes realizan investigación en el marco de cargos técnicos, ha favorecido la culminación del presente trabajo.*

*A mi madre, por su incondicional apoyo y colaboración a nivel familiar, sin la cual no podría haber dedicado tantas horas a este trabajo.*

*A mis hijos, Camila y Nicolás, por el tiempo que les ha tocado ceder para que este trabajo pudiera concretarse.*

Octubre, 2011.

# **TABLA DE CONTENIDOS**

<b>RESUMEN</b> .....	1
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	
<b>I.1.</b> Generalidades de la meiosis. La meiosis en el marco de la espermatogénesis. Definición de etapas y descripción de estructuras.....	2
<b>I.2.</b> Características del testículo. Dificultades implícitas para avanzar en el conocimiento molecular de la meiosis, y de la espermatogénesis en general.....	9
<b>I.3.</b> Estudio de la meiosis en el marco de la espermatogénesis: abordajes metodológicos y aportes de la citometría de flujo.	
<b>I.3.a.</b> Abordajes metodológicos.....	13
<b>I.3.b.</b> Aportes de la citometría de flujo.....	15
<b>I.4.</b> Principales modelos biológicos empleados en el estudio de la meiosis.....	19
<b>I.5.</b> La profase meiótica: principales avances en el conocimiento molecular en mamíferos.	
<b>I.5.a.</b> Inicio de la profase meiótica en mamíferos: Estado actual de los conocimientos.....	25
<b>I.5.b.</b> El bouquet cromosómico.....	27
<b>I.5.c.</b> El complejo sinaptonémico.....	30
<b>I.5.d.</b> La recombinación meiótica.....	33
<b>I.5.e.</b> Los <i>checkpoints</i> meióticos.....	36
<b>I.6.</b> <i>Cavia porcellus</i> como modelo para el estudio de la profase meiótica temprana: antecedentes directos.....	37
<b>II. OBJETIVOS</b>	
<b>II.1.</b> Objetivo general.....	42
<b>II.2.</b> Objetivos específicos.....	42

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

III.1.	Animales.....	44
III.2.	Preparación de suspensiones celulares de testículo.....	44
III.3.	Estudios de viabilidad celular.....	45
III.4.	Análisis y separación por citometría de flujo.	
III.4.a.	Estudios en FACSVantage (BD).....	46
III.4.b.	Estudios en MoFlo (DakoCytomation).....	47
III.5.	Observación microscópica de células depuestas sobre portaobjetos.....	48
III.6.	Análisis citológico por microscopía óptica de material en cortes.	
III.6.a.	Inclusión de tejido en resina epóxica.....	48
III.6.b.	Inclusión de células aisladas por FACS en resina epóxica.....	49
III.6.c.	Cortes semifinos.....	49
III.7.	Inmunocitoquímica sobre células separadas por FACS.	
III.7.a.	Preparación de los esparcidos.....	49
III.7.b.	Hibridación con anticuerpos.....	50
III.8.	Extracciones de ARN total.....	51
III.9.	Aplicación del <i>mRNA-Differential Display</i> .	
III.9.a.	Preparación de las muestras.....	53
III.9.b.	Preparación del marcador de peso molecular. ....	53
III.9.c.	Corridas electroforéticas en geles largos de poliacrilamida.....	54
III.10.	Análisis de patrones de expresión diferencial. Selección de bandas.....	55

### IV. RESULTADOS

IV.1.	Desarrollo de un método ultra-rápido para la preparación de suspensiones celulares de testículo de roedores.....	56
-------	--	----

<b>IV.2.</b>	Estudios de la espermatogénesis del cobayo por citometría de flujo.	
<b>IV.2.a.</b>	Estudio del desarrollo postnatal de testículo de cobayo. Comparación del establecimiento de su primera onda espermatogénica con otros roedores.....	63
<b>IV.2.b.</b>	Peculiaridades observadas en perfiles citométricos para suspensiones celulares testiculares de cobayos adultos.....	72
<b>IV.3.</b>	Clasificación y separación celular por citometría de flujo.	
<b>IV.3.a.</b>	Puesta a punto de la clasificación celular de estadios espermatogénicos de roedores.....	76
<b>IV.3.b.</b>	Purificación de subestadios de la primera profase meiótica masculina en <i>C. porcellus</i> .....	78
<b>IV.4.</b>	Estudios de expresión estadio-específica durante la espermatogénesis de cobayo	
<b>IV.4.a.</b>	Separación de células cursando diferentes estadios espermatogénicos por citometría de flujo y obtención de ARN total.....	81
<b>IV.4.b.</b>	Aplicación del método de <i>display</i> diferencial de ARN a las diferentes poblaciones celulares a comparar.....	82
<b>IV.4.c.</b>	Análisis de patrones de expresión diferencial.....	86

## **V. DISCUSIÓN**

<b>V.1.</b>	Método desarrollado para la preparación de suspensiones celulares de testículo de roedores.	
<b>V.1.a.</b>	Multinucleados.....	90
<b>V.1.b.</b>	Cúmulos celulares.....	90
<b>V.1.c.</b>	Viabilidad celular.....	91
<b>V.1.d.</b>	Representatividad del tejido.....	92
<b>V.2.</b>	Estudio del desarrollo postnatal de testículo de cobayo por citometría de flujo. Comparación del establecimiento de su primera onda espermatogénica con otros roedores.....	94

<b>V.3.</b>	Perfiles citométricos de suspensiones celulares testiculares de cobayos adultos. Purificación de subestadios de la primera profase meiótica.....	97
<b>V.4.</b>	Utilización del IP como agente intercalante.....	103
<b>V.5.</b>	Utilización de las células purificadas en análisis comparativos de expresión génica.....	105
<b>VI.</b>	<b>CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS</b> .....	111
<b>VII.</b>	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	114
<b>VIII.</b>	<b>ANEXOS</b>	
<b>VIII.1.</b>	Lista de abreviaturas.....	136
<b>VIII.2.</b>	Gráficos adicionales de CMF	
<b>VIII.2.a.</b>	Evaluación de viabilidad celular con el <i>Live/Dead kit</i> .....	137
<b>VIII.2.b.</b>	Distinción de R3 y R4 dentro de la población 4C.....	138
<b>VIII.3.</b>	Análisis de autorradiogramas con <i>image-j 3</i> .....	140
<b>VIII.4.</b>	Publicaciones en revistas internacionales arbitradas en el marco de la Tesis.....	142

## **RESUMEN**

La espermatogénesis en los mamíferos es un proceso aún pobremente comprendido al nivel molecular. La heterogeneidad celular del testículo representa una de las mayores dificultades para su estudio, especialmente cuando el interés se centra en estadios usualmente breves y escasamente representados a nivel del epitelio seminífero como los de profase meiótica temprana [leptoteno (L) y cigoteno (Z)]. Presumiblemente, en estos estadios ya se expresan genes involucrados en eventos meióticos críticos como el alineamiento, apareamiento y recombinación de los cromosomas homólogos.

Con el fin de profundizar en el conocimiento de la profase meiótica temprana en mamíferos, hemos indagado en modelos alternativos a la rata y el ratón, habiendo encontrado que el cobayo (*Cavia porcellus*) es un modelo especialmente atractivo. Un análisis detallado de su primera onda espermatogénica mediante citometría de flujo (CMF), mostró que el testículo de cobayo presenta una representación significativamente mayor de meiocitos cursando L/Z, debido tanto a su mayor duración como al mayor número de células que ingresan en meiosis. Además, encontramos una interesante peculiaridad en los perfiles citométricos obtenidos para cobayo, en los cuales es posible distinguir claramente dos subpoblaciones de meiocitos primarios: los tempranos (L/Z) y los más avanzados (paquiteno y diploteno, P/D). Esta clara distinción aún en individuos maduros, no tiene precedentes y ha permitido la clasificación mediante CMF de subestadios meióticos en altísimo grado de pureza. Las células purificadas fueron posteriormente empleadas para iniciar análisis de expresión génica diferencial, y permitirán, por primera vez, la caracterización de ARNm diferenciales de profase meiótica temprana.

Por otra parte, los estudios preliminares de transcripción realizados (representativos de aproximadamente un 13% del transcriptoma) han permitido la obtención de un elevado número de bandas de ADNc diferenciales de la profase meiótica temprana. Esto sugiere la existencia de importantes niveles de transcripción también durante las primeras etapas de la profase meiótica I y no sólo durante el estadio de P, como había sido propuesto por otros autores en base a estudios que no incluían estas etapas tempranas.

# **I. INTRODUCCIÓN**

## **I.1. Generalidades de la meiosis. La meiosis en el marco de la espermatogénesis. Definición de etapas y descripción de estructuras**

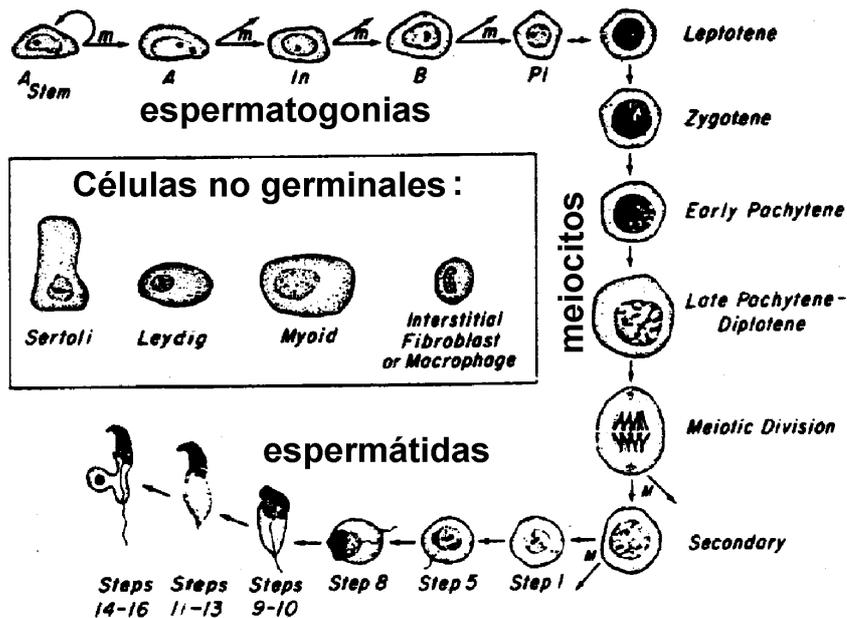
---

La meiosis es un tipo de división celular especializada presente en todos los organismos eucariotas con reproducción sexual, desde las levaduras hasta los mamíferos. Mientras que en las levaduras se da en respuesta a una carencia de nutrientes, y su producto constituye la fase haploide de su ciclo de vida, en los eucariotas superiores, que se reproducen sexualmente, ocurre dentro del proceso de formación de gametos, o gametogénesis. La espermatogénesis, en particular, es un complejo proceso que conduce a la formación de gametos masculinos en las gónadas correspondientes, y puede subdividirse en tres grandes etapas: a) proliferación mitótica de las espermatogonias, b) divisiones meióticas de los espermatocitos, y c) espermiogénesis (Fig. I.1).

Considerando los organismos diplontes, a diferencia de la mitosis, que tiene lugar en todas las células somáticas, la meiosis ocurre únicamente en las células de la línea germinal y consiste en dos divisiones celulares consecutivas, precedidas de una única duplicación del material genético. Mientras la primera división meiótica es reduccional y presenta características únicas, la segunda es ecuacional y se asemeja a una mitosis. Como resultado de ambas divisiones se obtienen cuatro células haploides, con un único juego de cromosomas, que se diferenciarán dando lugar a los gametos. La meiosis, por lo tanto, permite el mantenimiento del número cromosómico de la especie, que es restablecido al fusionarse los gametos masculino y femenino durante la fecundación con la formación del cigoto.

Además de la evidente importancia de su carácter reduccional, durante la meiosis ocurren importantes reordenamientos de la información genética a través de la recombinación homóloga, mediados por procesos de ruptura y reunión que conducen al intercambio recíproco de material entre cromátidas homólogas. Esto representa una fuente fundamental de variabilidad genética, como se expondrá más adelante.

## Células de línea germinal masculina:



**M  
E  
I  
O  
S  
I  
S**

# ESPERMIOGENESIS

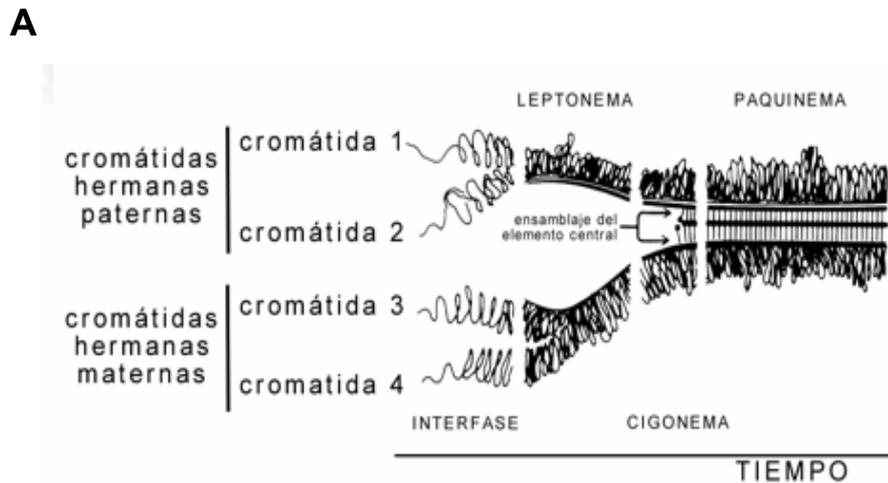
**Figura 1.1.-** Representación esquemática de las tres grandes etapas de la espermatogénesis, mostrando los tipos celulares presentes en el epitelio seminífero, representativos de cada etapa (extraído de Meistrich, 1977).

La primera división meiótica es única por mantener asociadas las cromátidas hermanas a nivel de sus centrómeros, mientras que los cromosomas homólogos se comportan coordinadamente, migrando a polos opuestos. Esta coordinación en el comportamiento cromosómico depende de complejos procesos y elaboradas estructuras, que vienen siendo estudiadas con gran interés. Durante la segunda división meiótica las cromátidas hermanas pierden sus conexiones centroméricas y segregan a polos opuestos.

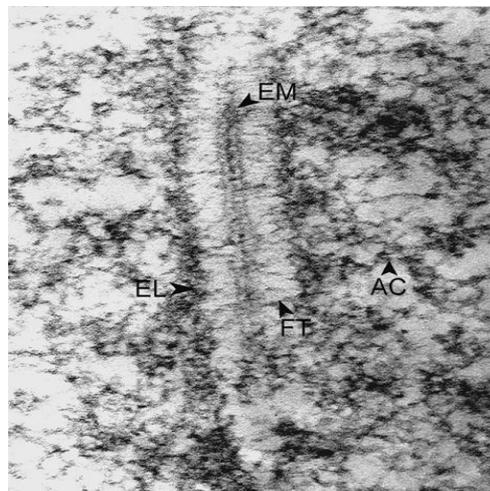
La meiosis I se caracteriza por una extensa profase que ha sido subdividida en cinco estadios para facilitar su descripción. Durante el primero de dichos estadios, leptoteno (L), se organiza un eje de naturaleza proteica a lo largo de cada cromosoma, de forma previa al apareamiento de los cromosomas homólogos. A estos ejes se les conoce como ejes cromosómicos simples o elementos axiales (EAs). La cromatina se encuentra dispuesta como finos filamentos, que en muchas especies es imposible identificar como cromosomas individuales. Es también durante L que los extremos teloméricos insertos a nivel de la periferia nuclear se mueven en el plano de la envoltura nuclear, comenzando a agruparse (Moses,

1968). En la transición al estadio siguiente, el cigoteno (Z), los telómeros llegan a agruparse en un sector limitado de la envoltura nuclear, lo cual conduce a una peculiar conformación cromosómica que recuerda a un arreglo floral, y que se ha denominado *bouquet* (Esponda y Giménez-Martín, 1972; Schertan, 2007). Ha sido sugerido que esta disposición peculiar de los telómeros durante la profase facilitaría el reconocimiento cromosómico y el apareamiento estable de los homólogos (Zickler y Kleckner, 1998), ya que es durante Z que los cromosomas homólogos comienzan a aparearse (sinapsis homóloga), y los EAs pasan a constituir, en tramos de longitud creciente, los elementos laterales (ELs) de estructuras más complejas: los complejos sinaptonémicos (CSs) (von Wettstein *et al.*, 1984; Kleckner, 2006; Zickler, 2006; Cohen *et al.*, 2006). Los CSs son complejos macromoleculares específicos de la meiosis que al microscopio electrónico (ME) de transmisión se observan como estructuras tripartitas integradas por dos ELs y un elemento central o medial (EM) (Fig. 1.2). Los ELs y el EM se mantienen unidos por finas fibras denominadas filamentos transversos (Wettstein y Sotelo, 1971; Schmekel y Daneholt, 1995).

En los estadios de L y Z pueden observarse, como primer signo citológico del proceso de recombinación, complejos proteicos conocidos como nódulos de recombinación tempranos que marcarían todos los sitios donde ocurren reacciones relacionadas con el intercambio de hebras. En la siguiente etapa, paquiteno (P), los cromosomas se encuentran totalmente sinapsados de un extremo a otro, lucen más cortos y gruesos, y la configuración en *bouquet* comienza a desarmarse (Fig. 1.3.A). Es durante este estadio que tiene lugar la recombinación homóloga o *crossing over*, que aparece también mediada por los CSs, y que conduce al intercambio recíproco de material entre las cromátidas homólogas apareadas, como se mencionó anteriormente. Los nódulos de recombinación tardíos pueden observarse durante P, y son menores en número a los nódulos tempranos detectados en L/Z, ya que se corresponden con aquellos intercambios que son efectivamente resueltos como *cross-overs* (Moens *et al.*, 2007; revisión por Handel y Schimenti, 2010).



**B**



**Figura I.2.- A**, Esquemización de los cambios en la organización de la cromatina y estructuras asociadas, desde finales de la interfase premeiótica hasta el estadio de paquiteno de la primera profase meiótica (extraído de De Robertis y De Robertis, 1981). **B**, CS de *Grillus argentinus* observado al microscopio electrónico. *EL*, elemento lateral; *EM*, elemento medial; *FT*, filamentos transversos; *AC*, asas de cromatina (microfotografía obtenida en el Departamento de Biología Molecular del IIBCE).

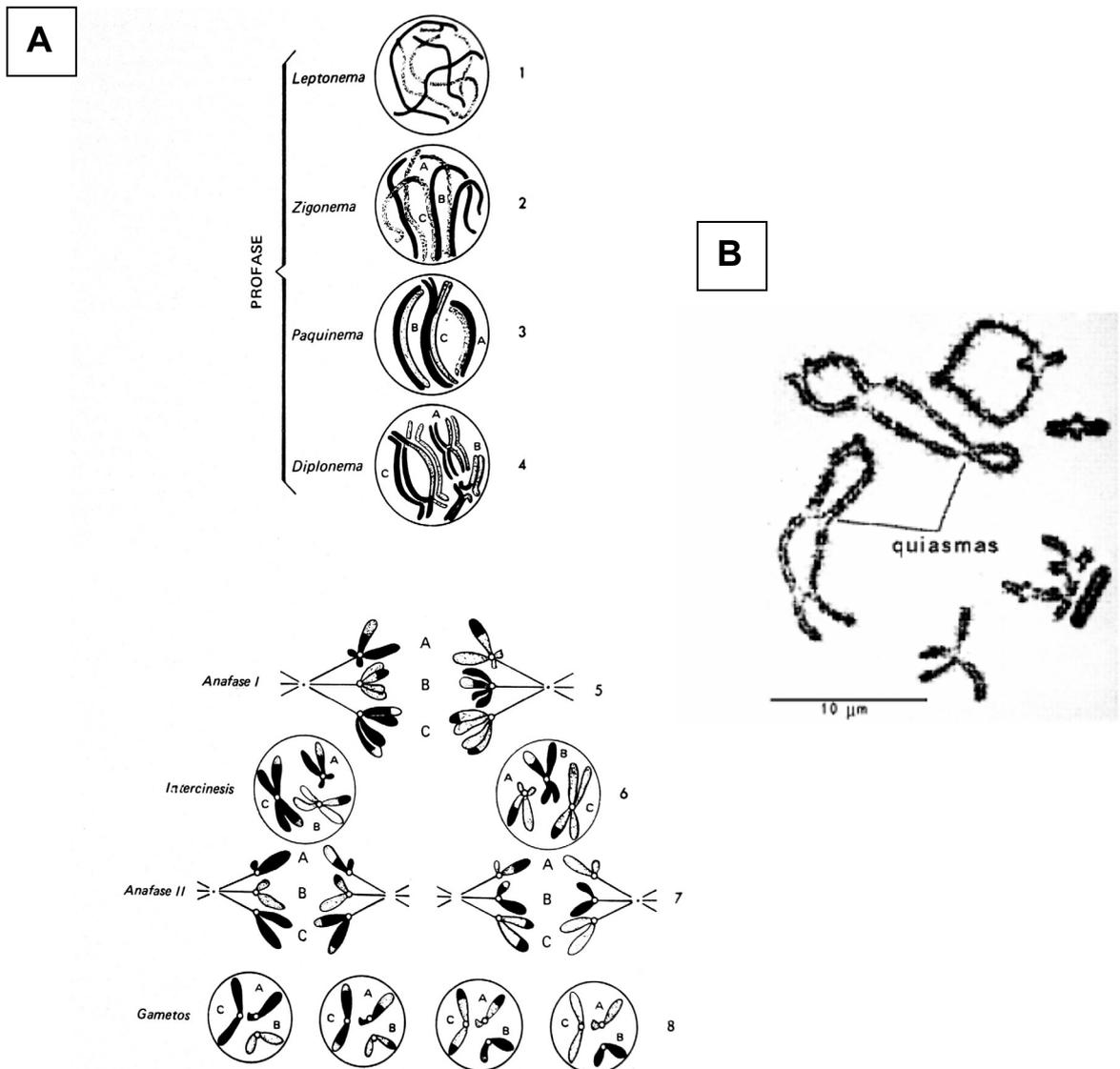
La recombinación homóloga representa una importante fuente de variabilidad genética, y por lo tanto, de biodiversidad, por las siguientes razones: a) genera el intercambio de fragmentos génicos de origen paterno y materno; b) incorpora durante el proceso posibles errores o modificaciones; c) es cuantitativamente importante, dado que necesariamente existirá al menos un punto de recombinación (usualmente varios) por cromosoma (la ocurrencia de al menos un evento de *crossing over* por par cromosómico resulta crucial para una correcta segregación de homólogos durante la metafase I y, la no ocurrencia, de aneuploidías); d) es trascendente, dado que al producirse en los gametos, de ser éstos viables,

transmitirán la modificación génica a la descendencia y, a través de ella, a la población y a la especie. De este modo, la recombinación constituye, junto a los procesos de mutación y segregación, uno de los principales sustratos de la evolución. Desde un punto de vista genético, el generar nuevas combinaciones de genes ligados y no ligados, es la principal consecuencia de la reproducción sexual (Rice y Chippindale, 2001).

La recombinación continúa hasta el siguiente estadio, el diploteno (D), durante el cual los CSs se desensamblan y los homólogos comienzan a separarse, al desaparecer las cohesinas que se encontraban uniendo a los homólogos (Buonomo *et al.*, 2000). En esta etapa los cromosomas permanecen, en general, unidos en varios puntos denominados *quiasmas*, que representarían la evidencia morfológica de los intercambios que tuvieron lugar (sitio de ruptura y reunión recíproca entre cromátidas no hermanas) (Fig. I.3.B).

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

Los procesos de alineamiento, sinapsis y recombinación que tienen lugar en los meiocitos primarios o meiocitos I (diploides, y con contenido de ADN=4C) durante la profase I, son esenciales ya que aseguran la correcta segregación cromosómica en la primera división meiótica. Su alteración suele tener consecuencias deletéreas para la meiosis pudiendo incluso ocasionar infertilidad (Hunt, 2006). Luego de culminada la profase meiótica I tiene lugar la metafase I, marcada por la migración de los cromosomas hacia la placa ecuatorial. En la anafase I los cromosomas homólogos se segregan, dando lugar, en la telofase I, a dos células hijas denominadas meiocitos secundarios o meiocitos II (haploides, pero con contenido de ADN=2C). Finalmente, la segunda división meiótica lleva a la separación de las cromátidas hermanas obteniéndose, como resultado, cuatro células haploides con contenido de ADN=C, llamadas espermátidas redondas en el proceso de espermatogénesis (ver fig. I.3.A).



**Figura I.3.- A**, Esquematación del proceso de meiosis. Se muestran los principales estadios que componen la extensa y compleja profase I, y las dos divisiones consecutivas que resultan en células con un único complemento cromosómico (adaptado de De Robertis y De Robertis, 1981). **B**, Microfotografía mostrando cromosomas extendidos provenientes de un núcleo meiótico en estadio de diploteno, en los que se pueden apreciar los quiasmas o sitios en que tuvo lugar el intercambio recíproco de material genético entre los cromosomas homólogos (extraído de De Robertis y De Robertis, 1981).

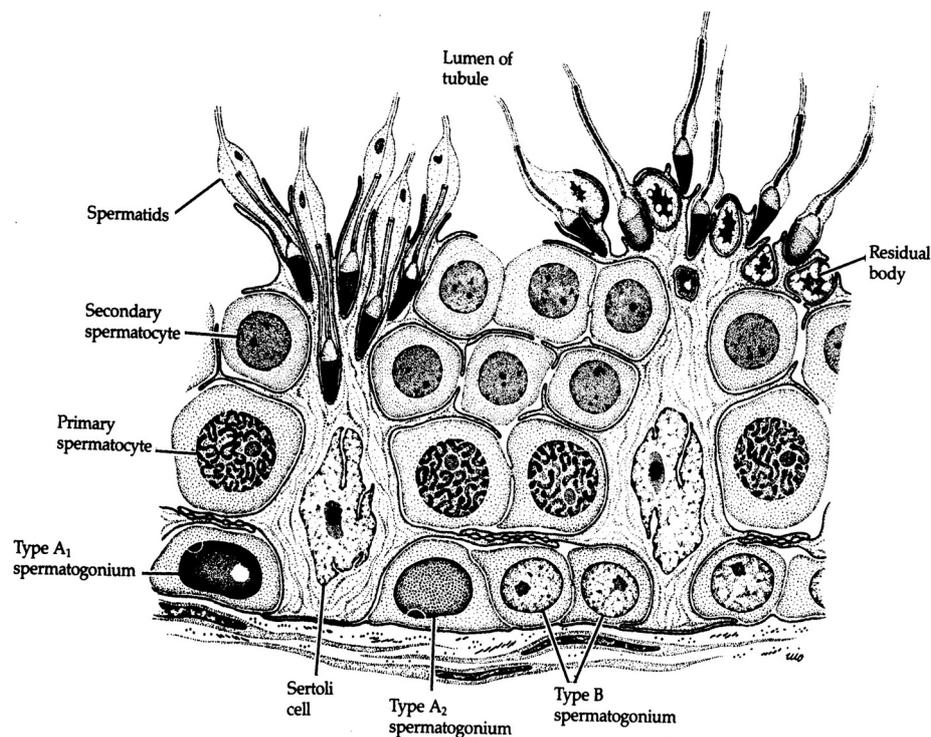
Centrándonos en el proceso de espermatogénesis en mamíferos, la última etapa dentro de este proceso se denomina *espermiogénesis*. La diferenciación de las espermátidas hacia espermios maduros es un ejemplo clásico de diferenciación terminal, que resulta sumamente interesante dados los cambios morfológicos sufridos durante la misma. Las espermátidas resultantes de la segunda división meiótica son células redondas que carecen de flagelo. Mediante la espermiogénesis,

estas células adquieren las estructuras que serán funcionales en lo referente a la motilidad y la interacción con el gameto femenino. Los cambios más relevantes son: a) se genera la vesícula acrosómica a partir del aparato de Golgi; b) el acrosoma forma una caperuza sobre la superficie nuclear; c) el núcleo rota posicionando al acrosoma hacia la membrana basal y al centriolo hacia la luz del túbulo; d) se comienza a formar el flagelo a partir del centriolo; e) el núcleo se aplana; f) el material nuclear se condensa; g) se elimina gran parte del citoplasma; h) las mitocondrias forman un anillo en la base del flagelo. Finalmente, los espermatozoides maduros son liberados a la luz de los túbulos seminíferos.

## I.2. Características del testículo. Dificultades implícitas para avanzar en el conocimiento molecular de la meiosis, y de la espermatogénesis en general.

---

En los túbulos seminíferos de los mamíferos adultos coexisten más de 30 tipos de células diferentes, si se consideran tanto las células de la línea germinal como las células somáticas, a saber: varios tipos de espermatogonias (revisado por de Rooij, 2001), meiocitos primarios en diferentes etapas de la primera profase meiótica, meiocitos secundarios, espermátidas redondas, espermátidas en diferentes fases de elongación, espermátidas elongadas, y células de Sertoli (Fig. I.4). A su vez, los túbulos se encuentran rodeados de células mioides peritubulares e inmersos en un estroma que contiene células de Leydig además de vasos capilares y linfáticos con macrófagos, fibroblastos, mastocitos, linfocitos, eritrocitos, etc.



**Figura I.4.-** Esquema de una sección transversal de túbulo seminífero de mamífero, mostrando la gran heterogeneidad celular. Obsérvese el relacionamiento de las células de Sertoli (nodrizas) con las de la línea germinal en el epitelio seminífero. A medida que las células maduran, progresan hacia la luz del túbulo. También se observa en este esquema la naturaleza sincicial de este epitelio con clonas de células unidas a través de puentes citoplásmicos (extraído de Dym, 1977).

En los cortes transversales de túbulos seminíferos se encuentran células cursando diferentes estadios espermatogénicos y formando un número definido de asociaciones celulares, que fueron determinadas en el pasado para varias especies de mamíferos (Leblond y Clermont, 1952; Clermont, 1960, 1963), y cuya secuencia ordenada constituye un ciclo del epitelio seminífero.

Las divisiones mitóticas de las espermatogonias se caracterizan por presentar citoquinesis incompletas, lo que origina la formación de un sincitio con células unidas por puentes citoplásmicos (Dym y Fawcett, 1971). Esta fase proliferativa es de carácter continuo en la pared epitelial de los túbulos seminíferos produciendo las sucesivas divisiones grupos isógenos o clonas de células interconectadas (*cohortes*). Durante el transcurso de la fase proliferativa algunas clonas inician la fase de maduración y se observa el pasaje sincronizado de un estadio espermatogénico a otro dentro de cada cohorte (Fig. 1.4). Se ha postulado que el rol biológico de los puentes citoplásmicos en el epitelio seminífero es el de mantener la sincronía molecular y estructural de las células durante la maduración, ya que permiten el pasaje de iones, moléculas e incluso organelos entre las células interconectadas (Fawcett *et al.*, 1959; Braun *et al.*, 1989; Ventelä *et al.*, 2003).

La naturaleza heterogénea del testículo ha representado una importante dificultad para el logro de avances en el conocimiento de la expresión génica estadio-específica durante la espermatogénesis. Esta dificultad ha motivado el desarrollo de estrategias experimentales para sortearla, las cuales serán expuestas con mayor detalle en la siguiente sección. A modo de ejemplo, el uso de muestras de testículo total de animales de diferentes edades (Schultz *et al.*, 2003; Shima *et al.*, 2004), y la purificación de diferentes poblaciones de células germinales (Pang *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2004), en combinación con métodos comparativos de expresión génica (hibridación sustractiva, display diferencial de ARNs, y especialmente los microarreglos), han permitido la identificación de un número creciente de genes vinculados a la formación del gameto masculino y aportado un panorama más claro sobre los programas de expresión subyacentes (revisión por Wrobel y Primig, 2005).

Dada la complejidad del proceso espermatogénico y el requerimiento de una fina regulación del mismo, es esperable observar cambios importantes a nivel de la expresión génica durante su desarrollo. Efectivamente, se ha podido determinar que a lo largo de la espermatogénesis existen tres grandes ondas de transcripción de genes relacionadas con las tres etapas previamente mencionadas: 1) la proliferación

mitótica de las espermatogonias; 2) la meiosis; y 3) el proceso de maduración de células germinales pos-meióticas (revisión por Wrobel y Primig, 2005).

En relación a los genes de expresión específica o mayoritaria de la meiosis, cabe destacar que la mayoría de la información disponible corresponde a la primera profase meiótica media a avanzada (P), por ser muy extensa y, en consecuencia, tener una buena representación celular en el epitelio seminífero. A ello se suma el hecho que los meiocitos cursando P son células muy grandes y densas, lo cual ha facilitado su purificación o enriquecimiento mediante diferentes métodos (ver siguiente sección). Por ejemplo, estudios de microarreglos han señalado la existencia de un importante pico de expresión génica en P, concluyendo que P es el principal momento de transcripción durante la meiosis (Schultz *et al.* 2003; Shima *et al.* 2004). Sin embargo, es importante señalar que estos resultados surgen de la comparación de poblaciones testiculares enriquecidas en espermátocitos paquiténicos con células premeióticas (espermatogonias), somáticas (Sertoli y Leydig) o pos-meióticas (espermátidas redondas), pero no se ha podido abordar la comparación con poblaciones celulares enriquecidas en otras etapas de la profase meiótica, como L/Z (usualmente muy breves y escasamente representadas a nivel celular), sobre las que aún persiste un vacío de información.

Otra importante dificultad para el avance en el conocimiento molecular de la meiosis en el marco de la espermatogénesis, es que aún no se han logrado desarrollar sistemas de cultivo celular que permitan una reproducción eficiente de este proceso *in vitro*, si bien se continúa trabajando en el tema y se han logrado algunos avances (revisiones por Sofikitis *et al.*, 2005 y Stukenborg *et al.*, 2009). Numerosos estudios han revelado importantes bloques de información sobre las condiciones generales que favorecen el mantenimiento y la maduración de las células germinales masculinas *in vitro*: a) una temperatura de cultivo de 35°C; b) el co-cultivo con células somáticas testiculares; y c) el uso de material proveniente de individuos aún inmaduros. Sin embargo, existen otros factores relevantes que exceden a estas condiciones básicas. Por ejemplo, estudios *in situ* de la espermatogénesis han puesto de manifiesto que el arreglo espacial de las células testiculares es de enorme importancia para la regulación y completa maduración de las células germinales masculinas (revisión por Wistuba *et al.*, 2007). Esto ha motivado el desarrollo de sistemas de cultivo 3D, en intentos de imitar la organización espacial del epitelio seminífero (Hofmann *et al.*, 1992; Lee *et al.*, 2006,

2007, 2011; Stukenborg *et al.*, 2008, 2009), los que resultan más prometedores que los cultivos celulares convencionales (revisión por Stukenborg *et al.*, 2009).

### **I.3. Estudio de la meiosis en el marco de la espermatogénesis: abordajes metodológicos y aportes de la citometría de flujo**

---

#### **I.3.a. Abordajes metodológicos**

---

En términos generales, puede afirmarse que se han empleado dos estrategias diferentes para obtener poblaciones celulares purificadas o enriquecidas en diferentes estadios espermatogénicos (en particular meióticos) y superar las dificultades mencionadas en la sección anterior, en especial las inherentes a la heterogeneidad tisular:

1) El uso de testículos enteros de individuos juveniles de diferentes edades, con la primera onda espermática incompleta, enriquecidos en diferentes estadios espermatogénicos, según su edad. En estos estudios se comparan los niveles de ARNm entre juveniles con diferente grado de maduración testicular y los cambios observados se atribuyen a la población celular predominante en cada caso. Este abordaje ha permitido la obtención de una considerable cantidad de información sobre los patrones de expresión diferencial durante la primera onda espermatogénica (Vilardell *et al.*, 1989; Thomas *et al.*, 1989; Almstrup *et al.*, 2004; Maratou *et al.*, 2004; Shima *et al.*, 2004; Iguchi *et al.*, 2006). No obstante, la distinción inequívoca de los tipos celulares responsables de los cambios observados en la expresión génica requiere de otros ensayos (por ejemplo, hibridación *in situ* e inmunocitoquímica).

2) El uso de técnicas de separación celular basadas en las diferencias de tamaño y densidad que existen entre diferentes tipos celulares provenientes de testículo (Meistrich, 1977). Dentro de esta categoría, las más utilizadas han sido la separación mediante Staput (Lam *et al.*, 1970; Go *et al.*, 1971; Romrell *et al.*, 1976) y la elutriación (Meistrich, 1977). La técnica de Staput se basa en la decantación gravimétrica de células en un gradiente de albúmina: las células son cargadas en una cámara de separación, luego se les deja decantar sobre el gradiente durante un período mínimo de 2,5 hs, y se procede a la colecta de fracciones lográndose la separación de ciertos tipos celulares, principalmente en base a sus diferentes tamaños. En la elutriación se emplea un rotor de centrifuga con cámara única lateral (elutriador) en el interior del cual se establece un gradiente de flujos. La partícula (célula) se mueve a una posición en la cual el flujo compensa exactamente la tasa de sedimentación. Si la tasa de sedimentación de la partícula es menor que el menor

flujo dentro de la cámara, la misma es expulsada y colectada. Comparativamente, la elutriación es un método más rápido que el Stput, y el rendimiento es mayor. Se ha determinado que permite la separación de meiocitos P y espermátidas redondas con una pureza que ronda el 80% (Meistrich, 1977). Si bien la obtención de fracciones enriquecidas en otros estadios celulares es posible, el grado de pureza logrado es mucho menor (Romrell *et al.*, 1976).

Como se mencionó en la sección anterior, la facilidad relativa para obtener poblaciones enriquecidas en meiocitos paquiténicos en comparación con otros estadios meióticos se basa en que el P es la etapa de la primera profase meiótica de mayor duración, constituyendo el estadio meiótico más representado en las observaciones microscópicas de cortes transversales de túbulos seminíferos, y a que los meiocitos cursando P poseen mayor tamaño y densidad que otros tipos celulares presentes en los túbulos seminíferos, lo que permite el enriquecimiento en estas células. Ello explica que la gran mayoría de los genes identificados hasta hoy como de expresión diferencial en la primera profase meiótica hayan sido identificados a partir del estadio de P.

Dado que los métodos de separación celular permiten la obtención de poblaciones celulares altamente enriquecidas en células espermátogénicas cursando ciertos estadios de maduración, los estudios de expresión génica diferencial basados en estos métodos pueden revelar con mayor precisión los transcritos presentes en determinado tipo celular (Geisinger *et al.*, 2002, 2005). Sin embargo, dichas metodologías implican laboriosos procedimientos de preparación celular y posible afectación de los niveles de expresión génica. Estos podrían verse alterados (por ejemplo, a causa de la posible degradación de ARNm de vida corta) durante el proceso de purificación (Wrobel y Priming, 2005). En algunos casos, dos técnicas diferentes de separación celular han sido secuencialmente utilizadas para aumentar el nivel de pureza obtenido, como elutriación seguida por centrifugación en gradiente de Percoll, pero esta estrategia resulta casi impracticable por su exagerada extensión y laboriosidad (Meistrich *et al.*, 1981; Bucci *et al.*, 1986).

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

Otro método, altamente sofisticado y pionero en el área, se basa en los patrones diferenciales de absorción de la luz que presentan diferentes sectores de los túbulos seminíferos (conteniendo diferentes asociaciones celulares) para la obtención de estadios espermatogénicos de interés bajo un microscopio de disección (Kotaja *et al.*, 2004). Las desventajas principales de este método son la experiencia y pericia que debe poseer el operador (por la fina manipulación que exige) y la imposibilidad de separar los diferentes estadios celulares que se encuentran asociados en un determinado sector del túbulo.

Alternativamente, ciertos organismos en particular han permitido utilizar estrategias específicas para obtener poblaciones homogéneas y estudiar aspectos de la meiosis masculina, pero dichas estrategias no son aplicables a los mamíferos. Tal es el caso del lirio, en el cual mediante un shock térmico (golpe de frío) se logra la sincronización de sus anteras (ver secciones I.4 y I.5.a).

### **I.3.b. Aportes de la citometría de flujo**

---

Como se ha mencionado, en los testículos de mamíferos adultos coexisten diversos tipos celulares, con diferente contenido de ADN, a saber: células C (espermátidas en diversas etapas de maduración, espermios maduros), 2C (diferentes tipos de espermatogonias en fase G1, meiocitos secundarios, diversas células somáticas) y 4C (diferentes estadios de meiocitos primarios, espermatogonias en fase G2). En 1969, Van Dilla y colaboradores demostraron que las diferencias en el contenido de ADN pueden ser utilizadas, a través de la citometría de flujo (CMF), como parámetro de distinción de diferentes poblaciones celulares dentro de una suspensión celular heterogénea. Estos autores observaron la relación existente entre ploidía e intensidad de fluorescencia en la cuantificación de ADN, y generaron histogramas para visualizar las diferentes fases del ciclo celular (G1, S y G2). La exposición de las células a fluorocromos de unión al ADN, y el posterior análisis de la intensidad de fluorescencia emitida por las células también ha permitido la discriminación de diferentes poblaciones celulares de testículo, en base a sus diferentes contenidos de ADN (revisión por Geisinger y Rodríguez-Casuriaga, 2010).

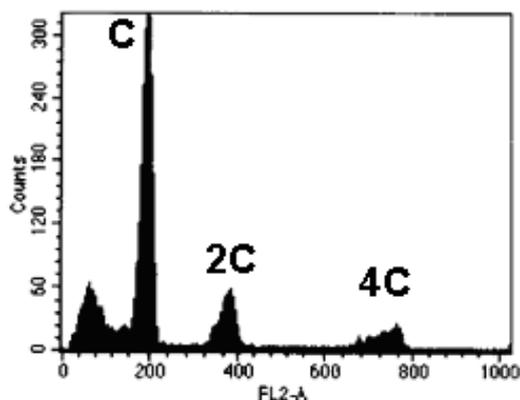
La combinación de dos o más parámetros ha permitido una discriminación más fina entre diferentes tipos celulares que poseen igual cantidad de ADN. Por ejemplo, combinando la información sobre el contenido de ADN con la magnitud de

la dispersión de la luz (que provee información sobre los tamaños relativos en forma análoga a la velocidad de sedimentación), se han logrado separar poblaciones celulares testiculares con alto grado de pureza (Grogan *et al.*, 1981). Más recientemente, se ha descrito la aplicación de la citometría de flujo basada en cuatro parámetros citométricos diferentes, para la caracterización y separación de poblaciones celulares específicas de testículo (Malkov *et al.*, 1998). Los parámetros utilizados en este caso fueron: la dispersión frontal o *forward scatter* (FSC-H), que se relaciona con el tamaño celular; la dispersión lateral o *side scatter* (SSC-H), que refleja la complejidad interna de las células; el área total del pulso o intensidad total de fluorescencia (FL2-A), indicativo del contenido total de ADN de las células; y el ancho del pulso o duración de la emisión para cada evento (FL2-W), que se vincula con el tamaño nuclear. Este análisis multiparamétrico se basa en el hecho que sumado a las diferencias en contenido de ADN mencionadas, los diferentes estadios de maduración de las células germinales masculinas (desde espermatogonias hasta espermios) presentan grandes variaciones en la estructura de su cromatina (nivel de compactación, distribución espacial), así como también en su tamaño y forma nuclear.

La CMF ha sido utilizada para estudiar el desarrollo testicular postnatal y la composición celular testicular de varias especies de mamíferos, entre ellas ratón (Meistrich *et al.*, 1978; Janca *et al.*, 1986; Petit *et al.*, 1995), rata (Clausen *et al.*, 1982; Van Kroonenburgh *et al.*, 1985; Suter *et al.*, 1997; Malkov *et al.*, 1998), hámster (Vigodner *et al.*, 2003, 2004), cerdo (Oskam *et al.*, 2008), gato (Neubauer *et al.*, 2004), y varios primates (Aravindan *et al.*, 1990; Aslam *et al.*, 2002; Wistuba *et al.*, 2003), incluyendo el hombre (Blanchard *et al.*, 1991; Hittmair *et al.*, 1992).

El análisis por CMF de suspensiones celulares testiculares de especímenes adultos ha revelado cuatro grandes niveles de fluorescencia, de acuerdo a su ploidía y nivel de incorporación del fluorocromo (Meistrich *et al.*, 1978; Janca *et al.*, 1986; Malkov *et al.*, 1998; Aslam *et al.*, 2002; Wistuba *et al.*, 2003). En consecuencia, los histogramas resultantes del análisis de estas suspensiones de testículo provenientes de adultos presentan cuatro picos principales, que de izquierda a derecha son: un primer pico aparentemente sub-haploide, y tres picos correspondientes a las poblaciones celulares con contenido de ADN C, 2C y 4C (Fig. I.5). Mientras que la población celular que presenta fluorescencia correspondiente al contenido C contiene espermátidas redondas y en elongación, el pico aparentemente sub-haploide representa espermátidas ya elongadas y espermios maduros. El menor nivel

de tinción de estas células ha sido atribuido a los cambios químicos y morfológicos que ocurren durante la maduración espermática y la transición del empaquetamiento del ADN con histonas al empaquetamiento con protaminas, que ocasiona un nivel de compactación mucho mayor de la cromatina. Como resultado de este fenómeno, el número de sitios en el ADN disponibles para la unión de fluorocromos se reduce (Spanò y Evenson, 1993).



**Figura I.5.-** Histograma resultante del análisis de una suspensión celular de testículo de ratón adulto, representando el número de células en cada nivel de fluorescencia. El pico más alto corresponde a células con contenido de ADN=C, y el que aparece a su izquierda, de contenido aparentemente sub-haploide, corresponde a células también haploides (espermátidas elongadas y espermios maduros), pero que muestran una menor intensidad de fluorescencia, dada la elevada compactación de su cromatina (extraído de Malkov *et al.*, 1998).

---

Los análisis mediante CMF han sido extensamente utilizados en temas vinculados a la Biología reproductiva, tanto en humanos como en animales. Los efectos toxicológicos de agentes químicos, físicos y ambientales sobre la reproducción masculina han sido evaluados a lo largo de la espermatogénesis (modificaciones en las cantidades relativas de diferentes tipos celulares, alteraciones en los histogramas) (Jagetia *et al.*, 1996; 1997; Jyothi *et al.*, 2001; Yoon *et al.*, 2003; Ojha *et al.*, 2008), así como en ensayos sobre la integridad de la cromatina y calidad del semen (De Iuliis *et al.*, 2009). La utilidad de la CMF en el diagnóstico de la infertilidad masculina en humanos (Clausen y Abyholm, 1980; Hittmair *et al.*, 1994; Kostakopoulos *et al.*, 1997), y en la capacidad fecundante de animales (Druart *et al.*, 2009) ha sido claramente puesta en evidencia, pudiéndose encontrar varias revisiones en el tema (Garrido *et al.*, 2002; Cordelli *et al.*, 2005; Marchesi *et al.*,

2007, Evenson *et al.*, 2007). Además, se ha logrado discriminar y separar espermatozoides conteniendo un cromosoma X de aquellos que poseen un cromosoma Y en base a pequeñas diferencias en el contenido de ADN. Esta técnica es actualmente de uso habitual en ciencias veterinarias para el control del sexo de la progenie (revisión por Garner, 2006; Hamano, 2007; Vazquez *et al.*, 2008; Rath y Johnson, 2008; Sharpe y Evans, 2009).

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

Sin embargo, salvo algunos ejemplos aislados (Tanaka *et al.*, 2002), la CMF no ha sido utilizada como un método estándar para obtener poblaciones celulares espermatogénicas específicas, para su posterior empleo en estudios de expresión génica.

#### I.4. Principales modelos biológicos empleados en el estudio de la meiosis

---

Entre los modelos tradicionales que permitieron comenzar a entender las bases moleculares de la meiosis, se encuentran, sin duda, las levaduras. La mayoría de los estudios a nivel molecular sobre los principales eventos que tienen lugar durante la meiosis han sido desarrollados en levadura, por tratarse de un organismo unicelular simple, fácilmente cultivable y en el cual se pueden obtener con relativa facilidad mutantes de interés. Un gran número de genes implicados en la meiosis ha sido identificado en levaduras, y sus roles igualmente develados (Chu *et al.*, 1998; Primig *et al.*, 2000; Roeder y Bailis, 2000; Vershon y Pierce, 2000; Davis y Smith, 2001; Mata *et al.*, 2002; Whitby, 2005; Gregan *et al.*, 2006; Hochwagen y Amon, 2006). Sin embargo, es importante tener presente que en las levaduras la meiosis se da como respuesta a una privación de nutrientes, y no en el marco de una gametogénesis. Por otra parte, se ha observado que la conservación de los aspectos morfológicos de la meiosis a lo largo de la escala evolutiva no se mantiene a nivel molecular, y, en consecuencia, la mayoría de los resultados obtenidos en levadura no pueden extrapolarse a eucariotas pluricelulares. En efecto, los datos provenientes de la secuenciación de genomas de varios eucariotas superiores han puesto en evidencia que la mayoría de los genes identificados como meiosis-específicos en levadura, no poseen homólogos en otros genomas. Aparentemente, la existencia de moléculas con funciones análogas sería un fenómeno mucho más frecuente que la homología entre secuencias génicas, al comparar levaduras y eucariotas superiores. Un claro ejemplo de esto lo constituyen las proteínas ZIP1 y SYCP1, componentes análogos de los CS en levaduras y eucariotas superiores, respectivamente (Meuwissen *et al.*, 1992; Sym *et al.*, 1993; Liu *et al.*, 1996; Schmekel *et al.*, 1996; Dong y Roeder, 2000). Más llamativo aún resulta el hecho que una significativa proporción de genes meiosis-específicos de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* no son compartidos con la levadura *Schizosaccharomyces pombe*, y viceversa (Davis y Smith, 2001; Watanabe *et al.*, 2001; Whitby, 2005), sugiriendo que al menos algunos de los genes involucrados en la meiosis son altamente específicos de especie (Watanabe *et al.*, 2001). Además, algunos estudios han evidenciado que no todos los genes relacionados con la espermatogénesis en los roedores poseen un ortólogo en humano (Lin *et al.*, 2006).

Este bajo nivel de conservación podría estar vinculado a la rápida evolución de las proteínas relacionadas con procesos reproductivos que llevarían al establecimiento de barreras reproductivas entre las especies (Swanson y Vacquier, 2002; Clark *et al.*, 2006).

*Drosophila sp* en su carácter de organismo modelo, también ha sido utilizado en estudios sobre meiosis. Al igual que en mamíferos, la meiosis masculina de la mosca de la fruta ocurre en órganos separados (también llamados testículos) y existe un paralelismo sorprendente entre los principales estadios espermatogénicos de mosca y los de ratón o humano. Tales similitudes han motivado el desarrollo de estudios para determinar si el paralelismo se encuentra también presente a nivel de los factores moleculares vinculados al proceso meiótico (*e.g.*, Hong *et al.*, 2005; Bonilla y Xu, 2008). Varios de estos estudios poseen un fuerte componente *in silico*, y (si bien la mayor parte de los genes no están conservados) han conducido a la identificación de unos pocos genes de expresión testículo-específica que se encontrarían conservados filogenéticamente en todos los organismos metazoarios analizados, desde moscas hasta humanos. Dada la baja conservación de secuencias vinculadas a procesos reproductivos, el estudio de estos genes evolutivamente conservados reviste altísimo interés. Algunos de ellos ya eran de función meiótica/espermatogénica conocida, mientras que otros nuevos, precisamente por su gran conservación filogenética, constituyen fuertes candidatos a ejercer una función reguladora en el proceso de gametogénesis masculina (Tanaka *et al.*, 2000; Deng y Lin, 2002; Tsuda *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2003; Bonilla y Xu, 2008). Cabe mencionar que la disección de los testículos de *Drosophila sp* requiere de un operador experimentado, si bien la distinción de estos órganos en el *wild type* se ve facilitada por su coloración amarilla; el desafío suele ser aún mayor en las moscas blancas mutantes, por la similitud en forma y coloración que presentan los testículos y el intestino (Zamore y Ma, 2011).

Otro organismo modelo cuyo estudio ha contribuido al conocimiento de las bases moleculares de la meiosis es el nemátodo de vida libre *Caenorhabditis elegans*. La disección de los procesos de reconocimiento y apareamiento cromosómico, y de formación de *cross-overs* en esta especie, ha revelado un elevado nivel de simplificación en sus mecanismos meióticos. A modo de ejemplo, los sitios cromosómicos necesarios para el apareamiento cromosómico se hallan concentrados en uno de los extremos de cada cromosoma y los eventos recombinatorios son resueltos en un único *cross-over* por cada par cromosómico.

Como consecuencia, los resultados obtenidos en *C. elegans* han permitido una mejor comprensión del comportamiento de los cromosomas meióticos en organismos más complejos (revisión por Zetka, 2009). Por otra parte, la línea germinal de *C. elegans* constituye también un modelo excepcional para el estudio de los controles moleculares que actúan en el mantenimiento de células madre, en la transición del ciclo celular de mitosis a meiosis y, por tratarse de un organismo hermafrodita, en la elección de la identidad sexual del gameto (revisión por Kimble y Crittenden, 2007).

Un modelo que ha caracterizado a un período histórico de investigación es el lirio, *Lilium sp.*, utilizado durante la década de 1970 por los investigadores Stern y Hotta, de la Universidad de California en San Diego (U.S.A.) para realizar interesantes estudios sobre células meióticas en este modelo (ver I.5.a). La elección de este modelo se debió a la facilidad de sincronizar las anteras mediante un golpe de frío a fin de obtener poblaciones celulares homogéneas en un tipo celular, y a la imposibilidad que enfrentaban en esa época los autores para purificar células meióticas de mamífero (Hotta *et al.*, 1985). Sin embargo, estos estudios quedaron discontinuados, y llama la atención que no hayan sido retomados por otros investigadores (este hecho puede explicarse, al menos en parte, por las dificultades que presenta el cultivo de lirio).

El conocimiento de las bases moleculares del proceso meiótico en vegetales resulta de gran interés, especialmente por las potenciales aplicaciones que puede generar a nivel productivo para el mejoramiento de cultivos. En ese sentido, el desarrollo de *Arabidopsis thaliana* como modelo de investigación ha permitido la integración de diversos abordajes experimentales (citológicos, genéticos, moleculares) para el análisis de la meiosis en angiospermas. Esta especie posee un corto ciclo de vida y es fuente de material durante todo el año. Además, el conocimiento de su secuencia genómica y la posibilidad de producir líneas transformadas con ADN-T (por inserción de transposones) (Feldmann y Marks, 1987; Bechtold *et al.*, 1993; Alonso *et al.*, 2003) han permitido la utilización tanto de la genética directa (*forward genetics*) como de la reversa para aislar y caracterizar genes específicos de meiosis (revisiones por Ostergaard y Yanofsky, 2004; Osman *et al.*, 2006). De este modo, se han encontrado homólogos para varios genes codificantes de proteínas involucradas en la recombinación meiótica (Klimyuk y Jones, 1997; Doutriaux *et al.*, 1998; Higgins *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2005; Mercier *et al.*, 2005), y más recientemente se identificó, por primera vez en plantas, una

proteína componente de los CS (Higgins *et al.*, 2005). Esto último se logró a través de estudios *in silico* que buscan la conservación en la estructura secundaria de las proteínas (Bogdanov *et al.*, 2003), dada la escasa conservación en la secuencia primaria existente entre las proteínas de CS (revisión por Osman *et al.*, 2006).

Sin embargo, *Arabidopsis*, al igual que otras plantas superiores, presenta cierta dificultad como modelo, dado que si bien la progresión de la meiosis en las células madre de polen se da de forma más o menos sincronizada, sólo una pequeña proporción de las anteras son meiocitos, y sus pequeñas dimensiones dificultan aún más su purificación (revisión por Armstrong y Jones, 2003). Debido a ello, los análisis del transcriptoma en *Arabidopsis* (Wijeratne *et al.*, 2007) y varias especies vegetales de interés económico como el arroz, el maíz y el trigo (*e.g.* Wang *et al.*, 2005; Crismani *et al.*, 2006; Ma *et al.*, 2007; Huang *et al.*, 2009) efectuados utilizando anteras enteras, resultaron ineficientes para la identificación de genes vinculados a la meiosis (Wijeratne *et al.*, 2007). Recientemente, Chen y colaboradores (2010) desarrollaron en *Arabidopsis* un método de aislamiento de meiocitos mediante colección capilar bajo microscopio. Este abordaje permitió la secuenciación masiva y comparación de ARN de anteras enteras vs. meiocitos aislados, logrando identificar, por primera vez, un conjunto de genes vegetales candidatos a ser meiosis-específicos, que se vienen estudiando con gran interés (Chen *et al.*, 2010).

Considerando los niveles más evolucionados de la escala zoológica, es de gran interés contar con modelos de experimentación para el estudio de la meiosis a nivel molecular en estos organismos, apuntando a una mayor comprensión de las bases de la reproducción de los mamíferos, en general, y de nuestra propia especie, en particular. Si bien algunos estudios han sido realizados en humanos a partir de material obtenido de biopsias testiculares (Lin *et al.*, 2006; Ellis *et al.*, 2007; Feig *et al.*, 2007) o testículos provenientes de adultos donantes fallecidos o de fetos abortados (Sha *et al.*, 2002), los roedores han sido los modelos más frecuentemente elegidos por razones de carácter práctico y ético. A su vez, dentro del orden Rodentia, la rata y el ratón, en su carácter de animales tradicionales de experimentación, han sido los más estudiados.

En este sentido, cabe mencionar los estudios de genética tradicional o directa en ratón, para generar e identificar mutantes afectados en su fertilidad y buscar los genes mutados responsables de determinado fenotipo (Munroe *et al.*, 2000; Ward *et al.*, 2003; Lessard *et al.*, 2004). Para ello se han utilizado dos enfoques metodológicos

principales: la mutagénesis aleatoria de células de la línea germinal en el ratón entero, y de células madre provenientes de embriones. Recientemente, se ha puesto en marcha el “Programa de Genómica Reproductiva” en *The Jackson Laboratory*, que representa un esfuerzo conjunto de colaboración entre laboratorios para producir modelos de infertilidad en ratón. Los procedimientos realizados en el marco de este programa han generado una amplia colección de mutantes con diversos defectos que van desde problemas en el desarrollo de las células germinales (en muchos casos causando la interrupción o detención del proceso en determinada etapa), hasta modificaciones en la morfología espermática (revisión por Furnes y Schimenti, 2007), muchos de los cuales se continúan caracterizando (<http://reprogenomics.jax.org>).

Otro abordaje metodológico alternativo muy utilizado en roedores lo constituyen los estudios de genética reversa en los cuales, a partir del conocimiento de un fragmento de ADN clonado o secuenciado, se investiga su función biológica. Los fragmentos de ADN en estudio pueden provenir, por ejemplo, de estudios de expresión génica diferencial, en los cuales se manifestaron como específicos de cierto estadio espermátogénico, como se ha venido aplicando en el Departamento de Biología Molecular del IIBCE (Geisinger *et al.*, 1996), y se ampliará más adelante.

## **I.5. La profase meiótica: principales avances en el conocimiento molecular en mamíferos**

---

A pesar de las dificultades expuestas anteriormente, se ha logrado un importante avance en el conocimiento molecular del proceso meiótico desde las primeras investigaciones hasta nuestros días. La aplicación de técnicas moleculares ha contribuido enormemente a esos avances, permitiendo conocer y caracterizar a los componentes de las estructuras involucradas. En particular, los estudios se han centrado en la profase de la primera división meiótica, por ser la etapa en la cual ocurren algunos de los eventos más llamativos y exclusivos de la meiosis.

Existen numerosos estudios relacionados con la expresión estadio-específica de genes durante la espermatogénesis (comparando, por ejemplo, meiosis con espermiogénesis), tanto a nivel de transcritos como a nivel de proteínas. Estos estudios han revelado al testículo como un sistema muy interesante, dado el gran número de genes diferencialmente expresados (revisión por Wrobel y Priming, 2005), y los peculiares patrones de regulación de la expresión génica en las células germinales (Elliott, 2003; Huang *et al.*, 2005; Iguchi *et al.*, 2006).

Algunos ejemplos clásicos de estudios a nivel de proteínas son la producción de anticuerpos monoclonales capaces de reconocer estructuras características de ciertos estadios (Heyting *et al.*, 1989; Offenbergh *et al.*, 1991; Smith y Benavente, 1992a; 1992b; Vester *et al.*, 1993; Kralewski *et al.*, 1997; Alsheimer *et al.*, 1998), que permitieron la identificación de importantes productos génicos específicos de células germinales masculinas. Por otra parte, las metodologías para la identificación de ARNm diferencialmente expresados, tales como la hibridación sustractiva (Wang *et al.*, 2001; Fujii *et al.*, 2002; Beissbarth *et al.*, 2003), el *display* diferencial de ARNm (Geisinger *et al.*, 1996; Anway *et al.*, 2003; Luk *et al.*, 2003; Almstrup *et al.*, 2004), el SAGE (*serial analysis of gene expression*) (Yao *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2004; Chan *et al.*, 2006) y los microarreglos (Yu *et al.*, 2003; Rossi *et al.*, 2004; Maratou *et al.*, 2004; Almstrup *et al.*, 2004; Shima *et al.*, 2004; Ellis *et al.*, 2007; Feig *et al.*, 2007), han permitido identificar un alto número de genes relacionados con el desarrollo y la diferenciación de las células germinales masculinas. El desarrollo de la tecnología de producción de ratones mutantes (*knock-out* y/o *knock-down*) y su aplicación a secuencias génicas cuya expresión se considera meiosis-específica, ha proporcionado una valiosísima herramienta para el análisis funcional de importantes proteínas específicas de la meiosis, como los distintos componentes del CS.

A continuación, se hará referencia al estado del conocimiento a nivel molecular de algunos de los principales eventos que tienen lugar durante las primeras etapas de la profase meiótica, desde su inicio hasta el estadio de paquiteno.

### **I.5.a. Inicio de la profase meiótica en mamíferos: Estado actual de los conocimientos**

---

En los mamíferos, la entrada en meiosis en el marco de la espermatogénesis implica la salida del programa de divisiones mitóticas de las espermatogonias. Una prolongada fase S premeiótica precede a la primera profase meiótica y aún no se conocen en profundidad los mecanismos que controlan el inicio y progresión del programa meiótico.

Tales mecanismos de control son bastante mejor comprendidos en *S. cerevisiae*, especie en la cual se ha logrado un panorama más completo acerca de la regulación transcripcional de los genes involucrados en la meiosis (revisión por Kassir *et al.*, 2003). En esta especie, el principal regulador es el gen *Ime1* que codifica la proteína inductora de meiosis (IME1), y cuya expresión es afectada por factores nutricionales y dependiente de la respiración celular (Kassir *et al.*, 1988; Jambhekar y Amon, 2008). IME1, a través de su interacción con UME6 activa la transcripción de genes meióticos *tempranos*, que codifican para proteínas necesarias para la síntesis premeiótica de ADN, la sinapsis y recombinación homólogas. Asimismo, se activa la síntesis de otras proteínas como NDT80 e IME2 que a su vez activan la transcripción de genes meióticos *medios* requeridos para las divisiones meióticas y la formación de esporas, seguidos por los genes *tardíos*, involucrados en la maduración de las esporas formadas.

Se ha podido determinar que los genes regulatorios de la transcripción meiótica identificados como claves en *S. cerevisiae* (como *Ndt80* e *Ime2*), no poseen ortólogos en los mamíferos. Por otra parte, se observó en el ratón un gen con alta similitud de secuencia a *Ime2* (*Mak*), pero que mostró no ser esencial para la fertilidad (Shinkai *et al.*, 2002). Estudios del transcriptoma de células meióticas masculinas de ratón realizados en la última década, tampoco lograron identificar genes involucrados en la regulación del programa meiótico (Schlecht *et al.*, 2004; Shima *et al.*, 2004).

El escenario ha comenzado a cambiar habiéndose realizado recientemente interesantes avances sobre el conocimiento de los factores que determinan la entrada en meiosis en el ratón. Dichos estudios han puesto en evidencia la falta de conservación en los mecanismos de regulación meiótica entre la levadura y el ratón. En éste último, la entrada en meiosis se encuentra regulada por el ácido retinoico (AR) (Jambhekar y Amon, 2008) cuya acción está mediada por un gen de respuesta al AR altamente conservado, *Stra8* (Bowles *et al.*, 2006; Koubova *et al.*, 2006; Bowles y Koopman, 2007). Tanto el ovario como el testículo fetal resultan expuestos al AR proveniente del mesonefros. Sin embargo, sólo en el caso del ovario se observa la entrada en meiosis en la etapa fetal, ya que las células de Sertoli del testículo fetal expresan la enzima CYP26B1, que degrada al AR e impide la expresión de *Stra8*, y, en consecuencia, la entrada en meiosis. Se ha planteado que el ingreso en meiosis de las células germinales en el testículo adulto también podría estar controlado, al menos parcialmente, por la expresión estadio-específica del gen *Cyp26b1*. Asimismo, es probable que la regulación del inicio de la meiosis por AR también involucre factores intrínsecos de las células germinales, tales como DAZL, actuando “*corriente arriba*” de *Stra8* en la vía de inducción meiótica (Lin *et al.*, 2008).

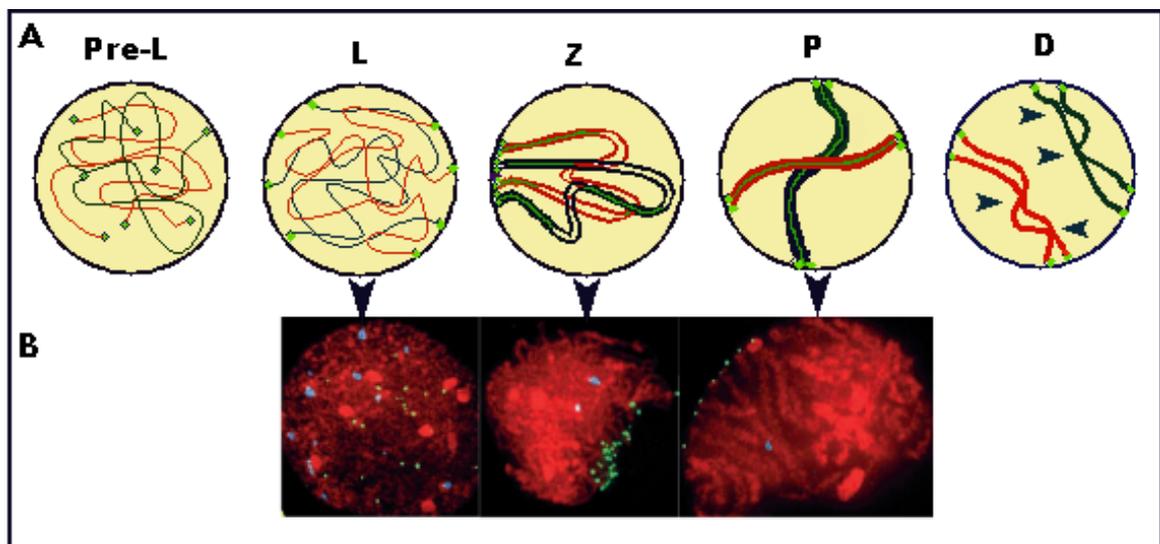
Otro conjunto de datos sobre el inicio de la meiosis proviene de los estudios efectuados durante las décadas de 1970 y 1980 en lirio, y posteriormente extrapolados al ratón, por el grupo de Stern y Hotta. Ellos demostraron, en ambas especies, la existencia de un ADN de replicación tardía (ADNzyg), y observaron en el lirio que, en aquellas células que entrarían en meiosis, a un subconjunto de estas secuencias se les unía una proteína de aproximadamente 70 kDa denominada *proteína L*. Esta proteína, extraída por los autores a partir de membrana nuclear de células en pre-L, L y Z, a través de su unión específica a un subconjunto del ADNzyg de secuencia desconocida, impedía su replicación hasta el estadio de Z, y este fenómeno resultaba esencial para el ingreso en meiosis (Stern y Hotta, 1984). La existencia de ADNzyg fue demostrada también en ratón por los mismos autores, quienes consiguieron que, en condiciones de rigurosidad moderada, los ADNzyg provenientes de ambas especies hibridaran (Stern y Hotta, 1985). Interesantemente, se observó en ambas especies que una proporción del ADNzyg era transcripta a ARN polyA+ (ARNzyg), el cual no pudo ser detectado en células no meióticas en lirio ni en ratón. Este ARNzyg aumentaba abruptamente al final de L, alcanzando su pico máximo en Z medio ( $\geq 40\%$  del ARN polyA+), y descendiendo también en forma abrupta en P. Si bien los estudios de Stern y Hotta quedaron discontinuados por más

de dos décadas, aún sería interesante, especialmente en ratón, conocer la identidad de las secuencias que no se replican en la fase S premeiótica y la de los ARNs derivados. La aplicación de tecnologías de última generación podría, eventualmente, ayudar a determinar la participación de estos factores en el inicio y progreso del proceso meiótico.

### **I.5.b. El bouquet cromosómico**

---

El altamente conservado *bouquet* cromosómico (Scherthan, 2001; Alsheimer, 2009) observable durante la meiosis temprana, se refiere a la disposición espacial de los cromosomas en forma tal que se asemeja a un arreglo floral, y es consecuencia de la convergencia de los telómeros en un área limitada de la envoltura nuclear (EN) en la vecindad al centrosoma (Fig. I.6). Al indagar las bases moleculares de estos eventos dinámicos en diversas especies, se ha demostrado que las proteínas SUN y KASH juegan un rol central (revisión por Razafsky y Hodzic, 2009; ver más adelante).



**Figura I.6.- A.** Esquema mostrando el comportamiento de los cromosomas durante la primera profase meiótica. Nótese la inserción de los extremos teloméricos (puntos verdes) a nivel de la EN en el estadio de leptoteno (L) y su desplazamiento y final congregación en un área limitada de la EN durante el cigoteno (Z), resultando en la formación del *bouquet*. Obsérvese que mientras que en Z los cromosomas homólogos se encuentran parcialmente sinapsados, coexistiendo tramos de CS (líneas verdes) con ejes simples aún no ensamblados, en paquiteno (P) la sinapsis se extiende de un extremo cromosómico al otro. En diploteno (D) puede apreciarse la presencia de quiasmas (cabezas de flecha). **B.**

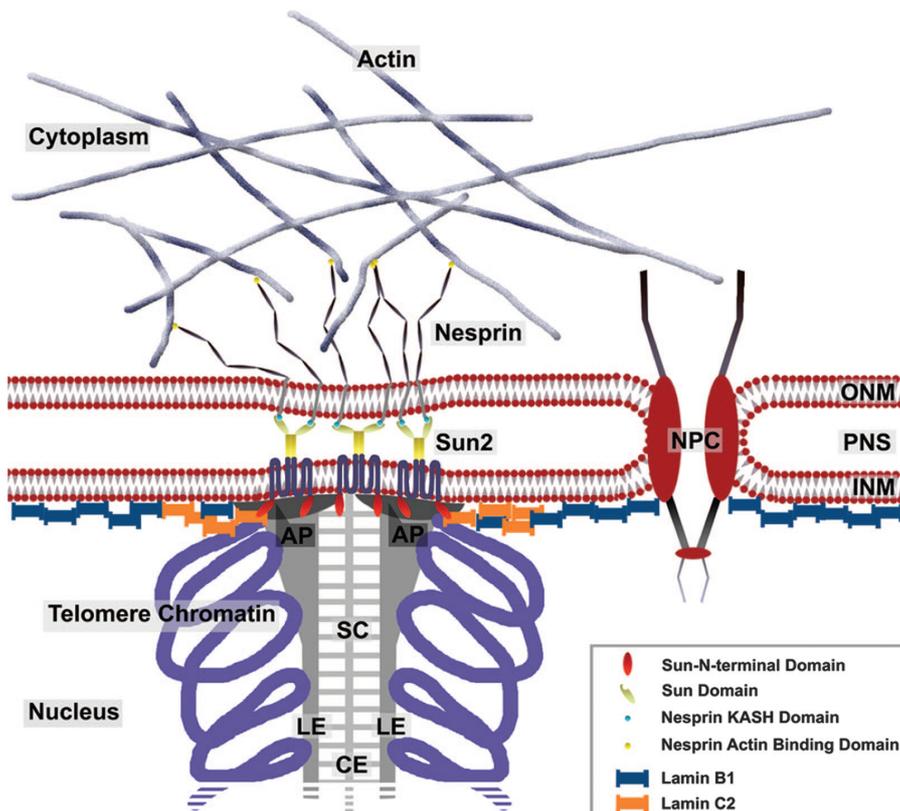
Modificaciones de la cromatina y formación del *bouquet* en meiocitos de maíz. La cromatina teñida con DAPI se muestra en rojo y los telómeros teñidos con FITC en verde. Puede observarse que en Z la cromatina está más condensada que en L. En P puede intuirse que se ha completado la sinapsis ya que la cromatina exhibe un ancho que duplica lo observado en estadios anteriores (extraído de Harper *et al.*, 2004).

---

En la levadura *S. pombe*, la proteína Sad1 colocaliza con los telómeros en la base del *bouquet* e interactúa con las proteínas meióticas Bouquet (Bqt) 1 y 2, que proveen la conexión física entre la región nucleoplásmica de Sad1 y los telómeros (Chikashige *et al.*, 2006). Esta información, sumada a la aportada por Miki y colaboradores (2004) que determinaron que Kms1 interactúa con Sad1 y con la dineína, ha sido el sustrato para proponer un modelo que explica la dinámica de los extremos teloméricos durante la formación del *bouquet*, en término de conexiones intermoleculares a través de la EN entre las proteínas Bqt2–Bqt1–Sad1–Kms1–dineína (Chikashige *et al.*, 2006).

En *S. cerevisiae*, el truncamiento de la región amino-terminal (Nt) tanto de la proteína Mps3 como de la proteína telomérica Ndj1, reduce el movimiento de los telómeros en paquiteno. Se ha determinado que Ndj1 interactúa con el dominio citoplásmico de Mps3, y media la unión de los telómeros a la EN (Conrad *et al.*, 2008). Cabe destacar que los movimientos teloméricos en *S. cerevisiae* están esencialmente mediados por la actina, mientras que en *S. pombe*, plantas y mamíferos lo hacen los microtúbulos (Koszul *et al.*, 2008).

En mamíferos, se han identificado dos proteínas vinculadas a la unión y congregación telomérica: SUN1 y SUN2. La proteína SUN1 se encuentra colocalizada con los telómeros durante casi toda la primera profase meiótica (de L a D) (Ding *et al.*, 2007). En ratones deficientes en esta proteína, no ocurre asociación de telómeros a la EN, ni apareamiento o sinapsis entre homólogos (Ding *et al.*, 2007). Además, la ausencia de esta proteína es causa de infertilidad en ratones (Lei *et al.*, 2009). La proteína SUN2 se ha identificado como un integrante de las placas de unión en los telómeros de los meiocitos de los mamíferos (Schmitt *et al.*, 2007). Estos hallazgos en proteínas SUN de mamíferos, sugieren que los mecanismos moleculares requeridos para el agrupamiento cromosómico durante la formación del *bouquet* se encuentran conservados en los eucariotas (Schmitt *et al.*, 2007) (Fig. 1.7).



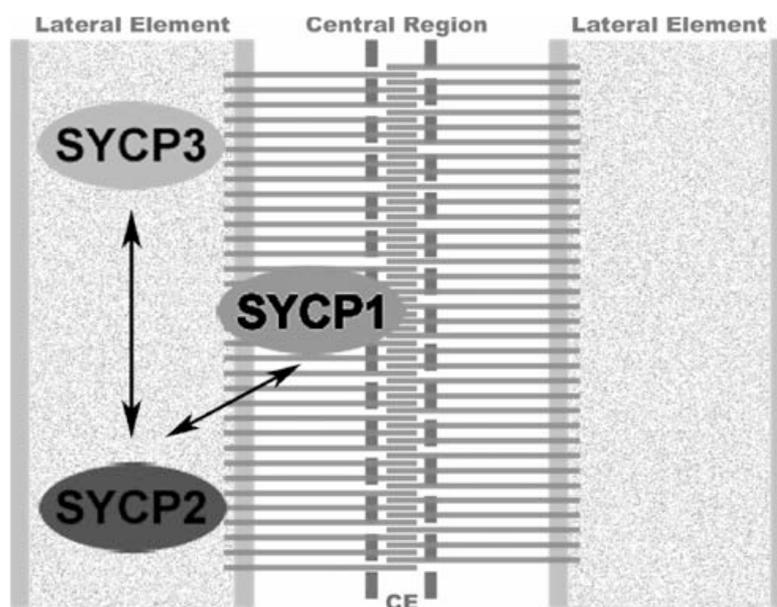
**Fig. I.7.-** Modelo de organización de la EN a nivel de los sitios de inserción y anclaje de los cromosomas meióticos. En las células meióticas, SUN2 se encuentra exclusivamente localizada en las placas de inserción, actuando en el anclaje de telómeros de cromosomas meióticos a la EN. Dentro del espacio perinuclear, su dominio SUN carboxilo-terminal (Ct) se une al dominio KASH de la Nesprina2G (nsp2G), formando un complejo fibrilar estable a modo de puente entre ambas membranas nucleares. Dado que nsp2G interactúa con la actina citoplásmica a través de su dominio de unión a actina, la formación de tal complejo uniría los telómeros al citoesqueleto de actina. AP, placas de inserción; CE, elemento central del CS; NPC, complejo de poro nuclear; PNS, espacio perinuclear; ONM, membrana nuclear externa. (Extraído de Schmitt et al., 2007).

Además de la importancia de la congregación de telómeros en un área limitada de la EN durante la profase temprana, las propias secuencias teloméricas parecen cumplir un rol en la recombinación, dada la elevada tasa de intercambios existentes en las secuencias subteloméricas (Paigen *et al.*, 2008). Por otro lado, ratones deficientes en la enzima telomerasa mostraron también tener afectadas su sinapsis homóloga y recombinación (Liu *et al.*, 2004).

### I.5.c. El complejo sinaptonémico

---

En los últimos años se han realizado importantes avances en lo que respecta a la identificación, caracterización y análisis funcional de proteínas de CS en mamíferos (revisiones por Page y Hawley, 2004; deBoer y Heyting, 2006; Costa y Cooke, 2007; Yang y Wang, 2009).



**Figura I.8.-** Esquematación del CS de mamíferos, mostrando la ubicación de sus tres principales componentes proteicos y las interacciones entre ellos (extraído de Winkel *et al.*, 2009). CE, elemento central.

---

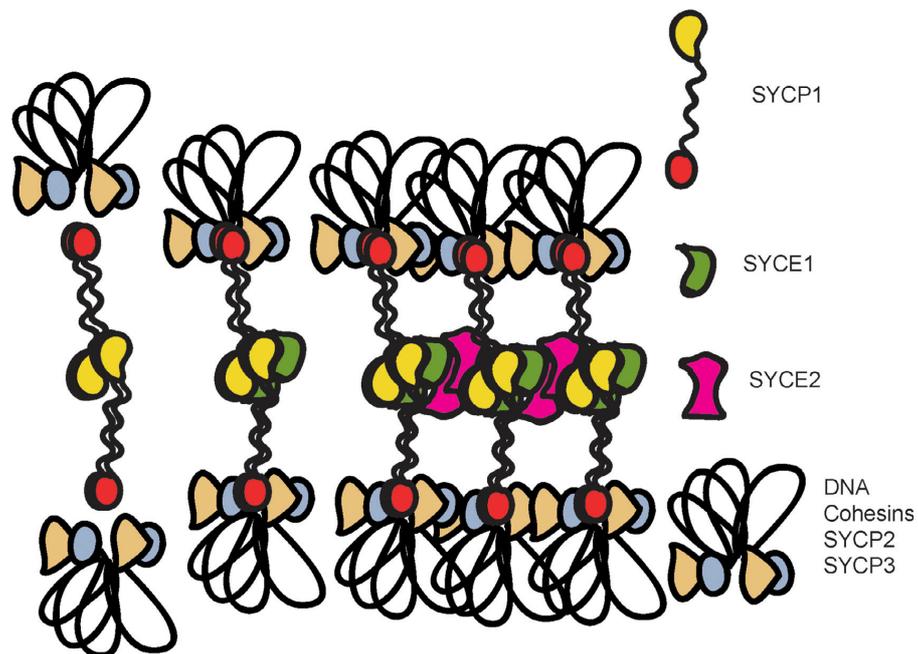
En los mamíferos, dos proteínas, SYCP2 y SYCP3, han sido identificadas como los componentes mayoritarios de los EAs y ELs de los CSs (Lammers *et al.*, 1994; Dobson *et al.*, 1994; Heyting, 1996; Offenberg *et al.*, 1998; Yuan *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2006), en tanto una tercera, SYCP1, es el principal componente estructural de los filamentos transversos (Meuwissen *et al.*, 1992; Dobson *et al.*, 1994; Liu *et al.*, 1996; Schmekel *et al.*, 1996 ; de Vries *et al.*, 2005) (Fig. I.8). Recientemente han sido identificadas cuatro nuevas proteínas, SYCE1, SYCE2, SYCE3 y TEX12, que son componentes específicos del EM (Costa *et al.*, 2005; Hamer *et al.*, 2006; Bolcun-Filas *et al.*, 2007; Schramm *et al.*, 2011). Estas proteínas interactúan con la proteína de los filamentos transversos SYCP1, que sería la encargada de reclutarlas (Costa *et al.*, 2005), y las evidencias disponibles sugieren

que desempeñarían un papel en el ensamblaje del CS, reparación de las rupturas de doble hebra y recombinación (Costa *et al.*, 2005; Bolcun-Filas *et al.*, 2007; Hamer *et al.*, 2008; Schramm *et al.*, 2011). Por ejemplo, se ha demostrado que TEX12 es un componente del elemento medial (EM) cuya presencia es requerida para la propagación de la sinapsis a lo largo de los homólogos apareados, y para la maduración de los eventos de recombinación tempranos en *cross-overs* (Hamer *et al.*, 2008). Antes del descubrimiento de SYCE3, la dependencia observada de la presencia de SYCP1, SYCE1 y SYCE2 para el ensamblaje del CS, llevó a proponer un modelo basado en interacciones entre estas proteínas (Fig. 1.9) (Bolcun-Filas *et al.*, 2007). Al modelo puede agregarse el más recientemente identificado componente del EM en ratón, SYCE3, el cual ha mostrado ser esencial para el reclutamiento de otras proteínas del EM (SYCE1, SYCE2 y TEX12), y para la recombinación (Schramm *et al.*, 2011).

Aunque la búsqueda de proteínas homólogas a los componentes de los CSs de los mamíferos SYCP1, SYCP2 y SYCP3 en los invertebrados, hongos y plantas revela muy poca similaridad de secuencias (Page y Hawley, 2004), la estructura de los CSs está altamente conservada a lo largo de los eucariotas. Se han encontrado análogos funcionales de estas proteínas; esos análogos funcionales conservan la estructura secundaria y organización general (Meuwissen *et al.*, 1992; Sym *et al.*, 1993; Dong y Roeder, 2000; Page y Hawley, 2004; Costa *et al.*, 2005; Colaiácovo, 2006; Osman *et al.*, 2006). La búsqueda de homólogos de secuencia en eucariotas inferiores para los componentes del EM tampoco ha arrojado resultados positivos más allá de los vertebrados, aunque es posible que también para estas proteínas existan análogos funcionales en otros organismos (Costa *et al.*, 2005).

Otros hallazgos han puesto de manifiesto que los EAs del CS se ensamblan sobre núcleos de cohesinas (proteínas involucradas la cohesión entre cromátidas hermanas) (ver fig. 1.8), varios de cuyos componentes son meiosis-específicos (STAG3, REC8 y SMC1 $\beta$ ) (Prieto *et al.*, 2001; Eijpe *et al.*, 2003; Revenkova *et al.*, 2004). Los núcleos de cohesinas están presentes en los EAs/ELs desde L y hasta D, y parecen estar proveyendo el esqueleto al cual se unen SYCP2, SYCP3 y las proteínas involucradas en la recombinación (Pelttari *et al.*, 2001; Eijpe *et al.*, 2003). Un rol en la protección de telómeros ha sido recientemente reportado para la cohesina SMC1 $\beta$  en los meiocitos de ratón (Adelfalk *et al.*, 2009). Luego del desensamblaje del CS, las cohesinas participarían en el mantenimiento de la cohesión entre cromátidas hermanas durante la metafase I, y subsecuentemente

entre los centrómeros hermanos en la II (revisiones por Lee y Orr-Weaver, 2001; Petronczki *et al.*, 2004; Firooznia *et al.*, 2005).



**Figura I.9.-** Modelo de ensamblaje del CS. Según el modelo planteado, homodímeros de SYCP1 formarían asociaciones inestables entre sus extremos N-t, impidiendo la asociación de sus extremos C-t con los ELs. La estabilización de los homodímeros mediante interacciones con SYCE1 en los rudimentos del EM, posibilitaría que los extremos C-t de SYCP1 se asocien con los ELs, iniciando la sinapsis. La extensión estable del proceso de sinapsis se lograría a través de interacciones entre las tres proteínas del EM: SYCP1, SYCE1 y SYCE2 (extraído de Bolcun-Filas *et al.*, 2007).

También se han realizado avances en el conocimiento de las proteínas responsables de la unión de los CSs a la envoltura nuclear interna. Se conoce como complejos LINC a las asociaciones proteicas que establecen un puente entre las membranas nucleares interna (MNI) y externa (MNE) y que se caracterizan por ser evolutivamente conservadas y proveer una conexión física entre estructuras nucleares y el citoesqueleto. Los complejos LINC están compuestos por proteínas con dominio SUN, ubicadas a nivel de la MNI, y proteínas con dominio KASH a nivel de la MNE. Estos complejos no tienen por función exclusiva el anclaje de los CSs a la EN, sino que se encuentran involucrados en una variedad de procesos dinámicos, tales como el anclaje y la movilidad del núcleo celular, el mantenimiento de su forma y la dinámica de los cromosomas meióticos (agrupamiento de telómeros y formación del *bouquet*). Incluso pueden desempeñar una función más adelante en la

espermatogénesis: recientemente se ha identificado en mamíferos la proteína SUN3, de expresión espermiogénesis-específica, la cual posee una distribución sumamente polarizada, ubicándose en el polo posterior de la EN junto con su pareja con dominio KASH, la Nesprina1 (Göb *et al.*, 2010). Los mismos autores también observaron polarización durante la espermiogénesis para los complejos LINC formados por SUN1 y la Nesprina3, las cuales se ubican sobre el polo anterior nuclear, a medida que avanza el proceso. Estos complejos LINC estarían cumpliendo la función de conectar el interior nuclear de la espermátida en diferenciación con estructuras citoesqueléticas circundantes, posibilitando su correcta elongación y remodelado, de fundamental importancia en la generación de gametos masculinos funcionales.

#### **1.5.d. La recombinación meiótica**

---

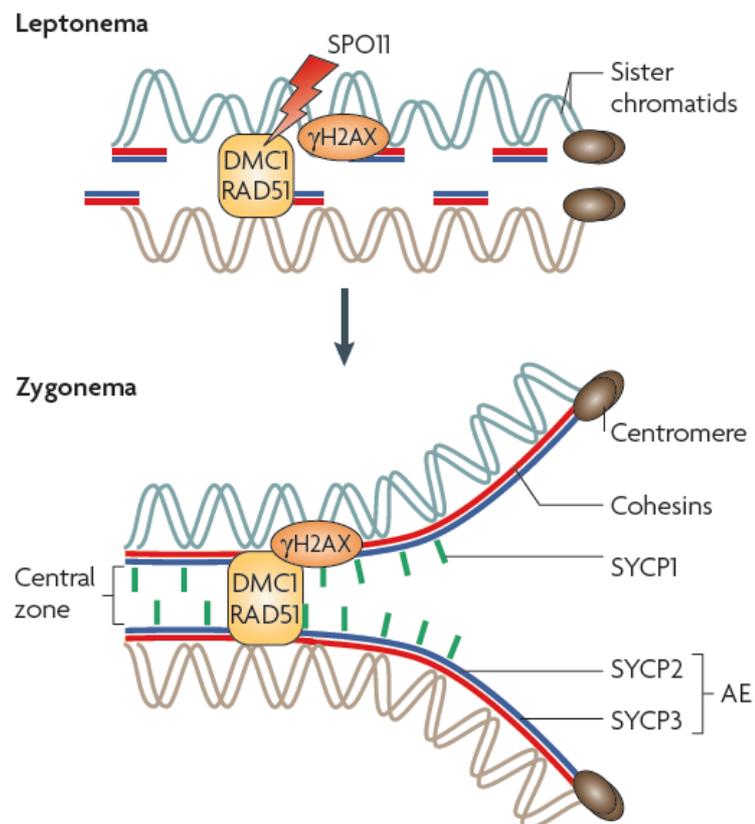
En relación al inicio de la recombinación, la aparición de cortes en doble hebra (DSBs) es un evento esencial que conduce a la recombinación y sinapsis, tanto en las levaduras como en los mamíferos. En *S. cerevisiae*, la formación de DSBs ocurre luego de la replicación premeiótica del ADN, y está mediada por la transesterasa SPO11 y al menos nueve proteínas más (Murakami y Keeney, 2008; Maleki *et al.*, 2007). Mientras que SPO11 es una proteína sumamente conservada, y también es requerida para la inducción de DSBs en el ratón (Romanienko y Camerini-Otero, 2000; Baudat *et al.*, 2000; Mahadevaiah *et al.*, 2001), sólo dos de las otras nueve proteínas poseen homólogos definidos en mamíferos: RAD50 y MRE11, cuya función mitótica es conocida, pero que aún no se ha demostrado que participen en la formación de DSBs durante la meiosis. Es de esperar que en mamíferos también existan muchas otras proteínas involucradas en el inicio de los eventos recombinatorios y/o los pasos iniciales de procesamiento de DSBs, que aún resta identificar. Hasta hace pocos meses, el único gen participante en estos eventos que se conocía en el ratón (además de *Spo11*), era *Mei1*, identificado a través de ensayos de mutagénesis (Libby *et al.*, 2003). Recientemente, Kumar y colaboradores (2010) demostraron la existencia de genes ortólogos de los genes de levadura *Mei4* y *Rec114* en el ratón, basándose en la búsqueda de pequeños bloques de conservación entre especies paulatinamente más distantes, para luego analizar su rol e importancia en el ratón. Si bien se han logrado interesantes avances en el conocimiento molecular de estos eventos en mamíferos, queda aún un largo camino por recorrer.

Los componentes moleculares vinculados a los pasos que siguen a la formación de DSBs (por ejemplo, resección de los extremos 5' generados, invasión de hebras), comprenden el grupo más conservado de proteínas de recombinación meiótica. Entre ellas, se encuentran DMC1 y RAD51, homólogos mamíferos de la recombinasa A de levadura (REC-A). Estas proteínas catalizan la invasión de hebras homólogas durante la recombinación, actuando en la vía de reparación por recombinación homóloga de los DSBs, de fundamental importancia tanto en mitosis como en meiosis (revisión por Handel y Schimenti, 2010) (Fig. I.10).

La distribución en el genoma de los eventos recombinatorios, tanto los que resultan en efectivo intercambio de hebras entre homólogos (*cross-overs*) como los que no (*non-cross-overs*), no es enteramente aleatoria, sino que se ha reconocido la existencia de sitios preferenciales (*hot spots*) en los que la aparición de DSBs es más frecuente. Una importante interrogante en relación a la selección de *hot spots* es si sus determinantes residen a nivel de ciertas secuencias de ADN o de proteínas clave, o una combinación de ambas. Al parecer, existirían tanto factores actuando en *cis* como en *trans* en relación a su selección (revisión por Handel y Schimenti, 2010). Se ha determinado que la selección de estos *hot spots* posee también un componente epigenético, a través de la marca por la histona H3 trimetilada en su lisina 4 (H3K4me3), tanto en levadura (Borde *et al.*, 2009) como en ratón (Buard *et al.*, 2009). Esta modificación en H3 también es conocida por ocurrir en secuencias promotoras de genes (Kniewel y Keeney, 2009). Por otra parte, es sabido que existen vías diferentes para los eventos de *cross-overs* y de *non-crossovers* en levadura (Allers y Lichten, 2001), las cuales presentan diferentes intermediarios de recombinación y dependen de diferentes proteínas (Cromie y Smith, 2007). Al parecer, en ratón también existirían dos vías diferentes para estos eventos (Guillon *et al.*, 2005).

El número de eventos recombinatorios meióticos en ratón puede estimarse inmunocitoquímicamente a través del número de focos de las proteínas RAD51/DMC1 en L (Plug *et al.*, 1996) (Fig. I.10). De los más de 200 eventos recombinatorios que se estima ocurren en la meiosis, solamente unos 23 son efectivamente resueltos como *cross-overs* (Moens *et al.*, 2007). Este hecho explica la diferencia numérica entre los nódulos de recombinación tempranos (L/Z) y los tardíos (P), mencionada anteriormente. Además, la gran cantidad de eventos de *non-cross-overs* contribuiría al apareamiento entre los cromosomas homólogos.

También existe una importante brecha en relación al conocimiento de la regulación de la elección de “pareja” de recombinación en mamíferos. En células mitóticas con ADN duplicado (fases S y G2), la reparación de DSBs ocurre usando preferentemente como molde a la cromátida hermana idéntica, debido a su proximidad y cohesión. En la meiosis la reparación de DSBs tiene lugar tomando como molde a una de las cromátidas del cromosoma homólogo. Los mecanismos que llevan a esta condición han sido estudiados en levadura, y se conocen bajo el nombre de “BSCR” (*Barrier to Sister Chromatid Repair*) (Niu *et al.*, 2005; Carballo *et al.*, 2008). Existen dos moléculas clave responsables del sesgo hacia elección de homólogos en *S. cerevisiae*: las proteínas RED1 y HOP1 componentes de los ELs de los CSs (Hollingsworth *et al.*, 1990; Hollingsworth y Johnson, 1993). En mamíferos, se han identificado dos potenciales ortólogos de HOP1 (HORMAD1 y HORMAD2) que también se ubican a nivel de los ELs (Fukuda *et al.*, 2010; Wojtasz *et al.*, 2009). Como es notorio, aún queda mucho por saber sobre estos mecanismos en mamíferos.



**Figura I.10.-** Cambios a nivel de cromatina y factores moleculares participantes durante los estadios meióticos iniciales en mamíferos. Durante el leptoteno, los cromosomas homólogos comienzan a alinearse, pero aún se encuentran desapareados. Comienzan a ensamblarse

los elementos axiales (AEs) a partir de cohesinas (e.g. SMC1 $\beta$ ), y proteínas específicas de CS, como SYCP3 y SYCP2. Las cromátidas sufren DSBs inducidos por SPO11, proveyendo el sustrato para la recombinación. Los cortes son reconocidos por la maquinaria de reparación por recombinación homóloga [incluyendo la fosforilación por la serín-treonín-quinasa ATM (*Ataxia telangiectasia mutated*) de H2AX para formar  $\gamma$ H2AX] y resecaos, promoviendo la unión de DMC1 y RAD51, entre otras, y conformando así los nódulos tempranos de recombinación a lo largo de los AEs en formación. En el cigoteno, los cromosomas homólogos se han reconocido, se ha extendido el apareamiento y se inicia la sinapsis, con la formación de tramos crecientes de CS. Los elementos axiales pasan así a constituir los ELs del CS (modificado a partir de Handel y Schimenti, 2010).

---

La fidelidad en los procesos de recombinación y segregación es altamente dependiente de las dinámicas de apareamiento y sinapsis de los cromosomas durante la primera profase meiótica. Si bien se ha asumido reiteradamente que los fragmentos en simple hebra (resultantes de la aparición de DSBs y posterior resección de extremos 5'), son los que median la búsqueda de homología entre los cromosomas, resulta improbable que éste sea el único mecanismo actuante en las etapas tempranas de tal búsqueda. En este aspecto, resulta cada vez más evidente la importancia de estructuras (*i.e.* CSs) y/o configuraciones espaciales (*i.e.* *bouquet*) supracromosómicas que actúen como facilitadoras en la búsqueda de homologías.

#### **1.5.e. Los *checkpoints* meióticos**

---

Otro gran capítulo al cual se hará referencia muy brevemente aquí, lo constituyen los sistemas de vigilancia o *checkpoints*, que detectan errores que ocurrieron durante el proceso meiótico (revisión por Handel y Schimenti, 2010, y referencias incluídas). Estos sistemas funcionan como verdaderos controles de calidad, evitando así consecuencias deletéreas en los gametos maduros. Los factores moleculares efectores de estos sistemas de control en la meiosis de los mamíferos vienen siendo muy difíciles de identificar y comprobar, dado que su alteración suele tener efectos letales (revisión por Handel y Schimenti, 2010).

## I.6. *Cavia porcellus* como modelo para el estudio de la profase meiótica temprana: antecedentes directos

---

En procura de un modelo experimental que nos permitiese abordar estudios de expresión génica de profase meiótica temprana en los mamíferos, en nuestro laboratorio de Biología Molecular del IIBCE, se han venido analizando las características de la espermatogénesis del cobayo (*Cavia porcellus*). Se trata de una especie que, a pesar de ser de uso tradicional en la investigación biológica en general (“conejillo de Indias”), poco había sido utilizada en relación a este tema. Los datos disponibles en la literatura al momento de comenzar a indagar en este modelo se limitaban a la descripción morfológica de estadios y a la definición de las asociaciones celulares existentes en secciones transversales de túbulos seminíferos de individuos adultos de esta especie (Clermont, 1960).

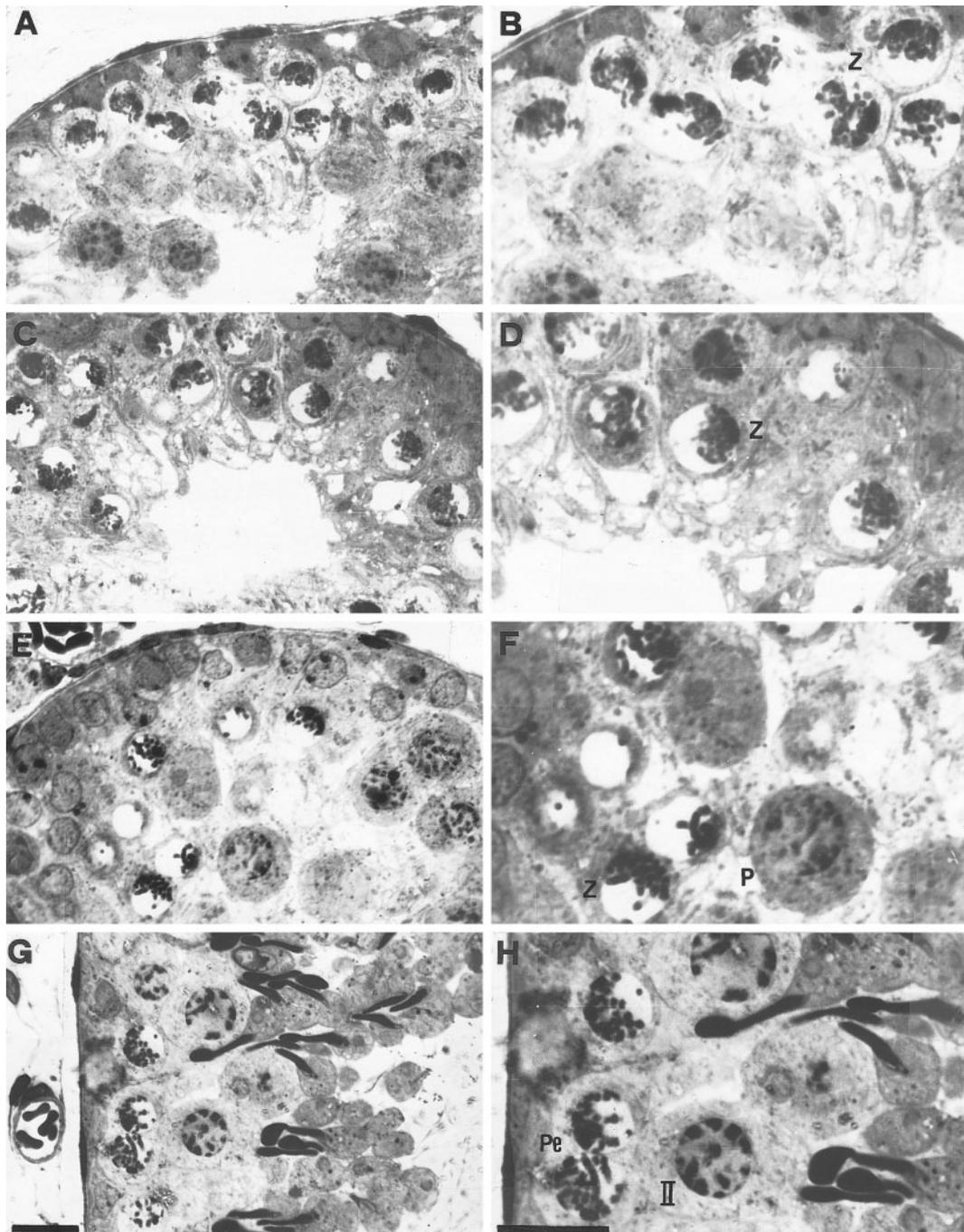
Un indicio de que *C. porcellus* presentaba características peculiares en relación a su profase meiótica temprana derivó de las observaciones al microscopio del contenido de los túbulos seminíferos de un variado número de especies llevadas a cabo hace décadas en el IIBCE. En el caso del cobayo resultaba llamativa la frecuente observación de núcleos con sus cromosomas configurados en *bouquet* (Rodolfo Wettstein, comunicación personal). Este antecedente no publicado y de carácter casi informal, motivó el desarrollo de una tesis de Maestría del PEDECIBA para comenzar a investigar el tema (Rodríguez-Casuriaga, 2000).

Entre los resultados de dichas investigaciones que resultan relevantes para la presente tesis, se encuentran los siguientes:

- *Cavia porcellus* presenta una muy evidente, sumamente polarizada, configuración cromosómica en *bouquet* en los estadios iniciales de su primera profase meiótica (L/Z). Esta es fácilmente observable en cortes de túbulos seminíferos, tanto en adultos como en púberes y prepúberes (Rodríguez y Wettstein, 2004) (Fig.I.11). Esto marca una clara diferencia con rata y ratón, en que la observación de *bouquets* es un hecho mucho más infrecuente.

- El análisis de la abundancia relativa de estos estadios tempranos [basado en conteos sobre cortes semifinos al microscopio óptico (MO)] reveló una representación celular significativamente mayor de L/Z en esta especie en comparación con otras de uso común a nivel experimental, como la rata y el ratón (Rodríguez y Wettstein, 2004). La mayor representación de L/Z en cobayo pudo observarse tanto en adultos como en juveniles, siendo más pronunciada en estos

últimos, naturalmente enriquecidos en los estadios espermatogénicos iniciales al carecer de los más avanzados por su inmadurez.



**Figura I.11.-** Secciones transversales de túbulos seminíferos de cobayos juveniles analizadas al MO. El material corresponde a individuos de 38 (A y C), 35 (E) y 40 (G) días de edad, exhibiendo pesos testiculares de 0,32 g, 0,63 g y 0,93 g, respectivamente. B, D, F y H, muestran a mayor aumento sectores de A, C, E y G, respectivamente. Z, cigoteno; Pe, paquiteno temprano; P, paquiteno; II, espermatoцитos secundarios. Obsérvese la abundante

cantidad de núcleos con sus cromosomas dispuestos en *bouquet*. Las barras corresponden a 10  $\mu\text{m}$  (extraído de Rodríguez y Wettstein, 2004).

---

- A partir de conteos en cortes transversales de túbulos en individuos con su primera onda espermatogénica recién completada, se estimó la duración porcentual de las diferentes etapas de la espermatogénesis en esta especie. Se observó que los estadios de L/Z ocuparían aproximadamente un 20% del tiempo en el cual se completa un ciclo del epitelio seminífero en el cobayo (Rodríguez y Wettstein, 2004).

- El análisis microscópico del contenido celular de los túbulos seminíferos en individuos inmaduros de diversas edades (30-42 días) y sus pesos testiculares, sugirió la existencia de una correlación positiva entre el tamaño testicular y el grado de avance de la primera onda espermatogénica. Sin embargo, esta correspondencia no siempre pudo observarse en relación a la edad cronológica del individuo (Rodríguez y Wettstein, 2004).

Estas peculiaridades observadas en relación a la espermatogénesis del cobayo, y en particular en relación a sus estadios meióticos iniciales, motivaron la continuación de su estudio y el desarrollo de la presente tesis doctoral.

La hipótesis inicial fue que la mayor representación de meiocitos en L/Z a nivel del epitelio seminífero de esta especie, facilitaría su purificación y utilización en posteriores análisis de expresión génica diferencial.

En otras especies como el ratón, la purificación de meiocitos en L/Z sólo es factible a partir de individuos inmaduros, cuya primera onda no avance más allá de los estadios de L y Z. Sin embargo, las características observadas en el testículo de cobayo, sugerían una alta factibilidad de purificar meiocitos L/Z, incluso a partir de individuos maduros. La ventaja de esto radica en que, dado el estrecho relacionamiento existente entre los diversos tipos celulares que conforman el epitelio seminífero, es posible que las secuencias génicas que se expresan en una célula determinada, se vean afectadas por su entorno. En consecuencia, resulta probable que los patrones de expresión génica durante el establecimiento de la primera onda espermatogénica, presenten algunas diferencias con los que ocurren en el testículo adulto.

Como se expondrá en las siguientes secciones, resultaba de especial interés en el desarrollo de la presente tesis la obtención de poblaciones específicas de

células meióticas con alto grado de pureza a partir de cobayos maduros y el desarrollo de estudios de expresión génica diferencial con el fin de aportar al conocimiento de la profase meiótica temprana de mamíferos, en general, y de roedores\*, en particular.

*\*Ubicación filogenética del cobayo:*

La ubicación filogenética del cobayo dentro del orden Rodentia ha sido foco de intenso debate durante las últimas dos décadas, con aporte de evidencias tanto a favor como en contra (Graur *et al.*, 1991; Martignetti *et al.*, 1993; D'Erchia *et al.*, 1996; Churakov *et al.*, 2010). Esto se ha debido, en gran parte, a la carencia de herramientas adecuadas que permitieran seguir la historia evolutiva en forma no ambigua, las cuales se han comenzado a desarrollar en los últimos años (Kriegs *et al.*, 2006).

Los mamíferos placentarios, inicialmente divididos en base a características morfológicas, contenían muchas agrupaciones erróneas debido a características que surgieron mediante procesos de selección similares pero que evolucionaron independientemente. La introducción de los análisis moleculares a los estudios de filogenia corrigió muchos de estos errores, permaneciendo algunos, sin embargo, debido a la existencia de las llamadas “homoplasias moleculares” (presencia de características similares en ausencia de ancestros en común) (Kriegs *et al.*, 2006). En contraste, los elementos retrotransponibles se integran al azar dentro de los genomas, con posibilidades remotas de que un mismo elemento se integre independientemente en posiciones ortólogas en diferentes especies. Por lo tanto, los análisis de presencia/ ausencia de estos elementos constituyen una estrategia superior para la Sistemática Molecular (Kriegs *et al.*, 2006).

La reciente aplicación de esta herramienta al orden Rodentia, condujo a la afirmación de que los roedores serían un grupo monofilético incluyendo al cuestionado cobayo, que mostró compartir con el resto de los roedores siete inserciones de elementos retrotransponibles en posiciones ortólogas de su genoma (Churakov *et al.*, 2010). Más aún, dichos elementos transponibles correspondían a secuencias repetidas cortas intercaladas en el genoma (SINEs) del tipo ID (“Identifier”), las cuales son característica excluyente de los roedores, no estando presentes en genomas de otros mamíferos, como lagomorfos y primates (Martignetti *et al.*, 1993, y referencias incluídas). Según Churakov y colaboradores, su trabajo constituye una fuerte evidencia a favor de la clasificación del cobayo como roedor.

De todos modos, queda por ver si en los próximos años el eventual desarrollo y aplicación de nuevas herramientas moleculares en Sistemática continuará apoyando este concepto.

## II. OBJETIVOS

### II.1. Objetivo general

---

El objetivo general del proyecto desarrollado consistió en profundizar en el conocimiento de la meiosis masculina del cobayo, en particular de su profase meiótica temprana (L/Z), y desarrollar nuevas herramientas metodológicas que permitan abordar su estudio y contestar interrogantes hasta ahora no resueltas en el área.

### II.2. Objetivos específicos

---

- Desarrollar un método de preparación de suspensiones celulares de testículo que lograra acortar los tiempos de procesamiento, contemplara la preservación de macromoléculas para estudios posteriores, y rindiera suspensiones celulares aptas para su análisis mediante CMF.
- Estudiar el establecimiento de la primera onda espermatogénica de *C. porcellus* mediante CMF.
- Comparar mediante CMF las poblaciones celulares testiculares presentes en adultos de rata, ratón y cobayo. Existía particular interés en comparar el aspecto en los perfiles citométricos de la población celular con contenido de ADN=4C (mayormente meiocitos), y las posibilidades de distinguir subpoblaciones meióticas (temprana vs. media/tardía) en estas tres especies.
- Purificar meiocitos cursando profase meiótica temprana (L/Z) en estado de alta pureza, a partir de cobayos maduros. La purificación de meiocitos tempranos como una fracción independiente de la de meiocitos paquiténicos, a partir de individuos maduros, y en cantidad y calidad suficientes para realizar estudios comparativos de expresión génica, representó uno de los objetivos específicos más ambiciosos del presente trabajo.

- Iniciar estudios de expresión génica diferencial que incluyeran meiocitos tempranos y meiocitos medios/avanzados, entre otros, para identificar secuencias génicas específicas de profase meiótica temprana en el cobayo.

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### III.1. Animales

---

Se utilizaron cobayos (*Cavia porcellus*) macho de la cepa Dunkin Hartley provenientes de Merial-Montevideo (Montevideo, Uruguay). Especímenes adultos jóvenes de 10-12 semanas de edad fueron usados como fuente de testículos maduros normales, mientras que el material testicular de prepúberes y púberes se obtuvo a partir de individuos de 3 a 45 días de edad. En los análisis por citometría de flujo (CMF) se utilizaron 10 especímenes adultos y 2-4 individuos juveniles para cada edad estudiada. Para la purificación de fracciones celulares con diversos fines, se utilizaron 13 individuos de 45 a 50 días de edad.

Para los análisis comparativos interespecíficos se usaron además ratones (*Mus musculus*) machos CD1-Swiss de 7 a 9 semanas de edad, y ratas (*Rattus norvegicus*) machos Sprague-Dawley de 8 a 10 semanas, provenientes del bioterio del IIBCE (8 a 10 individuos de cada especie). Cada experimento se realizó con material proveniente de un ejemplar a la vez.

Los animales fueron sacrificados mediante la administración de una sobredosis de pentobarbital sódico, siguiendo las recomendaciones de la Comisión Honoraria de Experimentación Animal (CHEA).

#### III.2. Preparación de suspensiones celulares de testículo

---

Las suspensiones celulares de testículo fueron preparadas a través de un método mecánico desarrollado en esta tesis (Rodríguez-Casuriaga *et al.*, 2009), y que se resume a continuación:

a) Los testículos fueron disecados en placas de Petri de vidrio conteniendo medio de separación frío [10% v/v SFB en DMEM (Gibco) conteniendo alta concentración de glucosa y L-glutamina], despojados de su túnica albugínea y cortados en trozos de aproximadamente 4 mm<sup>3</sup>.

b) 3 o 4 de estos trozos fueron inmediatamente colocados, junto con 1 ml de medio de separación frío, en un disgregador mecánico descartable "Medicon" [Becton Dickinson (BD), San José, CA, USA] provisto de una malla metálica con orificios de

50  $\mu\text{m}$  (“separator mesh”) y un molinillo metálico. Posteriormente, se procesó el material en el “Medimachine System” (BD) durante 50 seg.

c) Las suspensiones celulares resultantes fueron recuperadas utilizando jeringas descartables de 5 mL, luego filtradas a través de membranas de nylon de 50 y 25  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro, y ubicadas en hielo.

d) Las células fueron contadas en cámara de Neubauer y resuspendidas a una concentración de  $\sim 1 \times 10^7$  células/ml en medio de separación. Finalmente, se agregó NDA (sal dipotásica del 2-naftol-6,8-ácido disulfónico; Chemos GmbH, Regenstauf, Alemania) a una concentración final de 0.2% (w/v), con el fin de prevenir la formación de cúmulos celulares.

Por otro lado, en las etapas iniciales se realizaron también suspensiones celulares testiculares por el método tradicional desarrollado por Meistrich (1977) con algunas modificaciones (Geisinger, 2003). Brevemente, este método involucra la incubación con tripsina y colagenasa, así como el filtrado sucesivo por mallas de 300, 80 y 25  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro. Las suspensiones mediante este método se efectuaron con el objetivo de comparar los resultados con los obtenidos empleando la técnica descrita anteriormente, desarrollada durante este trabajo.

### **III.3. Estudios de viabilidad celular**

---

Se controló la viabilidad de las células en las suspensiones preparadas con el Medimachine empleando el *Live/Dead viability kit* para células animales (Molecular Probes, Eugene, OR), según instrucciones del fabricante. Este kit provee un método basado en fluorescencia de dos colores: a) verde, generada por la hidrólisis de la calceína AM en células vivas con actividad esterasa intracelular; y b) roja, generada por el homodímero-1 de etidio de alta afinidad por los ácidos nucleicos, y que sólo penetra en células muertas o con membrana plasmática dañada. De este modo, la fluorescencia verde es indicativa de células vivas, mientras que la roja sólo se presenta en las muertas o con membrana plasmática comprometida.

Adicionalmente, se utilizó el método de exclusión de Azul Trypan para determinar viabilidad celular, según procedimientos de tinción habituales y posterior

conteo de células viables (no teñidas) y no viables (teñidas) en cámara de Neubauer.

### III.4. Análisis y separación por citometría de flujo

---

#### III.4.a. Estudios en FACSVantage (BD)

---

Antes de comenzar los análisis de las suspensiones celulares (1 ml) en el citómetro de flujo, se agregó 50  $\mu$ l de solución stock de Ioduro de Propidio (IP, 1 mg/ml; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), dejándose en hielo durante aproximadamente 10 min. protegidas de la luz. Para los experimentos de clasificación celular o *sorting*, se utilizaron tiempos de tinción mayores ( $\geq 2$  horas) para lograr una mejor discriminación de las subpoblaciones 4C en cobayo.

Como tinción alternativa, se utilizó Vybrant Dye Cycle-Orange (Invitrogen) a una concentración final de 10  $\mu$ M durante 1 hora a temperatura ambiente y protegido de la luz.

En ambos casos, las células fueron posteriormente analizadas con un citómetro de flujo y clasificador celular FACSVantage (BD) equipado con un láser de argón con emisión a 488 nm (Coherent, Innova 304) y un sistema de enfriamiento por circulación de agua. La intensidad del láser fue fijada en 100 mW y la fluorescencia emitida por el IP colectada en FL2 utilizando un filtro de banda de 575/26. Se seleccionó una boquilla de 70  $\mu$ m para realizar las medidas citométricas en flujo [este tamaño de boquilla es apropiado para permitir el pasaje de los meiocitos I, de gran tamaño (Mays-Hoopers *et al.*, 1995)]. Se utilizaron partículas DNA QC (BD) para optimizar la detección de fluorescencia, chequear la linealidad del equipo y permitir la discriminación de dobletes. Se empleó el programa CELLQuest (BD) para el análisis de los siguientes parámetros: dispersión frontal o *forward scatter* (FSC-H), dispersión lateral o *side scatter* (SSC-H), área total del pulso o intensidad total de fluorescencia (FL2-A), y ancho del pulso o duración de la emisión para cada evento (FL2-W). Gráficos de puntos (*dot plots*) mostrando FL2-A vs tiempo fueron usados como control de la fluorescencia emitida durante el análisis de las muestras, y los dobletes se excluyeron del análisis usando *dot plots* con FL2-A vs FL2-W.

Con fines analíticos, las células testiculares dispersadas con el Medimachine y separadas en el FACSVantage, fueron depositadas sobre portaobjetos empleando el programa CloneCyt y la unidad de deposición ACDU. En las clasificaciones preparativas, la opción de *sorting* en tubo fue la elegida para recuperar las distintas poblaciones celulares de interés para posteriores estudios moleculares. Las regiones para *sorting* fueron determinadas en los *dot plots* FL2A/SSC-H. Las células fueron clasificadas a una velocidad de aproximadamente 800–1500 eventos/seg. El modo de *sorting* utilizado fue Normal-R, y se usó clasificación en grupos de 3 gotas.

Todos los estudios con FACSVantage se llevaron a cabo utilizando el equipo ubicado en el Servicio de Citometría de Flujo y Clasificación Celular (SECIF) del IIBCE.

#### **III.4.b. Estudios en MoFlo (DakoCytomation)**

---

En paralelo, se efectuaron estudios en un citómetro MoFlo (DakoCytomation) ubicado en el Institut Pasteur Montevideo. Básicamente, este equipo exhibiría dos ventajas frente al FACSVantage: a) se trata de un equipo de alto rendimiento o *performance*, por lo cual permite el procesamiento de mayor cantidad de material por unidad de tiempo, y b) posee un láser UV, que permite el uso de colorantes supravitales clásicamente utilizados.

En esta serie experimental se ensayó una tinción de ADN utilizando el colorante vital Hoechst 33342 (5 µg/ml, Sigma-Aldrich) incubando las suspensiones celulares con el fluorocromo durante 10 min. a 37°C y protegido de la luz. Para estos ensayos, las mediciones se realizaron en un citómetro MoFlo equipado con un láser de excitación UV (Innova 90C-6) operado a 25 mW de potencia, y una boquilla de 70 µm. Se utilizó el programa Summit v4.3 para los análisis de FSC-H, SSC-H, FL2-A y FL2-W. La linealidad del instrumento y la discriminación de dobletes fue controlada utilizando partículas DNA QC (BD) teñidas con Hoechst 33342.

### **III.5. Observación microscópica de células depuestas sobre portaobjetos**

---

Láminas conteniendo células depuestas durante la clasificación (ver III.4) fueron observadas utilizando un microscopio Zeiss Axioplan Mot 2, con equipo con epifluorescencia y filtros adecuados para la emisión roja del IP.

Alternativamente, las células fueron fijadas con PFA (1%) y teñidas con Giemsa (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) siguiendo métodos convencionales, y luego observadas en un microscopio Zeiss Photomicroscope II utilizando óptica de campo claro.

En otros casos, las células depuestas, sin fijar, se observaron directamente en el microscopio Zeiss Photomicroscope II bajo óptica de contraste de fases. En los casos de material clasificado en el MoFlo, las observaciones se realizaron en un microscopio invertido motorizado Olympus IX81 bajo óptica de contraste de fases.

### **III.6. Análisis citológico por microscopía óptica de material en cortes**

---

#### **III.6.a. Inclusión de tejido en resina epóxica**

---

Un trozo de aproximadamente 10 mm<sup>3</sup> de cada testículo a analizar fue fijado en una solución de glutaraldehído al 2,5% en buffer fosfato 0,1 M (pH 6,9), a 4° C durante 12 horas. Posteriormente, trabajando sobre hielo, la muestra fue cortada en trozos de unos 3 mm<sup>3</sup>, lavada (6x10 min.) en buffer fosfato 0,1 M (pH 6,9), post-fijada durante 1 hora en tetróxido de osmio al 1% en buffer fosfato 0,1 M (pH 6,9), y lavada nuevamente (3x10 min.) con buffer fosfato. Las muestras fueron deshidratadas en forma progresiva a temperatura ambiente utilizando concentraciones crecientes de etanol (25%: 15 min.; 50%: 30 min.; 75%: 30 min. y etanol absoluto: 30 min.) infiltrándose luego en Epon (Durcupan, Fluka) según el siguiente detalle: a) preparación de la muestra a través de 2 cambios de acetona absoluta de 30 min. cada uno; b) infiltración con concentraciones crecientes de Durcupan:acetona (1:3, 30 min.; 1:1, 30 min.; 3:1, 30 min. y 1:0, 1 hora). Finalmente, se formaron los bloques en moldes conteniendo las muestras y se dejaron secar en estufa a 65° durante 2,5 a 3 días.

### **III.6.b. Inclusión de células aisladas por FACS en resina epóxica**

---

Células de especial interés purificadas en el citómetro de flujo fueron centrifugadas a 1500 rpm durante 15 min. y resuspendidas en PBS conteniendo 12% BSA. Luego de una segunda centrifugación en iguales condiciones, se retiró casi totalmente la BSA, dejando un pequeño volumen en el cual se resuspendió el precipitado celular. Se agregó una gota de glutaraldehído al 25% para obtener un gel conteniendo las células a ser analizadas por microscopía. A partir de este punto, se procedió igual que lo descrito en III.6.a, continuando con el procesamiento del gel de idéntico modo a lo realizado con los trozos de tejido fijados con glutaraldehído.

### **III.6.c. Cortes semifinos**

---

A partir de los bloques resultantes, se obtuvieron cortes de 1  $\mu\text{m}$  de espesor mediante el uso de un ultramicrotomo Power Tome XL (Boeckeler Instruments). Los cortes fueron teñidos con una solución de azul de toluidina (1%) conteniendo tetraborato de sodio (1%), y examinados por MO en campo claro. El registro fotográfico se realizó usando un microscopio confocal Olympus FV300 equipado con una cámara digital DP70, y empleando el programa DPController v.1.1.1.65.

## **III.7. Inmunocitoquímica sobre células separadas por FACS**

---

### **III.7.a. Preparación de los esparcidos**

---

Las células separadas por citometría de flujo se centrifugaron a 2000 rpm durante 10 min. a 4°C y se resuspendieron en aproximadamente 40  $\mu\text{L}$  de PBS (140 mM NaCl, 1,9 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 8,9 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; pH 7,4) para obtener una concentración cercana a  $3 \cdot 10^7$  células/ml. Los esparcidos celulares fueron preparados según fuera descrito por de Boer *et al.* (2009) que implica: a) tratamiento con buffer hipotónico (30 mM TrisHCl pH 8,2, 17 mM citrato de sodio, 5 mM EDTA, 50 mM sacarosa, 5 mM DTT) por 30 min.; b) deposición sobre la esquina húmeda de un portaobjetos previamente sumergido en una solución fresca de paraformaldehído (PFA) [1% PFA, 0,15% Tritón-X100 (pH 9,2)]; c) dispersión lenta mediante

inclinación leve del portaobjeto para su fijación y posterior mantenimiento en cámara húmeda (2 horas); d) secado lento de las preparaciones a temperatura ambiente. Los portaobjetos resultantes fueron, o bien usados inmediatamente para procedimientos inmunocitoquímicos, o envueltos en papel aluminio y almacenados a  $-80^{\circ}\text{C}$  para su posterior uso.

### **III.7.b. Hibridación con anticuerpos**

---

Para la distinción de diferentes estadios meióticos en las células esparcidas, se empleó un anticuerpo producido en conejo contra la región Ct (región más conservada) de la proteína SYCP3 de ratón (Acris Antibodies, Herford, Alemania; 1:100) con el fin de evidenciar los elementos laterales de los CSs en las células meióticas. El protocolo incluyó los siguientes pasos:

- a) Los portaobjetos conteniendo los esparcidos se dejaron llegar a temperatura ambiente, y se realizaron lavados (3x5 min.) con PBS.
- b) Cada portaobjeto se cubrió con 500  $\mu\text{l}$  de solución de bloqueo [5% leche descremada en polvo, 5% suero fetal bovino, 0,01%  $\text{NaN}_3$ , 1mM PMSF (fenil metil sulfonil fluoruro; este último componente se agregó antes de usar a partir de una solución stock de PMSF 1mM en DMSO); pH 7,4], y se incubó durante 30 min. a temperatura ambiente en cámara húmeda. En todos los pasos en que fue utilizada esta solución de bloqueo, ésta se centrifugó, justo antes de su uso, durante 30 min. a 16.000g.
- c) Luego se preparó una dilución 1:100 del anticuerpo primario (ver arriba) en solución de bloqueo (100 $\mu\text{l}$ /portaobjeto) y se incubó durante 12 horas a  $4^{\circ}\text{C}$  en presencia de una mezcla de inhibidores de proteasas (Sigma P2714; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) y en cámara húmeda.
- d) Pasado el tiempo de incubación se realizaron lavados (3x5 min.) con PBS, y se repitió el bloqueo como en (b).
- e) Posteriormente, se incubó con un anticuerpo secundario anti-conejo conjugado a Cy2 (Millipore, Massachusetts, USA; 100 $\mu\text{l}$ /portaobjeto de una dilución 1:50 en solución de bloqueo), durante 30 min. a  $37^{\circ}\text{C}$  y en cámara húmeda protegida de la luz.
- f) A continuación, se realizaron lavados (3x5 min.) con PBS, seguidos por un enjuague en  $\text{H}_2\text{O}$  destilada y otro en buffer para FITC (150 mM NaCl, 50 mM  $\text{NaHCO}_3$ ; pH 9,5).

- g) Finalmente, se realizó el montaje y sellado de las preparaciones, que pueden conservarse a -20°C.

La conjugación del anticuerpo secundario a un fluorocromo (Cy2) permitió su análisis mediante microscopía de fluorescencia. Las imágenes se adquirieron en un microscopio confocal de fluorescencia Olympus FV300 equipado con una cámara digital DP70 y usando el programa Fluoview v. 4.3.

### **III.8. Extracciones de ARN total**

---

Durante las clasificaciones celulares para posterior extracción de ARN, se trabajó con material libre de ARNasas, ya sea estéril sin uso o previamente tratado con soluciones inhibitoras de ARNasas, apuntando a minimizar la degradación del mismo. Por ejemplo, las unidades Medicon de procesamiento de tejido, las membranas de nylon y, en ocasiones, tubos plásticos de FACSVantage a ser reutilizados, fueron tratados con 0,1 M NaOH 1 mM EDTA durante 5 min. y luego abundantemente enjuagados con H<sub>2</sub>O ultrapura tratada o.n. con dimetil-pirocarbonato (DMPC) al 0,1% y autoclavada posteriormente. Asimismo, la tubuladura del equipo FACSVantage involucrada en la toma y transporte de la muestra fue inicialmente desinfectada con hipoclorito de sodio, lavada a continuación en forma abundante con H<sub>2</sub>O ultrapura y PBS (1X) tratado con DMPC al 0,1%, estéril. Además, el medio de suspensión (DMEM + SFB al 10%) se esterilizó mediante filtración y el PBS (líquido de vaina del citómetro) mediante autoclavado. Las manipulaciones involucradas en la preparación de las suspensiones celulares se realizaron en cámara de flujo laminar de bioseguridad. Las células clasificadas fueron recogidas en tubos refrigerados conteniendo PBS (1X) tratado con DMPC al 0,1%, estéril.

Se realizaron varios procesamientos independientes de tejido en el Medimachine. En cada uno de ellos se procesó aproximadamente 0,25 g de tejido, equivalente a  $\sim 1 \times 10^7$  células testiculares. En cada jornada de clasificación se utilizaron entre 3 y 4 tubos de muestra (30 a 40 millones de células testiculares totales).

Las células clasificadas fueron centrifugadas (450-500g, 10 min.) a 4°C, lavadas con PBS tratado con DMPC al 0,1%, y nuevamente centrifugadas. Una vez descartados los sobrenadantes, los precipitados celulares fueron congelados en N<sub>2</sub>

líquido y almacenados a  $-80^{\circ}\text{C}$ , donde se conservaron hasta el momento de realizar las extracciones de ARN total. Para las extracciones se empleó el *Illustra RNAspin Mini RNA Isolation Kit* (General Electric, Buckinghamshire, UK), siguiendo las instrucciones del fabricante, y el ARN obtenido se resuspendió en  $\text{H}_2\text{O}$  libre de ARNasas. La elección de este kit fue motivada por haber sido especialmente diseñado para optimizar el rendimiento de las extracciones de ARN a partir de un número relativamente bajo de células ( $\leq 5 \times 10^6$ ). Cabe mencionar que este kit incluye un paso de tratamiento con ADNasa libre de ARNasa, lo cual resulta fundamental para evitar la contaminación con ADN, y, en consecuencia, la eventual posterior amplificación del mismo.

La cantidad y calidad de los ARNs obtenidos fueron controladas mediante lecturas de absorbancia en el espectrofotómetro de microvolúmenes *Nanodrop 2000* (ThermoScientific, Delaware, USA), y, complementariamente, corriendo una alícuota en geles de agarosa conteniendo bromuro de etidio (BrEt). En este caso, los geles se realizaron al 1% (w/v) en buffer TAE 1X (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM) estéril y, una vez fundida la agarosa, se adicionaron  $4 \mu\text{l}$  de un stock 10 mg/ml de BrEt cada 100 ml de agarosa. Los geles se corrieron a 130-150 V hasta la mitad del gel, y se observaron y fotografiaron de inmediato con el objeto de evitar la degradación del ARN.

### **III.9. Aplicación del *mRNA-differential display***

---

Los estudios de expresión génica estadio-específica se realizaron mediante la tecnología del *mRNA-differential display system* (GenHunter Corporation, Nashville, USA). Esta metodología consiste en: a) transcripción reversa de los ARNm provenientes de diferentes poblaciones celulares de interés, en paralelo (e.g. diferentes estadios espermatogénicos); b) amplificación por PCR (reacción en cadena de la polimerasa) utilizando un mismo juego de *primers* o iniciadores; c) despliegue en geles desnaturizantes de poliacrilamida de los fragmentos de transcritos reversos amplificados; y d) la identificación y recuperación de transcritos reversos parciales diferencialmente amplificados en una población con respecto a otra (bandas diferenciales).

### III.9.a. Preparación de las muestras

---

Se utilizó uno de los diez kits *RNAimage* (GenHunter Corporation, Nashville, USA) ofrecidos por el fabricante, cada uno de los cuales contiene un set de 8 *primers* arbitrarios diferentes y 3 *primers* poliT con una base de anclaje diferente (A, C ó G), todos conteniendo un sitio de restricción para la enzima HindIII en su extremo 5'. Este material permite 24 combinaciones posibles de pares de *primers* para realizar las amplificaciones comparativas de los transcritos reversos provenientes de las poblaciones celulares de interés: a) células 2C (conteniendo, entre otras, espermatogonias premeióticas); b) células 4C-R3 (meiocitos tempranos); y c) células 4C-R4 (meiocitos avanzados a tardíos). En total se ensayaron 11 combinaciones diferentes de *primers*: HT<sub>11</sub>G-AP1, HT<sub>11</sub>G-AP2, HT<sub>11</sub>G-AP3, HT<sub>11</sub>G-AP4, HT<sub>11</sub>G-AP5, HT<sub>11</sub>GAP6, HT<sub>11</sub>C-AP1, HT<sub>11</sub>C-AP3, HT<sub>11</sub>C-AP6, HT<sub>11</sub>C-AP7 y HT<sub>11</sub>C-AP8 del kit N°1 de *RNAimage*.

Se siguieron las instrucciones del fabricante para las reacciones de transcripción reversa (RT) y reacciones en cadena de la polimerasa (PCR), excepto por el aumento del volumen de reacción de RT que se usó para las reacciones de PCR (3,3 µL en lugar de 2 µL), motivado por datos empíricos previos de nuestro grupo. Todas las reacciones se realizaron por duplicado conjuntamente con un control negativo carente de transcriptasa reversa, al que se le efectuó la reacción de PCR en idénticas condiciones. El marcado de los fragmentos amplificados se realizó a través de la incorporación de α-[<sup>35</sup>S]-dATP (MP, Solon, OH) durante las reacciones de PCR, para su posterior puesta en evidencia mediante exposición autorradiográfica.

### III.9.b. Preparación del marcador de peso molecular

---

En todas las corridas electroforéticas ensayadas se incluyó como marcador de peso molecular una escalera de 100 pb [New England Biolabs (NEB), UK], la cual fue marcada radiactivamente utilizando el fragmento Klenow (Fermentas), según el siguiente protocolo:

a) Se estableció la siguiente mezcla de reacción:

Escalera de 100 pb (0,5 µg/µl)	1,32 µl (0,66 µg)
Buffer de Klenow (10X)	1,5 µl
Mezcla de dNTPs sin dATP (5mM c/u)	1,0 µl
H <sub>2</sub> O ultrapura estéril	9,98 µl
α-[ <sup>35</sup> S]-dATP (10 µCi/µl)	1,0 µl
Klenow (10 U/µl)	0,2 µl

b) Se incubó durante 20 min. a 37°C.

c) Luego se detuvo la reacción mediante incubación durante 10 min. a 75°C.

d) Posteriormente, al tubo de reacción (15 µl) se le agregaron 10 µl del buffer de carga provisto por el kit *RNAimage* (95% formamida, 10mM EDTA pH 8, xileno cianol 0,09%, azul de bromofenol 0,09%) y se almacenó a -20°C. Se utilizaron 2,5 µl de esta mezcla por gel.

### **III.9.c. Corridas electroforéticas en geles largos de poliacrilamida**

---

Los fragmentos resultantes de las reacciones de RT-PCR fueron desplegados mediante corridas electroforéticas en geles largos de poliacrilamida-urea. Los geles de 33 cm de largo x 18 cm de ancho y 0,4 mm de espesor fueron preparados con una solución de acrilamida-bisacrilamida al 6% conteniendo urea, según los procedimientos habituales (Sambrook *et al.*, 1989). Las corridas electroforéticas se realizaron a voltaje constante de 1700 V y 25 W de potencia, durante aproximadamente 2,5 hs (hasta que el xylene cyanol estuviera a unos 2 cm del borde inferior). Una vez culminada la corrida electroforética, los geles fueron levantados empleando papel secante y luego deshidratados a 80°C durante 1 hora en una secadora de vacío *Slab Dryer* modelo 483 (Biorad). Posteriormente, se pusieron a exponer con un film dentro de casete a -80°C durante al menos 7 días, luego de lo cual se procedió a su revelado, el que se efectuó por métodos convencionales.

### **III.10. Análisis de patrones de expresión diferencial. Selección de bandas a estudiar**

---

Los autorradiogramas resultantes de la exposición de los geles fueron escaneados en un equipo convencional y los archivos electrónicos resultantes fueron analizados mediante el programa ImageJ 1.44p Java 1.6.0\_20, utilizando la herramienta *Plot Profile* sobre transectas a lo largo de los carriles en comparación. Esta herramienta permite obtener un gráfico del perfil del carril, así como una salida numérica de los datos escaneados. Adicionalmente, se empleó la herramienta *Analyze Gels/ Plot lane* de mismo programa para contrastar los resultados informáticos con los del análisis visual primario.

Se consideraron diferenciales de un determinado estadio todas aquellas bandas con intensidad  $\geq 3X$ , en relación a la de los otros estadios, y que no aparecieran en los controles negativos sin RT. Fue necesario definir este criterio arbitrario, dado que gran parte de los transcritos reversos amplificados no muestran un patrón de presencia/ ausencia absoluta, sino marcadas diferencias de intensidad de banda (que pueden reflejar diferentes niveles de expresión génica).

Las bandas definidas de este modo como diferenciales fueron recortadas de los geles correspondientes tomando como referencia los autorradiogramas, y el ADN eluído siguiendo las recomendaciones del fabricante (GenHunter), para su posterior caracterización y estudio.

## IV. RESULTADOS

### IV.1. Desarrollo de un método ultra-rápido para la preparación de suspensiones celulares de testículo de roedores

---

Con el objetivo de desarrollar un método de preparación de suspensiones celulares de testículo que lograra acortar los tiempos de procesamiento, contemplara la preservación de macromoléculas para estudios posteriores, y rindiera suspensiones celulares aptas para su análisis mediante CMF, se realizaron ensayos de disgregación tisular utilizando un homogeneizador de tejidos: el *Medimachine* (BD). Como resultado de estos ensayos, se llegó a un protocolo final (detallado en *Materiales y Métodos*) que reunía las características buscadas:

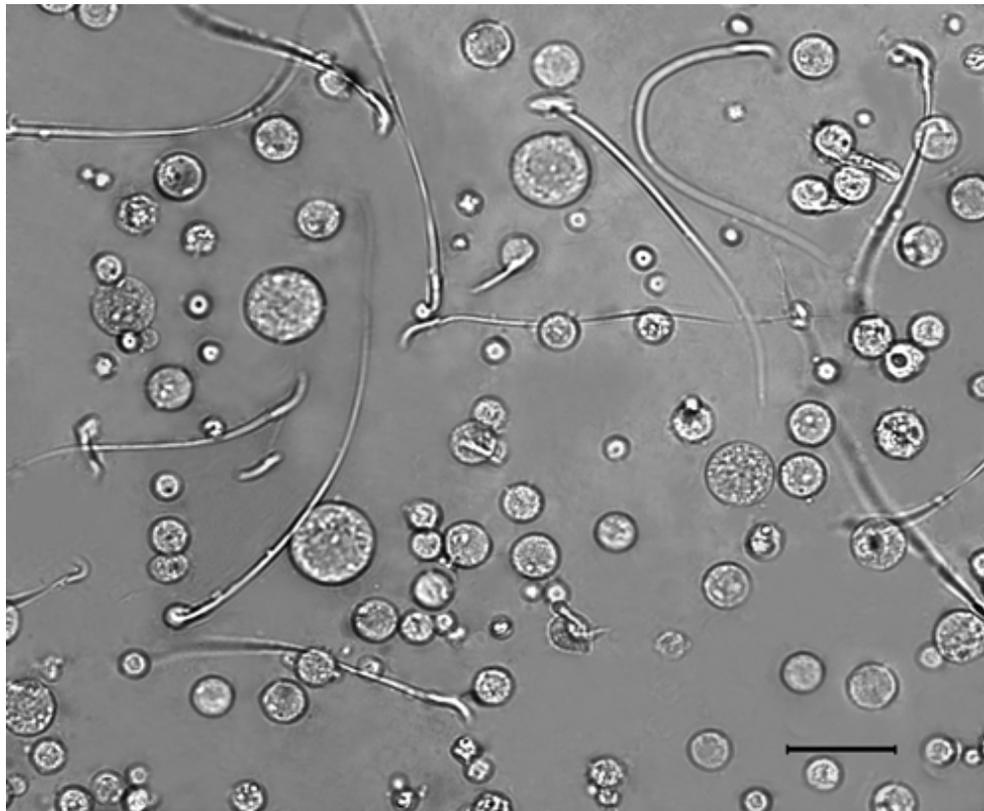
- Las suspensiones celulares de testículo preparadas usando el *Medimachine* fueron obtenidas en tan sólo 15 min., incluyendo la disección y decapsulación de testículos, el cortado del material y su procesamiento en el *Medimachine*. Esto representa aproximadamente 1/8 del tiempo usualmente invertido con el mismo fin cuando se aplican otros protocolos (e.g., Malkov et al., 1998). La brevedad del procedimiento era una de las características deseadas, ya que podría favorecer la preservación de las macromoléculas de vida corta (por ejemplo, algunos ARNm), lo cual resulta de crítica importancia cuando se requiere una muestra representativa de los componentes presentes en la población celular original.

- La viabilidad celular en las suspensiones preparadas con *Medimachine*, determinada tanto con el *Live/Dead kit* (Molecular Probes) como con la prueba de exclusión de Azul Trypan, superó el 85%. Este valor se consideró totalmente aceptable, dado que otros métodos mecánicos empleados en el pasado rindieron niveles de viabilidad menores o, a lo sumo, similares (Lam et al., 1970; Meistrich, 1972). Cuando se aplicó el *Live/Dead kit*, sólo un 8% de las células presentaba únicamente fluorescencia roja del homodímero-1 de etidio (muertas), mientras que el 92% restante era positivo para calceína, con emisión en el verde (vivas). Es interesante señalar que un subconjunto de las calceína-positivas presentó doble marcación, indicando que el homodímero-1 de etidio había logrado penetrar en esas células (ver *Discusión*) (ver *Anexos*, Fig. VIII.1).

---

- El aspecto al MO de las suspensiones celulares resultantes fue altamente satisfactorio, exhibiendo buena disgregación y una mínima cantidad de restos y cúmulos celulares (Fig. IV.1). Si bien se ha publicado que las suspensiones preparadas a través de métodos mecánicos forman cúmulos celulares con mayor facilidad que las tratadas con tripsina (Meistrich, 1977), el protocolo aplicado permitió obtener suspensiones celulares sin agregados en cantidad significativa en ausencia de acción enzimática. Además, el agregado de NDA (Meistrich, 1977) a la suspensión mostró ser muy útil, no solamente para evitar la formación de cúmulos celulares, sino también para evitar la obstrucción de la boquilla del citómetro durante los estudios en flujo. La buena calidad de la suspensión también fue puesta en evidencia en los perfiles citométricos, a juzgar por la mínima cantidad de desechos celulares observada en los gráficos para las tres especies analizadas. Obsérvese que tanto la tinción con elevadas concentraciones de IP, como con el colorante vital Hoechst 33342 fueron ensayadas sobre este material, obteniéndose resultados similares en relación con la escasa cantidad de desechos (Fig. IV.2).

---



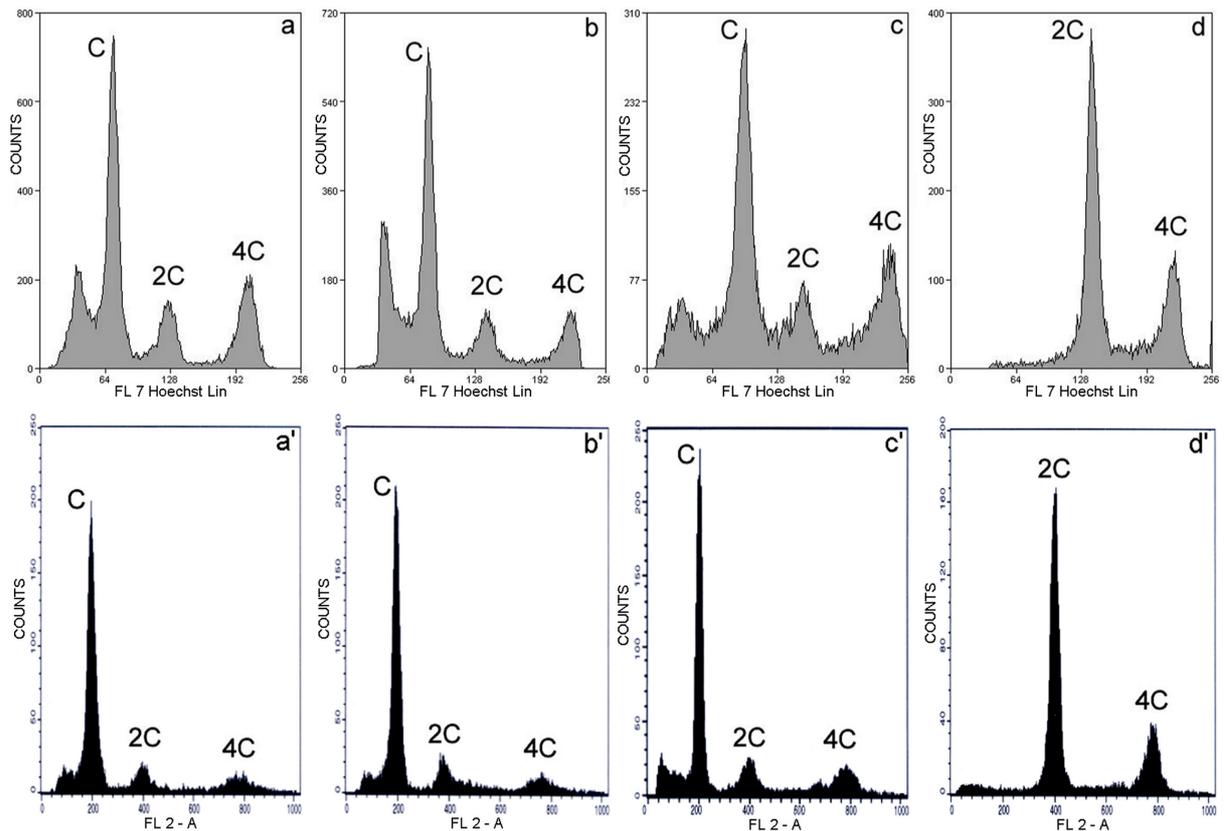
**Figura IV.1.-** Vista parcial de una suspensión celular de testículo de rata adulta. La suspensión fue preparada utilizando el Medimachine como se describe en *Materiales y Métodos*, y analizada por microscopía de contraste de fases. Puede observarse una gran

variedad de tamaños y formas celulares en buen estado de desagregación. Nótese que la mayoría de los espermatozoides mantiene su flagelo. Asimismo, resulta evidente la ausencia de multinucleados y la preservación de los citoplasmas celulares. La barra corresponde a 25  $\mu\text{m}$ .

---

- Se observaron muy pocos elementos multinucleados (Fig. IV.1). La naturaleza sincitial del epitelio seminífero favorece la formación de multinucleados, y éstos resultan contraproducentes al momento de diferenciar tipos celulares en base a su contenido de ADN y tamaño (por ejemplo, un multinucleado formado a partir de 4 espermátidas redondas, podría ser erróneamente clasificado como un meiocito) (Meistrich, 1977; Grogan *et al.*, 1981). Según Meistrich, aproximadamente 13% de las espermátidas redondas se detectan en forma de multinucleados tanto cuando las suspensiones celulares de testículo son preparadas mediante un método exclusivamente mecánico (Meistrich, 1972) como en presencia de tripsina (Meistrich *et al.*, 1973). Es probable que la escasa formación de multinucleados a través del nuevo protocolo aplicado se relacione con la escasa manipulación implicada en el mismo, ya que se ha afirmado en el pasado que la formación de multinucleados es principalmente una consecuencia de la manipulación del tejido (Meistrich, 1977).

- A diferencia de los métodos más comúnmente usados para la preparación de suspensiones celulares testiculares, el método empleado en esta tesis no involucró acción enzimática alguna. Las enzimas disgregadoras generalmente utilizadas son la tripsina y la colagenasa, las cuales contribuyen a una adecuada disgregación del tejido (Meistrich 1977), pero también pueden afectar la integridad celular y/o preservación de macromoléculas de interés. Por este motivo, optamos por excluirlas del protocolo, logrando igualmente una buena disgregación del tejido (Fig. IV.1). Del mismo modo, se prescindió del uso de ARNasas ya que existía particular interés en la preservación de los ARNm celulares para posteriores estudios de expresión génica.



**Figura IV.2.-** Análisis por CMF del contenido de ADN de suspensiones celulares de testículo preparadas a partir de especímenes adultos de rata (**a,a'**), ratón (**b,b'**), cobayo (**c,c'**), y ratas juveniles de 21 días (**d,d'**) teñidas con IP (**a-d**), o con el colorante vital Hoechst 33342 (**a'-d'**). Las muestras teñidas con IP se analizaron en un citómetro FACS Advantage (láser argón-ión Innova 304 a 488 nm), y las teñidas con Hoechst 33342 fueron procesadas en un citómetro MoFlo (láser UV Innova 90C-6 a 260 nm). Para ambas tinciones los histogramas obtenidos para los adultos de las tres especies estudiadas muestran claramente 3 poblaciones celulares principales, según su contenido de ADN (C, 2C y 4C). Se ha reportado que el pico adicional que aparece a la izquierda del pico C corresponde a espermátidas en avanzado estado de elongación y espermatozoides condensados ya elongados (Malkov *et al.*, 1998). La naturaleza inmadura del testículo de rata de 21 dpp (**d,d'**) resulta evidente dada la ausencia del pico C. Nótese también la ausencia de desechos celulares significativos (usualmente ubicados contra el eje izquierdo de las ordenadas) en todos los gráficos.

- El método desarrollado no dañaría selectivamente ningún tipo celular. Los histogramas obtenidos del análisis mediante citometría de flujo de suspensiones celulares de testículo de ratas y ratones adultos preparadas por este método y teñidas con IP (Fig. IV.2a, IV.2b), no presentaron diferencias significativas con los perfiles citométricos provenientes del análisis de suspensiones similares obtenidas

con protocolos que combinan disgregación mecánica y enzimática (Malkov *et al.*, 1998). Es más, la tinción con otro colorante (Hoechst 33342) y su análisis en un equipo diferente (MoFlo) permitió, de todos modos, la obtención de perfiles citométricos similares (ver fig. IV.2). Estos resultados indican que el método aplicado no dañaría en forma selectiva ningún tipo celular. Reforzando este concepto, cuando la composición celular de suspensiones testiculares de cobayo adulto teñidas con IP fue analizada por citometría de flujo (Fig. IV.2c), se observó que existía una amplia coincidencia con los porcentajes relativos previamente determinados en adultos de esta especie a través de conteos celulares en cortes transversales de túbulos seminíferos (Rodríguez y Wettstein, 2004) (Tabla IV.1). La misma situación fue encontrada para suspensiones de células testiculares de ratón adulto, sobre el cual también existían publicados datos porcentuales provenientes de conteos al MO sobre cortes (Meistrich *et al.*, 1973).

- Cuando el método fue aplicado al análisis de la composición celular de testículos inmaduros, los resultados también fueron concordantes con estudios citométricos anteriores. A modo de ejemplo, los porcentajes relativos obtenidos por nuestro método para las subpoblaciones testiculares con diferente contenido de ADN (C, 2C y 4C) en ratas de 21 días fueron 0%, 65%, y 24%, respectivamente (Fig. IV.2.d), mientras que Malkov y colaboradores (1998) reportaron 0%, 77% y 19% para ratas de 20 días, y 0%, 48% y 47% para ratas de 22 días. Por lo tanto, se hallaron valores porcentuales intermedios para una etapa de desarrollo intermedia, indicando una vez más que el método desarrollado no dañaría selectivamente ningún tipo celular.

**Tabla IV.1.-** Comparación de datos obtenidos a través de dos enfoques metodológicos diferentes, en relación a los porcentajes relativos de poblaciones celulares de testículo de cobayo y ratón adulto con diferente contenido de ADN. C, 2C y 4C se refieren al contenido de ADN. Los datos por conteo en túbulos provienen de Rodríguez y Wettstein (2004) para *C. porcellus*, y de Meistrich *et al.* (1973) en el caso de *M. musculus*.

Conteo en cortes transversales de túbulos seminíferos	Conteo por citometría de flujo
<b><i>C. porcellus</i></b>	
C = 66,5 %	C = 65,5%
2C = 11,0 %	2C = 11,5%
4C = 22,5 %	4C = 23,0%
<b><i>M. musculus</i></b>	
C = 66,2 %	C = 62,5 %
2C = 16,4 %	2C = 18,4 %
4C = 17,9 %	4C = 18,7 %

- El protocolo desarrollado mostró ser fácilmente reproducible. Como puede apreciarse en la tabla IV.2, las suspensiones celulares testiculares preparadas a partir de varios especímenes adultos de rata en forma independiente exhibieron porcentajes relativos de las poblaciones celulares C, 2C y 4C muy similares. La mínima manipulación que implica este método, a diferencia de otros, lo convierte en mínimamente dependiente del operador y favorece, en consecuencia, su reproducibilidad (ver *Discusión*).

**Tabla IV.2.-** Análisis de la reproducibilidad del método aplicado para la preparación de suspensiones celulares de testículo. Los datos corresponden a los porcentajes relativos de las poblaciones celulares C, 2C y 4C provenientes de 7 experimentos independientes realizados con testículos de ratas adultas (1 espécimen /experimento).

Especímenes ( <i>R.norvegicus</i> )	Contenido de ADN		
	C	2C	4C
1	72.0	12.0	16.0
2	76.0	11.0	13.0
3	75.0	13.0	12.0
4	76.0	11.0	13.0
5	72.0	12.0	16.0
6	71.5	15.0	13.5
7	73.0	13.0	14.0
<b>Promedio</b>	<b>73.6</b>	<b>12.4</b>	<b>14.0</b>
<b>DesvíoEstándar</b>	<b>2.0</b>	<b>1.4</b>	<b>1.5</b>

En resumen, el método desarrollado elimina pasos y tratamientos enzimáticos, minimiza la manipulación del material, y acorta sensiblemente los tiempos entre la disección testicular y la purificación de los estadios espermatogénicos de interés por clasificación en flujo, representando una interesante alternativa a otros métodos más extensos y complejos, como se discutirá más adelante. Probablemente, su desarrollo represente uno de los aportes técnicos de interés más general de la presente tesis (Rodríguez-Casuriaga *et al.*, 2009; ver *Discusión y Anexos VIII.4*).

## **IV.2. Estudios de la espermatogénesis del cobayo por citometría de flujo**

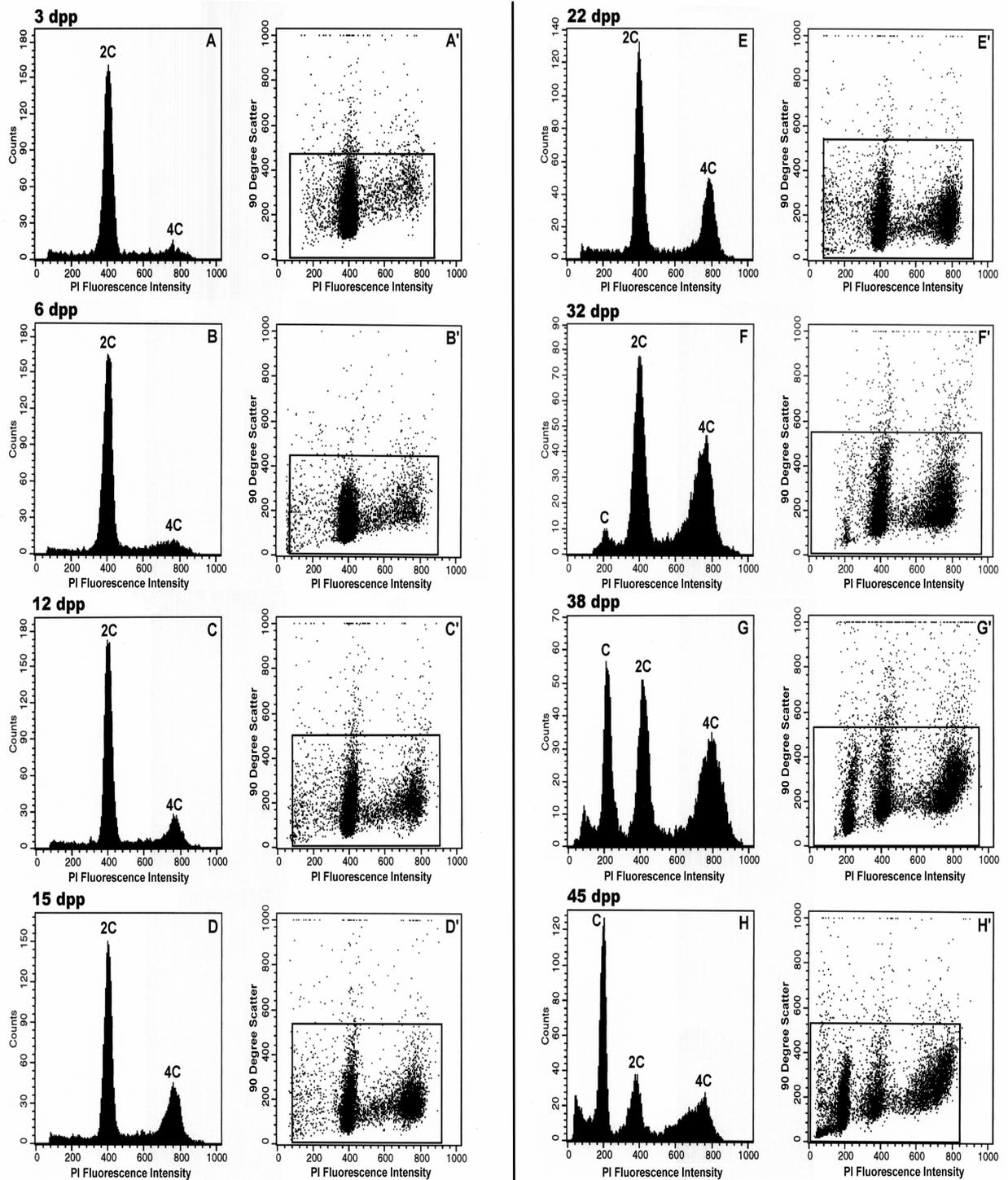
---

### **IV.2.a. Estudio del desarrollo postnatal de testículo de cobayo. Comparación del establecimiento de su primera onda espermatogénica con otros roedores.**

---

Con el fin de estudiar el establecimiento de la primera onda espermatogénica en *C. porcellus* y de compararla con la información disponible de rata y ratón, se utilizaron suspensiones celulares testiculares de especímenes inmaduros de entre 3 y 45 días posparto (dpp). Las mismas fueron analizadas mediante citometría de flujo (CMF) luego de exponerlas durante 10 min. a IP. Los análisis se realizaron a través de histogramas de FL2-A (fluorescencia de IP) y *dot plots* mostrando FL2-A vs. SSC-H (Fig. IV.3). Si bien en un principio se hicieron estudios comparativos entre el FACSVantage y el MoFlo, se optó por el uso de IP y del equipo FACSVantage para estos estudios, ya que en él se logró una muy buena linealidad ( $2.0 \pm 0,05$ ) en comparación con la obtenida en el MoFlo ( $\sim 1,6$ ) (ver Fig. IV.2).

A medida que la espermatogénesis avanza, ocurren variaciones en el contenido de ADN de las células testiculares (ver Fig. IV.3). Durante los primeros días después del nacimiento, los individuos juveniles poseen en sus testículos una amplia mayoría de células 2C (mayormente células de Sertoli, Leydig, y espermatogonias) y unas pocas células 4C correspondientes a espermatogonias y células somáticas en división mitótica (Culty, 2009) cursando la etapa G2 (Fig. IV.3A-A', 3 dpp). El inicio de la meiosis se ve reflejado en un incremento en la proporción de población celular 4C (Fig. IV.3B-B', 6 dpp), que continúa luego aumentando a medida que progresa la profase I (Fig. IV.3C-C', 12 dpp; IV.3D-D', 15 dpp; IV.3E-E', 22 dpp). De similar modo, el comienzo de la espermiogénesis se encuentra señalado por la aparición de las primeras células C (Fig. IV.3F-F', 32 dpp), y el aumento en la proporción de células C se correlaciona con la presencia de estadios haploides más tardíos (Fig. IV.3G-G', 38 dpp; IV.3H-H', 45 dpp) (Rodríguez-Casuriaga *et al.*, 2011).

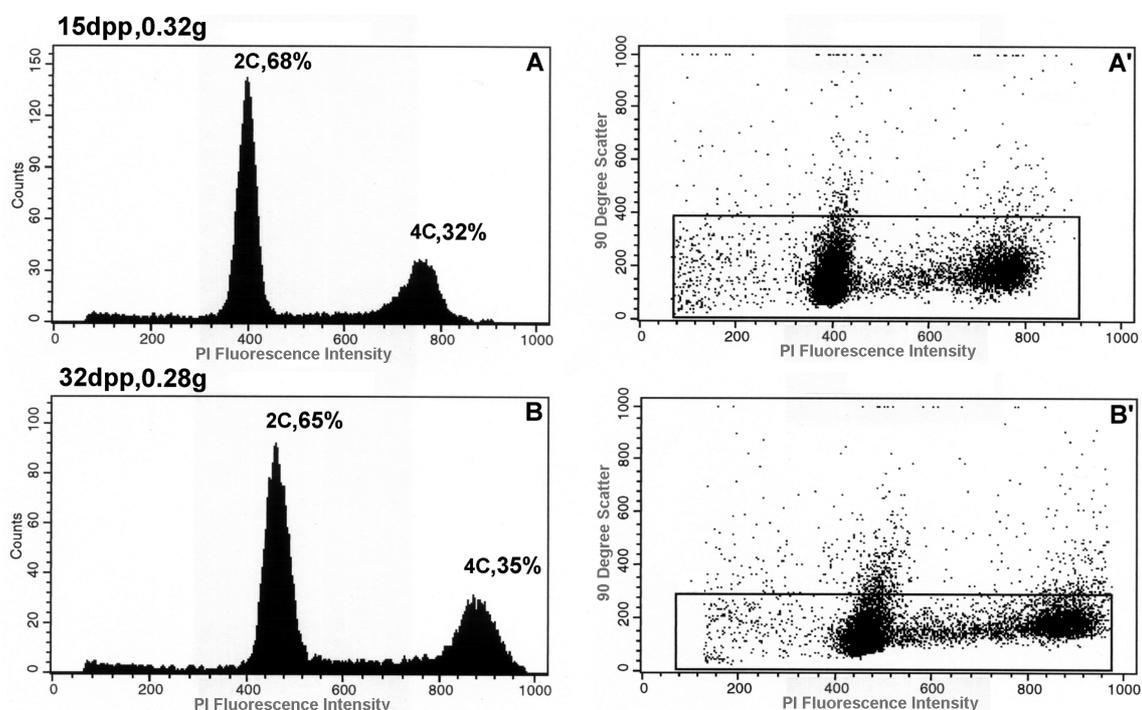


**Fig. IV.3.-** Avance de la espermatogénesis durante el desarrollo postnatal del testículo de cobayo seguido por CMF. Las adquisiciones mostradas fueron realizadas luego de 10 min. de exposición a IP. Las edades de los especímenes están expresadas en días (dpp). **A-H**, histogramas de intensidad de fluorescencia de IP. **A'-H'**, *dot plots* mostrando dispersión lateral (*SSC-H* o *90° scatter*) vs intensidad de fluorescencia de IP, en los que cada punto corresponde a una célula. El progreso de la espermatogénesis puede visualizarse a través de las variaciones en las poblaciones C, 2C y 4C en los especímenes en maduración. Obsérvese el aumento en la frecuencia de células 4C a medida que avanza la meiosis (6 a

32 dpp). Del mismo modo, el inicio de la espermiogénesis a los 32 días luego del nacimiento queda marcado por la aparición de las primeras células C. (**F, F'**). Los pesos testiculares de los individuos mostrados en los gráficos fueron los siguientes: **A**, 0.08 g; **B**, 0.13 g; **C**, 0.26 g; **D**, 0.32 g; **E**, 0.45 g; **F**, 0.52 g; **G**, 0.65 g; **H**, 0.75 g.

---

Asimismo, se pudo confirmar mediante citometría de flujo la existencia en esta especie de una correspondencia directa entre el peso testicular del espécimen y la progresión de la espermatogénesis (Fig. IV.4), dato previamente sugerido a partir de observaciones microscópicas (Rodríguez y Wettstein, 2004). La similitud entre los perfiles citométricos resultantes del análisis de individuos con edades muy disímiles (15 y 32 dpp) pero presentando tamaños testiculares semejantes, es notoria.



**Fig. IV.4.-** Análisis por CMF de una suspensión celular testicular de un cobayo de 15 días de edad (**A,A'**) y de otro de 32 días llamativamente pequeño para su edad (**B, B'**). Ambos especímenes presentaron pesos testiculares similares (0.32 y 0.28 g, respectivamente). Los porcentajes relativos de las poblaciones celulares testiculares 4C y 2C están indicadas en los histogramas. La similitud entre los perfiles citométricos a pesar de la diferencia de edad, resulta evidente.

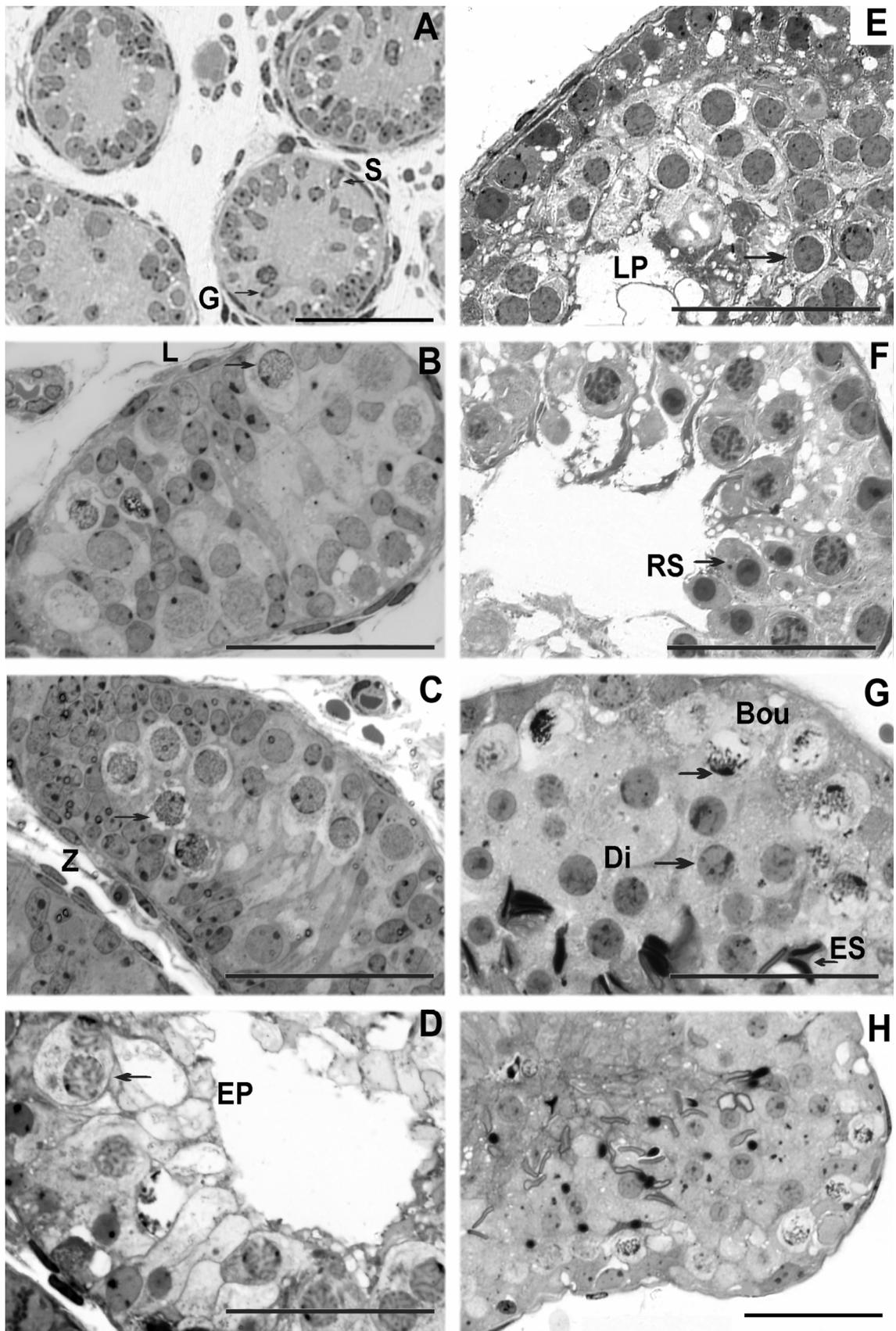
---

Los resultados obtenidos por CMF en cobayos juveniles fueron verificados por observación al microscopio óptico, mediante el control paralelo de la morfología celular en secciones transversales de túbulos seminíferos sobre cortes semifinos de

material incluido en Epon (ver *Materiales y métodos*). Se encontró que la información citomorfológica se correlacionaba satisfactoriamente con la obtenida a partir de los perfiles de citometría de flujo, en relación a la aparición de los diferentes tipos celulares (Fig. IV.5) (Rodríguez-Casuriaga *et al.*, 2011).

Los porcentajes de células con diferentes contenidos de ADN (valor C) fueron monitoreados en los cobayos juveniles de diferentes edades, como forma de seguir el patrón de adquisición de células germinales en maduración durante el desarrollo testicular postnatal en esta especie. En la tabla IV.3A se resumen estos resultados y se los compara con datos equivalentes publicados sobre rata y ratón (Malkov *et al.*, 1998). Como puede observarse, se halló una buena correlación entre las variaciones relativas de células testiculares con diferente valor C y los principales estadios de desarrollo para las 3 especies incluidas en la tabla, excepto en cobayos púberes en los cuales el contenido testicular de células 4C (30%) es notablemente superior a los observados en púberes de rata y ratón (16.3% and 12.5%, respectivamente).

Cuando se consideraron las relaciones 4C/2C y C/2C para evaluar el avance de la espermatogénesis, se detectaron también diferencias para *C. porcellus*, presentando una relación 4C/2C al comienzo de la meiosis (0,06) que duplica la observada para rata y ratón en la misma etapa de desarrollo (0,03; calculado de Malkov *et al.*, 1998).



**Figure IV.5.- A-H:** Cortes transversales de cordones y túbulos seminíferos de cobayos inmaduros de diferentes edades, analizados al MO El material testicular proveniente de animales de diferentes edades fue incluido en resina epóxica, cortado en ultramicrotomo y teñido (ver *Materiales y Métodos*). El material proviene de los mismos especímenes

juveniles analizados mediante CMF (Fig.IV.3) con las siguientes edades y pesos testiculares: **A**, 3 dpp/ 0.08 g; **B**, 6 dpp/ 0.13 g; **C**, 12 dpp/ 0.26 g; **D**, 15 dpp/ 0.32 g; **E**, 22 dpp/ 0.45 g; **F**, 32 dpp/ 0.52 g; **G**, 38 dpp/ 0.65 g; **H**, 45 dpp/ 0.75 g. Las flechas señalan los estadios/ tipos celulares destacados en cada caso: **S**, células de Sertoli; **G**, espermatogonia; **L**, leptoteno; **Z**, cigoteno; **EP**, paquiteno temprano; **LP**, paquiteno tardío; **Di**, diploteno; **RS**, espermátidas redondas; **ES**, espermátidas elongadas; **Bou**, *bouquet* cromosómico. Las barras corresponden a 50  $\mu$ m.

---

Si se considera el momento del inicio de la meiosis por un lado, y de la espermiogénesis por otro, es posible inferir la duración conjunta de ambas divisiones meióticas. La tabla IV.3B muestra datos sobre el esquema de desarrollo testicular postnatal (expresado en dpp) en diferentes especies de roedores. Un esquema significativamente diferente fue observado en cobayo, presentando una muy extensa meiosis (22-24 días) en comparación con rata y ratón (10-12 días; dato extraído de Malkov *et al*, 1998).

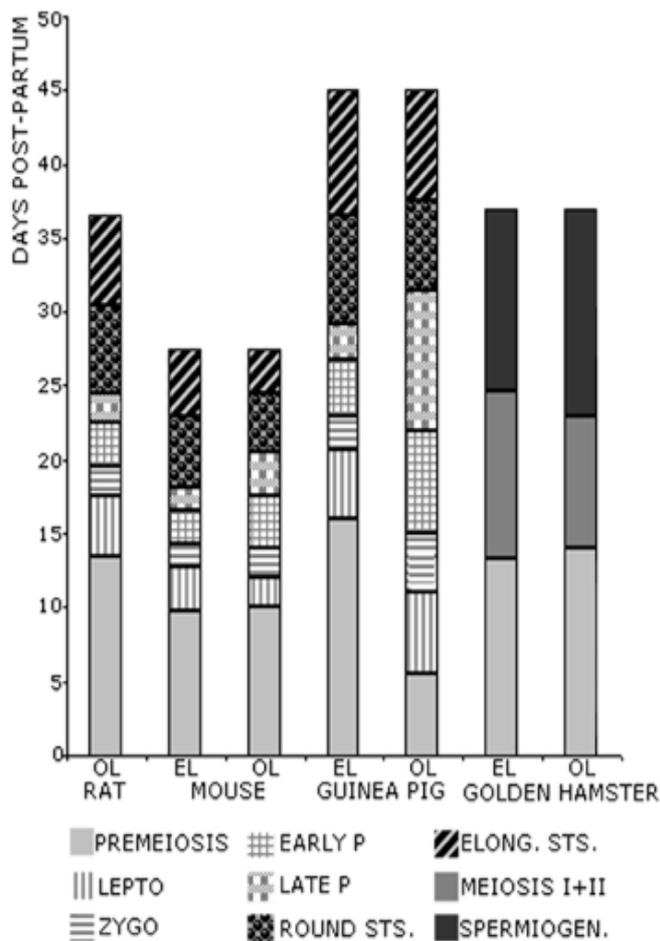
Dado que el tiempo en que se completa un ciclo del epitelio seminífero varía de una a otra especie, se comparó la duración porcentual de los diversos estadios durante la primera onda espermatogénica en diferentes especies de roedores. Tomando la primera onda espermatogénica de la rata como referencia, y asumiendo proporcionalidad, se compararon duración esperada vs. duración observada para las otras dos especies [*i.e.* ratón (Malkov *et al*, 1998) y cobayo]. La información disponible sobre *Mesocricetus auratus* (hámster dorado) también fue incluida en esta comparación (Golan *et al.*, 2000) (Fig. IV.6).

**Tabla IV.3.-** Comparación del establecimiento de la primera onda espermatogénica en *Rattus norvegicus* (*Rn*), *Mus musculus* (*Mm*), y *Cavia porcellus* (*Cp*). Los datos de rata (*Rn*) y ratón (*Mm*) provienen de Malkov *et al.*, 1998. A, Variaciones en porcentajes relativos de las poblaciones celulares testiculares con diferente contenido de ADN (C, 2C y 4C), a medida que avanza la primera onda espermatogénica. Se comparan los datos provenientes del análisis por CMF de juveniles de las tres especies. B, Comparación de esquemas temporales de desarrollo testicular para las tres especies nombradas. La duración conjunta de ambas duraciones meióticas también ha sido incluida en la comparación (gris).

Tipos celulares en el testículo	A									B			
	Porcentajes relativos									Estadio de desarrollo			
	C			2C			4C			Días post-parto			
	<i>Rn</i>	<i>Mm</i>	<i>Cp</i>	<i>Rn</i>	<i>Mm</i>	<i>Cp</i>	<i>Rn</i>	<i>Mm</i>	<i>Cp</i>	<i>Rn</i>	<i>Mm</i>	<i>Cp</i>	
Gonias y células somáticas (únicamente)	0	0	0	97	97	97	3	3	3	6-7	6-7	3	
Células en leptoteno (inicio de la meiosis)	0	0	0	97	97	94.3	3	3	5.7	13-14	10	5-6	
Células en cigoteno	0	0	0	93	93.5	91.6	7	6.5	8.4	17-18	12	10-12	
Aparición de células paquiténicas tempranas	0	0	0	80	84.5	80.7	20	15.5	19.3	19-20	14	15	
Aparición de células paquiténicas tardías	0	0	0	50.5	52.4	55	49.5	47.6	45	22-23	17-18	22	
Aparición de espermátidas redondas	2.1	7.3	4.8	51.6	44.8	44.2	46.3	47.9	51	24-25	20-21	31-32	
Aparición de espermátidas elongadas	31	24.2	24.7	34	36.8	33.8	35	39	41.5	30-31	24-25	37-38	
Aparición de espermatozoides	66.3	78	47.7	17.3	9.4	22.3	16.3	12.5	30	36-37	27-28	45	
<b>Duración de las divisiones meióticas I + II (días)</b>											<b>10-12</b>	<b>10-11</b>	<b>22-24</b>

En lo que respecta a la espermiogénesis, se detectaron diferencias menores entre los valores esperados y observados para todas las especies incluidas en la

comparación. Asimismo, cuando la duración de meiosis I+II fue analizada, en los casos de ratón y hámster dorado las diferencias entre lo esperado y lo observado no excedieron el 6-8%. Sin embargo, la duración porcentual de las divisiones meióticas observada en cobayo fue 58% del tiempo en que se completa la primera onda, duplicando, prácticamente, el valor esperado (30%) si su duración fuera proporcional a la de rata. Por lo tanto, independientemente de la duración en días del ciclo seminífero de la especie, las divisiones meióticas en *C. porcellus* se extienden durante más de la mitad de la primera onda espermatogénica. Además, un muy precoz inicio de la meiosis I resulta evidente en cobayo, al compararlo con las tres restantes especies analizadas. Este último aspecto pudo ser confirmado al MO, observándose la rápida aparición de meiocitos tempranos post-nacimiento, así como su lenta progresión a través de una peculiarmente extensa primera profase meiótica (ver fig. IV.5).



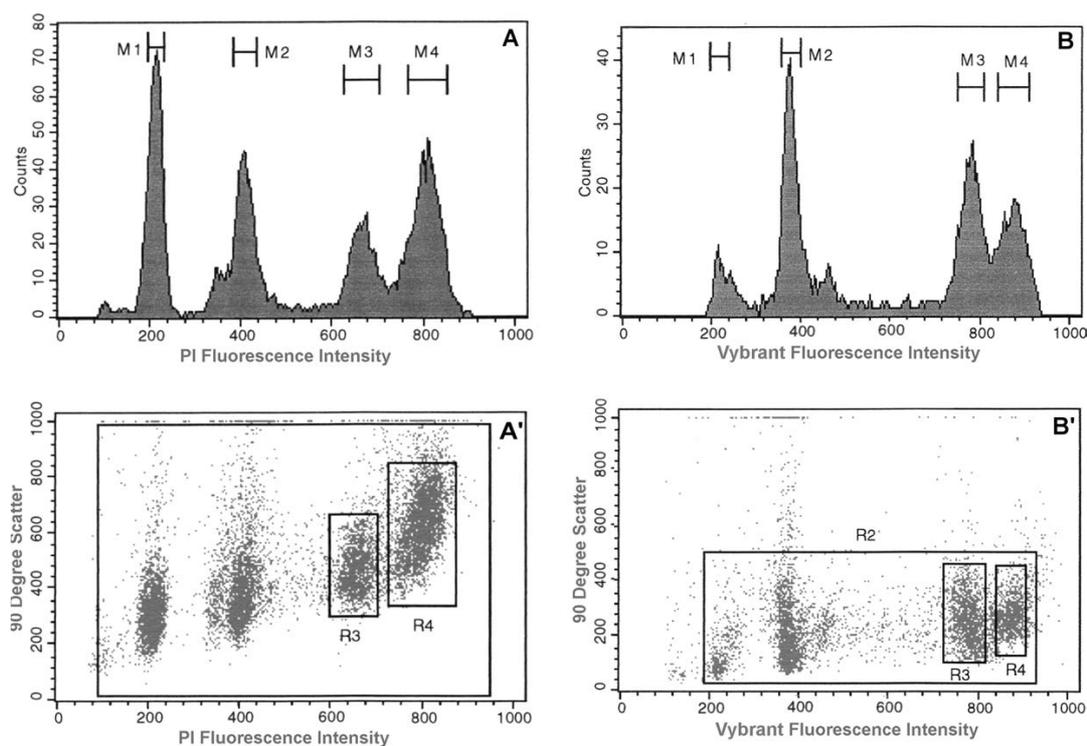
**Figura IV.6.-** Comparación de la duración porcentual de estadios espermatogénicos en diferentes especies de roedores. Tomando la primera onda espermatogénica de la rata como referencia, se calculó la duración porcentual esperada (EL) de diferentes estadios de interés en otras tres especies, asumiendo proporcionalidad a rata. Los valores calculados de

esta manera fueron luego comparados con los efectivamente observados (**OL**) en esas especies. Los datos de rata y ratón fueron extraídos de Malkov *et al.* (1998), mientras que los de hámster dorado provienen de Golan *et al.* (2000). En el caso de hámster, se muestran las tres grandes etapas de la espermatogénesis en forma no subdividida, por no disponerse de mayor información publicada. Nótese que *Cavia porcellus* (cobayo) es la especie con diferencias más notorias entre los valores esperados y los observados.

---

#### IV.2.b. Peculiaridades observadas en perfiles citométricos para suspensiones celulares testiculares de cobayos adultos.

La composición celular del testículo de especímenes jóvenes adultos de *C. porcellus* también fue analizada por CMF. Las adquisiciones de datos realizadas luego de 10 min. de exposición al IP rindieron histogramas similares al que se observa en la figura 3H, mostrando un pico 4C único y ancho. Sin embargo, cuando las mismas suspensiones celulares fueron incubadas en presencia de una elevada concentración de IP por aproximadamente 2 horas en hielo, en los histogramas se pudieron distinguir 2 subpoblaciones 4C claramente separadas (R3 y R4), mostrando diferentes niveles de fluorescencia de IP (Fig. IV.7A). En los gráficos de puntos de intensidad de fluorescencia vs dispersión lateral (SSC-H), R3 y R4 también aparecen claramente separadas, exhibiendo la población R4 una mayor intensidad de fluorescencia de IP y mayor complejidad interna que R3 (Fig. IV.7A') (Rodríguez-Casuriaga *et al.*, 2011).

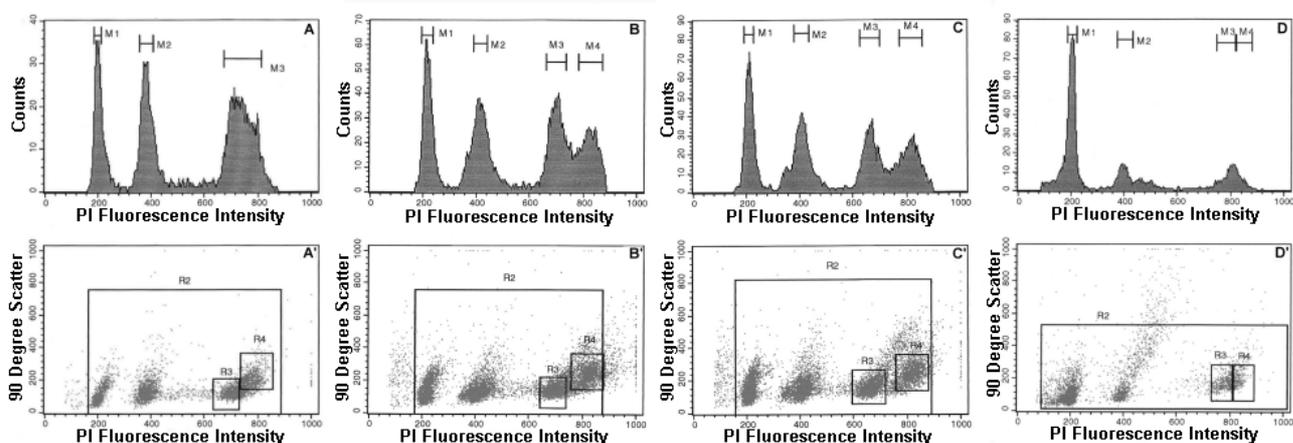


**Figura IV.7.-** Análisis por CMF de suspensiones celulares testiculares de cobayos de 50 días de edad teñidas con dos fluorocromos diferentes: **A, A'**, 2 horas de exposición a IP; **B, B'**, 1 hora de exposición a Vybrant DyeCycle Orange. Las poblaciones celulares **R3** y **R4** dentro de las células 4C son claramente distinguibles con ambos colorantes. Las diferentes proporciones entre las poblaciones C, 2C y 4C obtenidas con un colorante y otro, pueden explicarse por la marcada diferencia en pesos testiculares que presentaban los especímenes utilizados en los ensayos: 0,90g y 0,51g para las suspensiones teñidas con IP

y Vybrant, respectivamente. De hecho, las proporciones de C, 2C y 4C obtenidas para el cobayo de menor peso testicular (**B**, **B'**) recuerdan a las de un cobayo típico de 32 días de edad, cuyos testículos pesan aproximadamente 0,50g (ver Fig. IV.3F, F').

Dado que el IP es un colorante que puede intercalarse tanto en moléculas de ADN como de ARN de doble hebra (y el protocolo aplicado excluye el uso de ARNasas), se realizaron mediciones en el citómetro de flujo utilizando un colorante vital específico para el ADN (Vybrant Dye Cycle). Como puede observarse en la figura IV.7B, B', el patrón bimodal de la población 4C en cobayo pudo también ser claramente detectado con esta tinción, indicando que la presencia de los dos picos no se debe (o al menos no exclusivamente) a diferencias en el contenido de ARN entre ambas subpoblaciones (ver *Discusión*).

Resultó interesante poder comprobar, en el caso de tinción con IP, que la separación entre las dos poblaciones 4C de cobayo se acentuaba a mayor exposición al colorante (Fig. IV.8A-C, A'-C'). Este llamativo patrón de fluorescencia del IP obtenido en esta especie, no pudo reproducirse para material testicular de rata ni ratón, aún cuando se ensayaron tiempos muy prolongados de exposición al fluorocromo (Fig. IV.8D, D').



**Figura IV.8.- A-C y A'-C'**, Análisis por CMF de una suspensión celular de testículo de cobayo adulto, luego de diferentes tiempos de exposición a IP (10 min, 2 horas y 4 horas de tinción, respectivamente). Se observa una correlación positiva entre el tiempo de tinción y la separación de las regiones **R3** y **R4**, muy evidente a partir de las 2 horas de tinción en esta especie. **D, D'**, Análisis citométrico en flujo de una suspensión celular testicular de ratón adulto luego de 5 horas de exposición a IP, mostrando la imposibilidad de discriminar en esta especie las poblaciones **R3** y **R4**, aún luego de prolongadas exposiciones al colorante.

En este punto, nuestra hipótesis de trabajo pasó a ser que las células de la región R3 corresponderían a meiocitos tempranos (L/Z) mientras que las de la región R4 serían meiocitos medios a avanzados (P/D), y que su distinción en los perfiles citométricos era posible en cobayo dada la alta representación que tenían los estadios meióticos tempranos en esta especie.

Una observación, que en un principio resultó llamativa, fue que cuando se empleaban cobayos de 45-50 dpp, no todos los individuos analizados mostraban en sus perfiles citométricos una clara separación de R3 y R4, aún después de una extensa exposición al IP. Cuando se evaluaron los datos en conjunto, se observó que estas diferencias se vinculaban con variaciones significativas en los pesos testiculares de los individuos estudiados, obteniéndose una óptima distinción de subpicos con pesos testiculares de entre 0,6 y 0,9 g (Tabla IV.4). Para testículos de menor peso se observó, o bien un pico 4C único no subdividido (e.g. 0,3 g), o un pico 4C muy ancho que no llegaba a subdividirse claramente (0,4-0,5 g). A su vez, cuando se analizaron los perfiles citométricos conjuntamente con los componentes relativos de R3 y R4 dentro de 4C (basándonos en la hipótesis de que R3 correspondía a meiocitos tempranos cursando L/Z, y R4 a meiocitos medios a avanzados) se observó que cuando uno de ellos era ampliamente mayoritario, la distinción del segundo componente como un pico separado se tornaba dificultosa (e.g. para testículos de ~0,3 g, con R3=80% de 4C; datos provenientes de conteos sobre cortes de túbulos; Rodríguez y Wettstein, 2004). Sin embargo, para picos 4C con componentes relativos R3 y R4 no tan dispares (~40-60% cada uno), la distinción de los subpicos era evidente (ver *Anexos*, Fig. VIII.2).

El conjunto de los resultados obtenidos indicó que los individuos de 45-50 días de edad con un peso testicular  $\geq 0,6$ g (que acababan de completar la primera onda espermatogénica) eran los que exhibían una división de la población 4C en dos subpicos de tamaño más semejante (~40-60% cada uno; *Anexos*, Fig. VIII.2C). Individuos con un peso testicular menor no permitían una buena separación de ambos picos (*Anexos*, Fig. VIII.2A,B), en tanto individuos de edad o peso testicular mayor, presentaban ambos picos claramente divididos, pero el tamaño del pico R4 se volvía mayoritario en comparación con el de R3 (*Anexos*, Fig. VIII.2D).

**Tabla IV.4** – Influencia del peso testicular del espécimen sobre la distinción de las subpoblaciones celulares **R3** y **R4**. El peso testicular tiene una clara relación con el grado de avance de la primera onda espermatogénica (ver Fig.IV.4, por ejemplo; Rodríguez y Wettstein, 2004), y a su vez, éste influye sobre la composición porcentual relativa del epitelio seminífero. Los porcentajes de **R3** en relación a 4C incluidos en la tabla provienen de conteos sobre cortes transversales de material incluido en plástico (Rodríguez y Wettstein, 2004), y se enmarcan en la hipótesis de que las células de la región **R3** corresponderían a meiocitos L/Z.

<b>Especimen 45-50d</b>	<b>Peso corporal</b>	<b>Peso testicular</b>	<b>Distinción R3-R4</b>
1	290	0,35	No (~80% R3)
2	302	0,45	No (~70% R3)
3	341	0,60	Si
4	351	0,60	Si
5	358	0,47	No (~70% R3)
6	358	0,70	Si
7	389	0,72	Si
8	405	0,90	Si
9	406	0,87	Si
10	416	0,80	Si
11	422	0,77	Si
12	426	0,86	Si
13	476	0,90	Si

Más allá de la influencia indirecta del peso testicular del cobayo sobre el aspecto de la población 4C en histogramas y gráficos de puntos, las observaciones sobre el aporte relativo de R3 y R4 y su distinción dentro de la población 4C resultaron interesantes, y permitieron elaborar una posible interpretación sobre las diferencias interespecíficas detectadas en este aspecto (ver *Discusión*).

### IV.3. Clasificación y separación celular por citometría de flujo

---

#### IV.3.a. Puesta a punto de la clasificación celular de estadios espermatogénicos de roedores

---

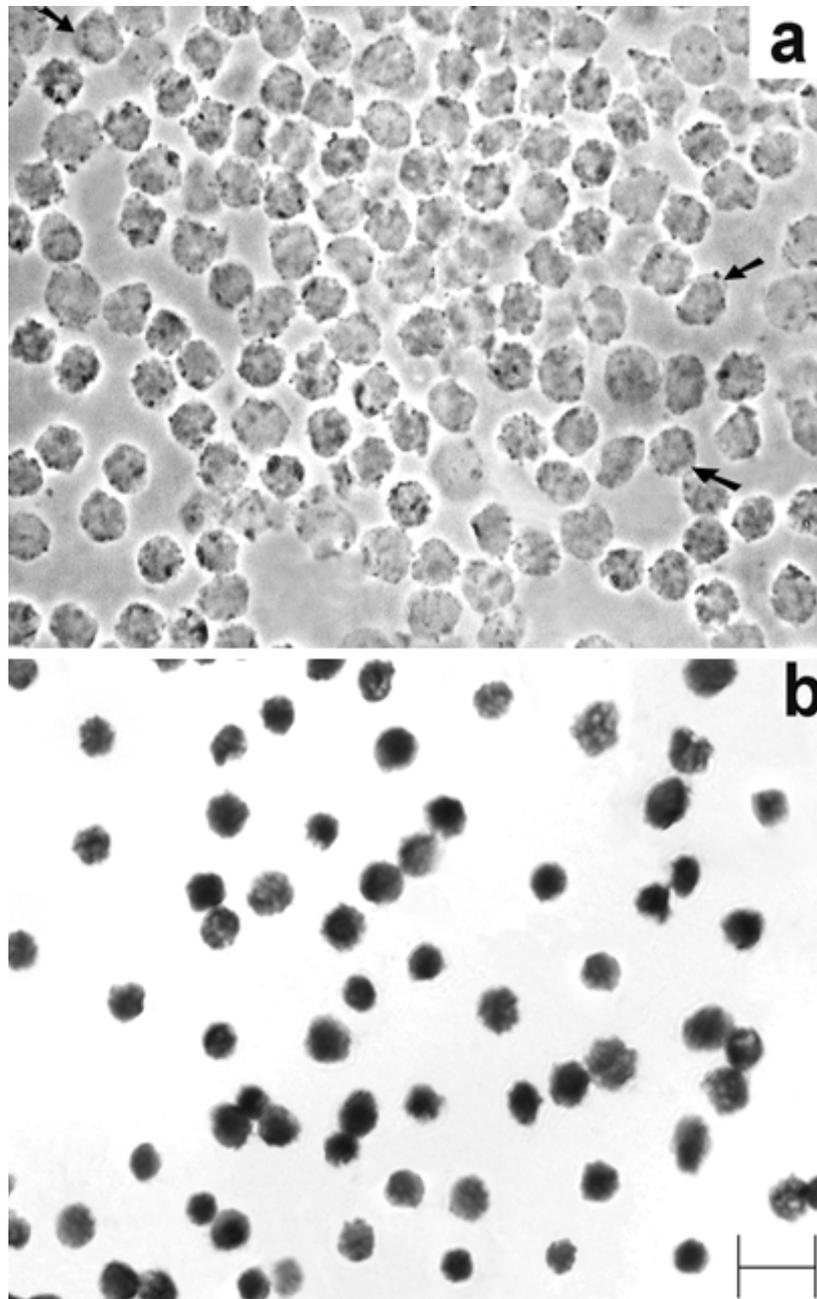
Una vez observado que los perfiles citométricos descritos para las poblaciones testiculares de rata y ratón (Malkov, 1998) eran perfectamente reproducibles en nuestras manos, y partiendo de material testicular procesado mediante la técnica descrita en IV.1, nos propusimos poner a punto la purificación de poblaciones celulares de testículo de roedores mediante citometría de flujo.

La purificación de células con contenido de ADN 4C fue ensayada tanto en el MoFlo, como en el FACSVantage. Para los ensayos en el MoFlo se utilizó tinción supravital con Hoechst 33342, y excitación con láser UV, mientras que en los ensayos en el FACSVantage las células fueron teñidas con IP y excitadas a 488 nm (ver *Materiales y Métodos*). A pesar de la gran capacidad clasificadora del MoFlo, los resultados obtenidos en el FACSVantage resultaron netamente superiores tanto en relación a la linealidad del equipo, como en la integridad de las células clasificadas.

Si bien la elevada velocidad de clasificación representa una significativa reducción en los tiempos de *sorting* y posibilita la clasificación de hasta 4 poblaciones celulares en simultáneo, los resultados de las clasificaciones en el MoFlo fueron desalentadores, ya que el aspecto de las células recuperadas no era el deseable, indicando un sufrimiento celular importante (datos no mostrados). En los citómetros de alta *performance* como éste, la muestra está sometida a presiones muy elevadas, y esto puede afectar la integridad celular.

Por otra parte, las clasificaciones efectuadas en el FACSVantage rindieron poblaciones celulares de aspecto sumamente homogéneo, y en las observaciones bajo óptica de contraste de fases, se pudo observar que las células clasificadas aún conservaban sus citoplasmas (Fig. IV.9). Esta observación resultó de vital importancia considerando las posteriores extracciones de ARN que se planeaban realizar. Con respecto a la pureza obtenida, los re-análisis de las células clasificadas rindieron, en general, resultados más que satisfactorios, con un 98-99% de pureza. En los casos en que se comprobó al MO algo de contaminación con células no deseadas, las células contaminantes fueron espermatozoides maduros, por lo cual

se concluyó que la elección de individuos con una baja proporción de los mismos favorecería la pureza de las células clasificadas.



**Figura IV.9.-** Aspecto al MO de la población de células testiculares de rata con contenido de ADN=4C, clasificadas en el FACSVantage. **a**, Células frescas (sin fijar ni teñir) observadas con microscopía de contraste de fases. Nótese la preservación de los citoplasmas (flechas). **b**, Células fijadas con PFA y teñidas con Giemsa, observadas en campo claro. Obsérvese la uniformidad en el tamaño y aspecto de los núcleos.

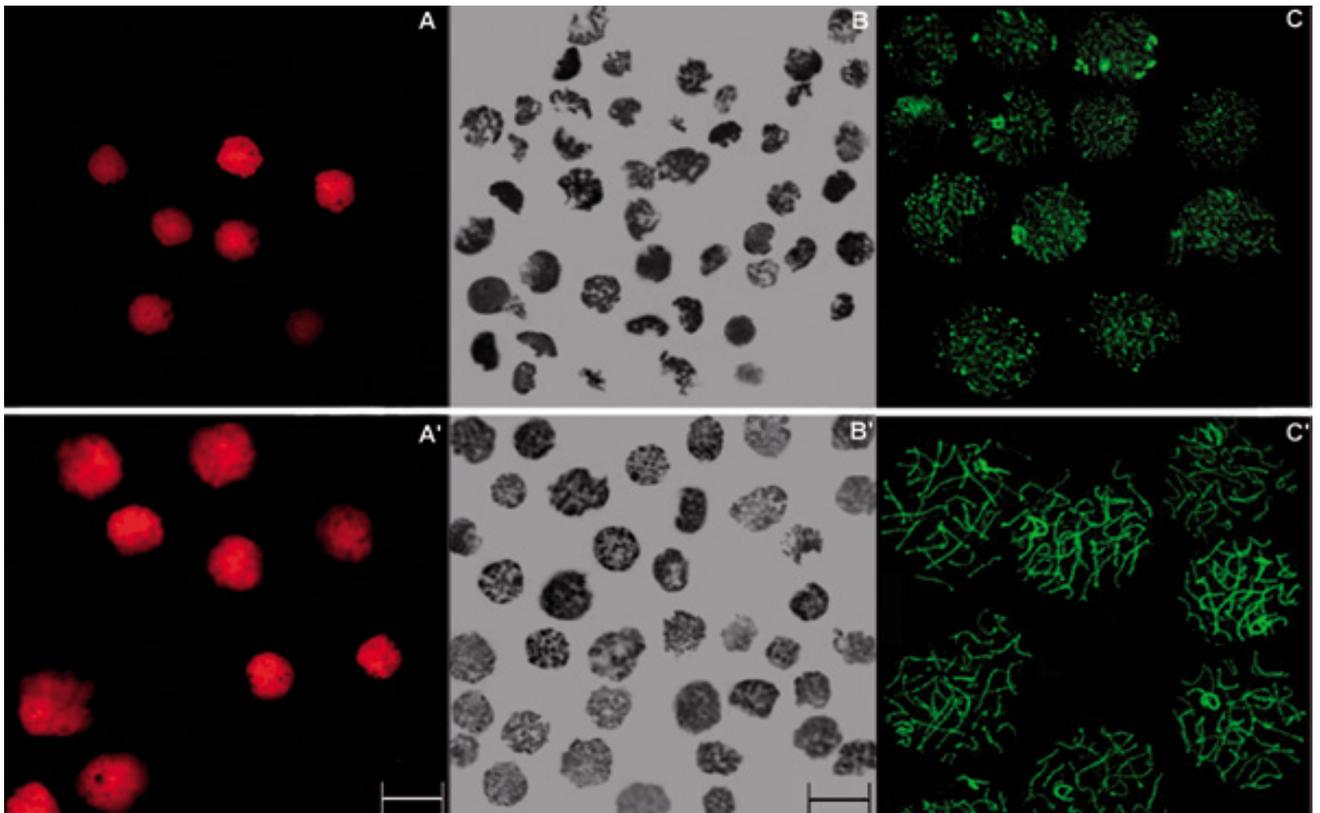
### IV.3.b.Purificación de subestadios de primera profase meiótica de *C. porcellus*

---

Habiendo constatado que podíamos separar poblaciones celulares de testículo de roedores con distinto contenido de ADN (*i.e.* 4C, 2C, C) en altísimo grado de pureza mediante citometría de flujo, nos preguntamos si seríamos capaces de purificar separadamente células de los picos R3 y R4 correspondientes a la población 4C de cobayo, de modo de indagar la identidad de dichas subpoblaciones. Si bien esta tarea era mucho más delicada dado que se trataba de células con igual contenido de ADN, ellas se separaban en dos subpoblaciones claramente identificables, presumiblemente por diferencias en los otros parámetros que el equipo toma en consideración, como el tamaño celular y la complejidad interna de las células (por ejemplo, en relación a la condensación y disposición diferencial de la cromatina).

Con este objetivo, células teñidas con IP y clasificadas por CMF pertenecientes a las regiones R3 y R4 de cobayo fueron analizadas al microscopio de epifluorescencia. Las diferencias observadas en relación a la diferencia de los tamaños nucleares sugirieron que las células provenientes de la región R3 podrían corresponder a meiocitos primarios tempranos (*i.e.* L, Z y P tempranos) (Fig. IV.10A), mientras que las contenidas en R4 (con núcleos promedialmente bastante mayores) estarían cursando profase media a tardía (P avanzado y D) (Fig. IV.10A').

Para confirmar esta hipótesis, las células clasificadas en flujo provenientes de las regiones R3 y R4 fueron incluídas en resina epóxica, seccionadas, teñidas con azul de toluidina y analizadas al microscopio óptico en campo claro. Los resultados de este análisis mostraron que los cortes del material proveniente de R3 contenían núcleos con configuraciones cromosómicas características de estadios muy tempranos de la profase I: L, Z, y algunos P tempranos (Fig. IV.10B), mientras que los de R4 correspondían a P avanzado/tardío y algunos D (Fig. IV.10B'). Se observaron con frecuencia configuraciones cromosómicas en *bouquet* (típicas de la transición L-Z) en los cortes semifinos de R3 (ver Fig. IV.10B), mientras que no se detectaron en las secciones de R4. Un tercer nivel de confirmación de la identidad de R3 y R4 pudo obtenerse a través de ensayos de inmunocitoquímica utilizando un anticuerpo anti-Sycp3, el cual, al detectar un componente de los elementos laterales del CS, permitió distinguir inequívocamente diferentes estadios meióticos bajo el microscopio láser confocal (Fig. IV.10C, C') (Rodríguez-Casuriaga *et al.*, 2011).



**Figura IV.10.-** Análisis microscópico de las células separadas de las regiones 4C **R3** (A,B,C) y **R4** (A',B',C') de una población testicular de *C. porcellus*. **A,A'**, Imágenes obtenidas al microscopio de epifluorescencia de las células purificadas, teñidas con IP. Los núcleos de las células provenientes de la región **R3** son comparativamente más pequeños. La barra corresponde a 10  $\mu$ m. **B,B'**, Análisis al MO (campo claro) en cortes semifinos de bloques de inclusión conteniendo las células separadas en flujo. Como puede observarse, la mayoría de los núcleos de las células de la región **R3** muestran sus cromosomas en configuración de *bouquet* (característica de la transición L/Z), mientras que las células de la región **R4** corresponden mayoritariamente a espermatocitos paquiténicos (P). La barra corresponde a 10  $\mu$ m. **C,C'**, Microscopía láser confocal de inmunomarcación de células dispersadas con un anticuerpo contra Sycp3 (proteína de complejo sinaptonémico 3, componente de los elementos laterales). La fracción **R3** corresponde a meiocitos tempranos (L/Z) en los cuales pueden verse ejes simples y cortos segmentos de CSs, mientras que **R4** contiene meiocitos más avanzados (P) con CSs totalmente ensamblados de un extremo cromosómico al otro.

Cuando las poblaciones celulares clasificadas fueron reanalizadas en el citómetro de flujo, se encontró que la pureza lograda para las fracciones R3 y R4 era del 98% y 97%, respectivamente, medida a 500 eventos/seg. en el modo Normal-R. Por otra parte, los datos de pureza provenientes de los conteos realizados sobre cortes de material incluido en Epon (por ej., fig. IV.10B,B') mostraron al menos un

94% de meiocitos tempranos para la fracción proveniente de la región R3 (la mayoría mostrando cromosomas dispuestos en *bouquet*), mientras que la proporción de meiocitos cursando profase I media a tardía (P y D) para la fracción R4 superó el 93%. Vale mencionar que la cantidad de figuras en *bouquet* de la subpoblación R3 está probablemente subestimada, ya que la visualización inequívoca de esta configuración en los cortes depende, en gran medida, de la orientación de cada célula en el bloque de inclusión y la latitud del corte (por ejemplo., los *bouquet* son difícilmente identificables en secciones polares).

#### **IV.4. Estudios de expresión génica estadio-específica durante la espermatogénesis de *C. porcellus***

---

##### **IV.4.a. Separación de células cursando diferentes estadios espermatogénicos por CMF y obtención de su ARN total**

---

Una vez confirmada la factibilidad de separar meiocitos cursando profase meiótica temprana (L/Z) de aquellos más avanzados (P/D), se procedió a hacer acopio del material necesario a ser utilizado en estudios comparativos de expresión génica. Asimismo, se purificó la fracción celular con contenido de ADN 2C, que si bien no corresponde a un único tipo celular, incluye una amplia mayoría de espermatogonias (premeiosis), cuyos perfiles de expresión génica resultan interesantes de incluir en la comparación.

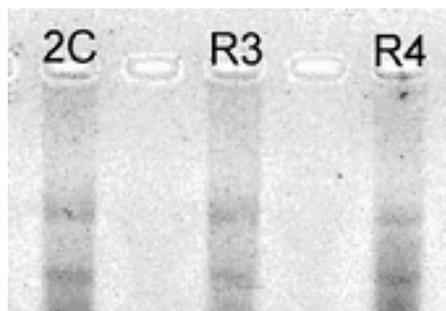
Las subpoblaciones R3 y R4 fueron separadas en paralelo a partir de especímenes adultos jóvenes de 45-50 días de edad, con primera onda espermática completa, y un peso testicular  $\geq 0,6$  g (ver tabla IV.4).

El material proveniente de cada individuo se procesó separadamente en días independientes de trabajo, dada la exhaustiva exposición al colorante requerida para la distinción inequívoca de R3 y R4 ( $\geq 2$  hs), y la abundancia del material testicular procesado en relación a la velocidad conveniente de clasificación ( $\leq 1000$  eventos/seg) para obtener poblaciones con alto grado de pureza.

En el caso de la tercera población celular a ser incluida en los estudios comparativos de expresión génica (2C), se usaron individuos de aproximadamente 45 días de edad, no siendo en este caso relevante la variación en el tamaño testicular.

Las extracciones de ARN total se realizaron utilizando un kit especialmente diseñado para optimizar la recuperación de ARN a partir de poco material ( $\leq 5 \times 10^6$  células), como se detalla en Materiales y Métodos. Las células de R3 y R4 utilizadas como fuente de ARN para el DD se obtuvieron mediante un total aproximado de 20 horas efectivas de *sorting*, en varias jornadas independientes de purificación. Se tuvo especial cuidado en realizar la clasificación a velocidad relativamente baja y marcando las ventanas de *sorting* de forma distanciada (dejando una zona de seguridad entre ellas), para evitar la contaminación cruzada de las fracciones separadas. Las cantidades de ARN obtenidas luego del tratamiento con ADNasa libre de ARNasa, fueron de 2  $\mu$ g para 2C, 1,5  $\mu$ g para R3 y 3,4  $\mu$ g para R4,

obteniéndose los siguientes rendimientos aproximados por tubo colectado: ~0,20  $\mu\text{g}$  a partir de 4C-R3; ~0,48  $\mu\text{g}$  a partir de 4C-R4; y ~0,60  $\mu\text{g}$  a partir de células 2C totales. La integridad de los ARNs fue evaluada en geles de agarosa como el que se muestra en la figura IV.11. Como puede observarse, la calidad de los ARNs obtenidos fue correcta a pesar del tiempo transcurrido entre la muerte del espécimen y la congelación de precipitados celulares en  $\text{N}_2$  líquido (unas 4-5 horas en el caso de R3 y R4 que requieren  $\geq 2$  horas de exposición al IP).



**Figura IV.11.-** Electroforesis en gel de agarosa teñido con BrEt, mostrando el aspecto de los ARNs totales extraídos de células **2C**, **R3** y **R4** de cobayo purificadas mediante citometría de flujo.

---

#### **IV.4.b. Aplicación del método de DD a las diferentes poblaciones celulares a comparar**

---

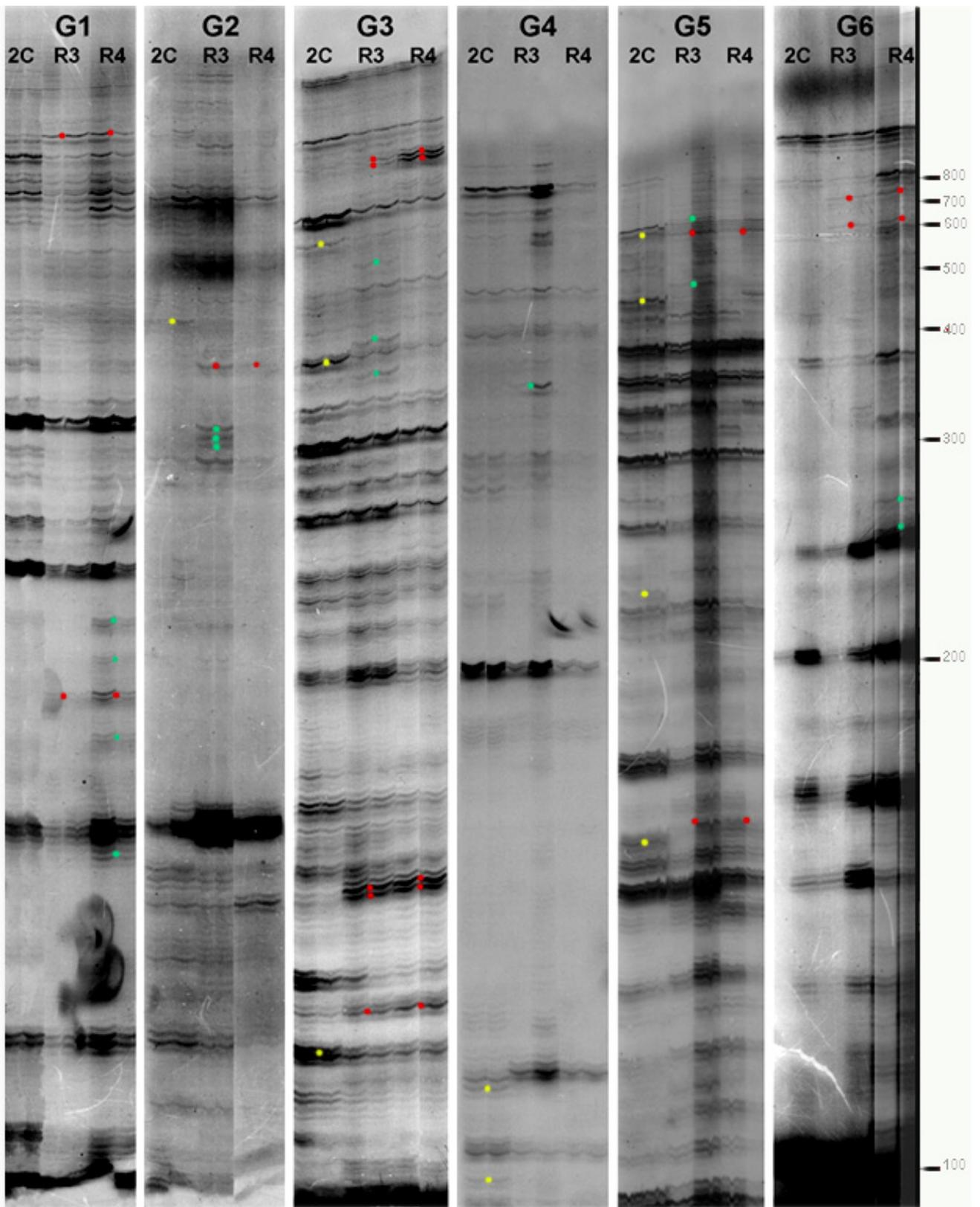
El ARN total obtenido de las células de interés purificadas por citometría de flujo (2C, R3 y R4) fue posteriormente utilizado en estudios comparativos de expresión génica. Para ello se hizo uso de la metodología de DD de ARN (Liang y Pardee, 1992), como se mencionó anteriormente, y empleando un kit comercial de la empresa GenHunter.

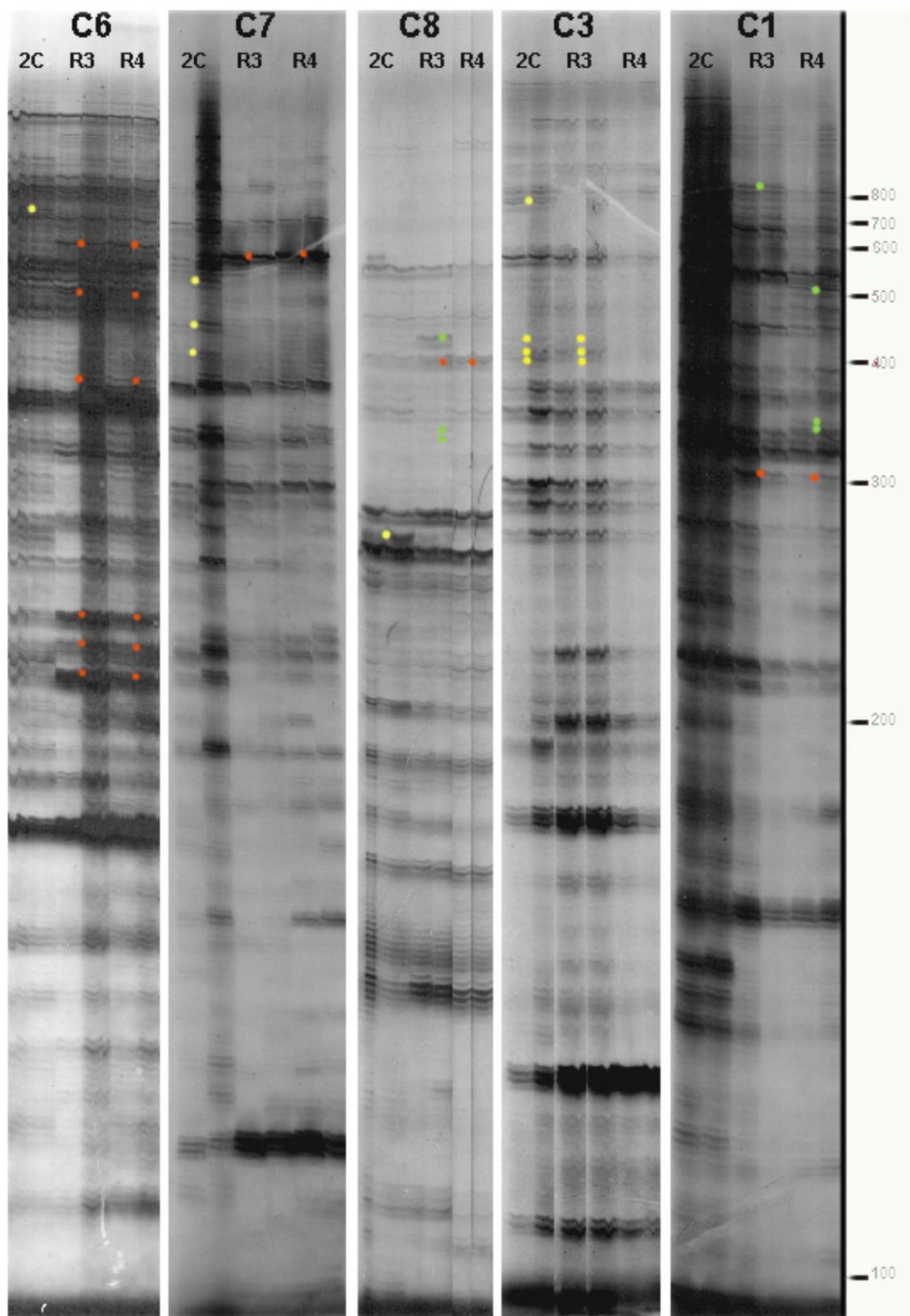
En total se ensayaron 11 combinaciones de iniciadores: 6 utilizando  $\text{HT}_{11}\text{G}$  y 5 usando  $\text{HT}_{11}\text{C}$ , combinadas 8 iniciadores de secuencia arbitraria (HAP-1 al 8) (ver *Materiales y Métodos*). Las figuras IV.12 y IV.13 muestran los resultados obtenidos durante estas amplificaciones, luego de haber sido desplegadas en geles y expuestas autorradiográficamente, como se detalla en *Materiales y Métodos*. Todas las amplificaciones (para cada combinación de iniciadores) se realizaron por duplicado para cada población celular, y se incluyeron los controles negativos correspondientes, sin RT.

Como puede apreciarse en las figuras IV.12 y IV.13, los resultados de estos estudios comparativos de expresión génica fueron, a primera vista, satisfactorios, habiéndose obtenido un significativo número de bandas totales, muchas de las cuales manifestaron ser diferenciales de una población celular con respecto a las otras. Si bien en las figuras se han marcado algunas de las bandas diferenciales a modo de ejemplo, el análisis completo cuantitativo de los fragmentos amplificados diferencialmente se encuentra en la siguiente sección (IV.4.c).

---

**Figura IV.12** (página siguiente) – DD de ARNm de poblaciones celulares **2C**, **R3** y **R4** empleando seis combinaciones de iniciadores diferentes, basadas en el iniciador oligo-dT HT<sub>11</sub>G y seis iniciadores de secuencia arbitraria de 13 nucleótidos de longitud. La combinación de iniciadores empleada en cada caso se indica en la parte superior: **G-1**, HT11G-HAP1; **G-2**, HT11G-HAP2; **G-3**, HT11G-HAP3; **G-4**, HT11G-HAP4; **G-5**, HT11G-HAP5; **G-6**, HT11G-HAP6. Todas las amplificaciones fueron realizadas por duplicado y corridas en paralelo, mostrándose para cada serie experimental dos primeros carriles correspondientes a la población **2C**, los dos siguientes que corresponden a **R3**, y los dos últimos a la población **R4**. A la derecha se indican los tamaños de bandas del marcador de peso molecular (escalera de 100 pb, New England Biolabs). A modo de ejemplo, se han señalado algunas bandas diferenciales de la población 2C (puntos amarillos), de una de las subpoblaciones 4C [R3 o R4 (puntos verdes)], o presentes tanto en R3 como en R4 (puntos rojos).





**Figura IV.13** (página anterior) - DD de ARNm de poblaciones celulares 2C, R3 y R4 empleando cinco combinaciones de iniciadores diferentes, basadas en el iniciador oligo-dT HT<sub>11</sub>C y cinco iniciadores de secuencia arbitraria de 13 nucleótidos de longitud. La combinación de iniciadores empleada en cada caso se indica en la parte superior: C-6, HT11C-HAP6; C-7, HT11C-HAP7; C-8, HT11C-HAP8; C-3, HT11C-HAP3; C-1, HT11C-HAP1. Todas las amplificaciones fueron realizadas por duplicado y corridas en paralelo, mostrándose para cada serie experimental dos primeros carriles correspondientes a la población **2C**, los dos siguientes que corresponden a **R3**, y los dos últimos a la población **R4**. A la derecha están indicados los tamaños de bandas del marcador de peso molecular (escalera de 100 pb, New England Biolabs). Los puntos de colores señalan algunas de las bandas diferenciales obtenidas para la población 2C y/o 2C/R3 (en amarillo), para una de las subpoblaciones 4C [R3 o R4 (en verde)], o presentes tanto en R3 como en R4 (en rojo).

---

#### **IV.4.c. Análisis de patrones de expresión diferencial**

---

Como se detalla en *Materiales y Métodos*, los autorradiogramas fueron analizados mediante el programa ImageJ 1.44p Java 1.6.0\_20, utilizando la herramienta *Plot Profile* sobre transectas a lo largo de los carriles en comparación, lo cual permite obtener un gráfico del perfil del carril, así como una salida numérica de los datos escaneados. Adicionalmente, se utilizó la herramienta *Analyze Gels/ Plot Lane* del mismo programa para corroborar los datos obtenidos (ver *Anexos*, Fig. VIII.3).

Dado que un gran número de transcritos reversos amplificados en el DD no muestran un patrón de presencia/ ausencia absoluta sino marcadas diferencias de intensidad de banda, se tomó como criterio considerar como diferenciales de una determinada población celular, aquellas bandas cuya intensidad fuera claramente superior ( $\geq 3X$ ) a la determinada en las otras poblaciones de células. La aplicación de este criterio disminuyó el número inicial de bandas diferenciales detectadas por análisis visual primario en casi un 30% (de 119 a 85).

Aplicando el criterio mencionado, se identificó igualmente entonces, un considerable número de bandas de expresión diferencial, como se detalla en la tabla IV.5. Obsérvese que además de las diferenciales de cada una de las 3 poblaciones incluídas en los ensayos, algunas bandas fueron clasificadas como potencialmente

específicas de meiosis (R3 + R4), y otras (comunes a 2C y R3) como potencialmente específicas de pre-meiosis y meiosis temprana. El total de bandas diferenciales obtenidas (85), se cortaron y guardaron a -20°C, y, 39 de ellas fueron seleccionadas para la primera tanda de reamplificaciones.

**Tabla IV.5.-** Análisis cuantitativo de bandas diferenciales obtenidas para las diferentes combinaciones de iniciadores utilizadas en el DD. De las bandas totales obtenidas para cada par de iniciadores, se especifica cuántas mostraron ser diferenciales, y dentro de estas últimas, en qué poblaciones se visualizaron.

Iniciador der.	Iniciador izq.	Bandas totales	Bandas diferenciales	Bandas específicas				
				2C	2C+R3	R3	R3+R4	R4
HT <sub>11</sub> G	AP1	81	11	-	1	-	5	5
HT <sub>11</sub> G	AP2	45	5	1	-	4	-	-
HT <sub>11</sub> G	AP3	43	18	4	1	6	5	2
HT <sub>11</sub> G	AP4	41	5	3	1	1	-	-
HT <sub>11</sub> G	AP5	38	10	5	-	2	3	-
HT <sub>11</sub> G	AP6	29	4	-	-	-	2	2
HT <sub>11</sub> C	AP6	69	11	3	-	-	8	-
HT <sub>11</sub> C	AP7	31	4	3	-	-	1	-
HT <sub>11</sub> C	AP8	37	6	1	1	3	1	-
HT <sub>11</sub> C	AP1	45	7	-	1	1	2	3
HT <sub>11</sub> C	AP3	30	4	1	3	-	-	-
<b>TOTAL</b>		<b>489</b>	<b>85</b>	<b>21</b>	<b>8</b>	<b>17</b>	<b>27</b>	<b>12</b>
<b>% del total</b>		<b>100</b>	<b>17,4</b>	<b>4,3</b>	<b>1,6</b>	<b>3,5</b>	<b>5,5</b>	<b>2,5</b>
<b>% del total de diferenciales</b>			<b>100</b>	<b>24,7</b>	<b>9,4</b>	<b>20</b>	<b>31,8</b>	<b>14,1</b>

En la tabla IV.5 se puede apreciar que el 17,4% de las bandas totales obtenidas en las amplificaciones exhibieron un patrón diferencial. A su vez, las bandas diferenciales de los estadios meióticos (R3 y/o R4) representaron en total el 66% del total de bandas diferenciales detectadas, y el 11,5% del total de bandas amplificadas en el DD, repartidos de la siguiente manera: 3,5% sólo en R3; 5,5% en R3 y R4; y 2,5% sólo en R4.

Resulta interesante que, al menos con las combinaciones de iniciadores utilizadas, las bandas exclusivas de R4 queden en minoría con respecto a las exclusivas de R3 y las comunes a R3 y R4. Probablemente, esto se relacione con la presunción (hasta el momento carente de evidencia), de que muchos de los genes cuyos productos actuarán durante la profase meiótica media, ya comienzan a expresarse en L/Z. El análisis de las secuencias de los fragmentos de transcritos reversos que han sido seleccionados para ser reamplificados, y que tendrá lugar en el futuro cercano, probablemente ayude a aclarar este asunto.

## **V. DISCUSIÓN**

### **V.1. Método desarrollado para la preparación de suspensiones celulares de testículo de roedores**

---

Un requerimiento primario para el análisis y clasificación de cualquier población celular mediante CMF, es que las células a analizar se encuentren en suspensión, y que hayan perdido sus asociaciones con las células vecinas, en el caso de los tejidos sólidos.

En el caso particular de la preparación de suspensiones celulares a partir de tejido testicular, es deseable maximizar la cantidad de células viables, evitar la formación de cúmulos de células y el daño selectivo de ciertos tipos celulares, así como minimizar la cantidad de multinucleados formados durante el proceso (Meistrich, 1977). A continuación, se discutirá la calidad de las suspensiones celulares utilizadas durante el desarrollo del presente proyecto, en relación a estos aspectos. La tabla V.1 resume las principales ventajas del método desarrollado (Rodríguez-Casuriaga *et al.*, 2009) en comparación con otros métodos alternativos.

---

**Tabla V.1.-** Comparación de diferentes métodos de preparación de suspensiones celulares de testículo.

	<b>Lam <i>et al.</i>, 1970</b>	<b>Meistrich, 1972</b>	<b>Malkov <i>et al.</i>, 1998</b>	<b>Rodríguez-Casuriaga <i>et al.</i>, 2009</b>
<b>DURACIÓN</b>	BREVE (~30 min)	EXTENSO (~1 h)	EXTENSO (~2 h)	MUY BREVE (~15 min)
<b>MANIPULACIÓN</b>	SIGNIFICATIVA	ALTA	ALTA	MÍNIMA
<b>REPRODUCIBILIDAD</b>	VARIABLE	VARIABLE	VARIABLE	MUY ALTA
<b>RESTOS CELULARES</b>	SIGNIFICATIVOS	MODERADOS	NO DETERMINADO	ESCASOS
<b>MULTINUCLEADOS</b>	SIGNIFICATIVOS	SIGNIFICATIVOS	SIGNIFICATIVOS	ESCASOS
<b>VIABILIDAD</b>	≤80%	98%	NO DETERMINADO	>85%
<b>RNAsas</b>	NO	NO	SI	NO
<b>TRIPSINA/COLAGENASA</b>	NO	SI	SI	NO

### **V.1.a. Multinucleados**

---

La formación de multinucleados durante el procesamiento de tejido testicular ha representado una complicación frecuente, habiéndose determinado que aproximadamente el 13% de las espermátidas redondas se encuentran en este estado tanto cuando las suspensiones celulares de testículo son preparadas mediante un método exclusivamente mecánico (Meistrich, 1972) como en presencia de tripsina (Meistrich *et al.*, 1973).

La naturaleza sincitial del epitelio seminífero, con clonas celulares unidas mediante puentes citoplasmáticos, favorece la formación de multinucleados. Cuando los parámetros de discriminación entre diversos tipos celulares incluyen el contenido de ADN y/o el tamaño celular, la presencia de multinucleados constituye una causa importante de contaminación de fracciones. Por ejemplo, un multinucleado formado a partir de 4 espermátidas redondas, equivale, en base a estos parámetros, a un meiocito paquiténico (con un contenido de ADN 4 veces superior y marcado mayor tamaño), pudiendo resultar, entonces, erróneamente clasificado (Meistrich, 1977; Grogan *et al.*, 1981).

El método de preparación de suspensiones celulares testiculares desarrollado durante el desarrollo de la presente tesis genera un escaso número de estructuras multinucleadas. El empleo del Medimachine en el protocolo implica una mínima manipulación, y esto probablemente se relaciona con los escasos multinucleados detectados, ya que se ha comprobado en el pasado que su formación es principalmente una consecuencia de la manipulación del tejido (Meistrich, 1977).

### **V.1.b. Cúmulos celulares**

---

Los protocolos para la preparación de suspensiones celulares testiculares básicamente han utilizado la disociación mecánica en forma exclusiva (Lam *et al.*, 1970) o una combinación de acción mecánica suave con tratamientos enzimáticos empleando tripsina, ADNasa (Meistrich *et al.*, 1973) y colagenasa (Romrell *et al.*, 1976).

Si bien ambas estrategias han rendido suspensiones de células individuales, pudo determinarse que las células tienden a agregarse rápidamente formando cúmulos en aquellas suspensiones preparadas mediante disociación exclusivamente mecánica (Meistrich, 1977). Esta situación mejora notablemente en los métodos

combinados (mecánico seguido por tratamiento enzimático), viéndose minimizada la formación de cúmulos celulares (Meistrich, 1977). Sin embargo, la utilización de enzimas disgregadoras en el protocolo, así como de otras como ADNasas y ARNasas, no siempre es deseable considerando eventuales posteriores análisis de macromoléculas provenientes de las células disgregadas.

A través de la aplicación del método que utiliza al Medimachine se han logrado preparar suspensiones celulares de testículo mediante disgregación exclusivamente mecánica. La utilización de un equipo para disgregar mecánicamente al tejido convierte al procesamiento en mínimamente dependiente del operador y altamente reproducible, dos grandes ventajas en este tipo de protocolos. A pesar de no utilizarse tripsina ni colagenasa en la preparación, no se detectaron cúmulos celulares importantes en las suspensiones resultantes observándose bien disgregadas bajo MO de contraste de fases. Pudo asimismo comprobarse la importancia del agregado de NDA a las suspensiones recién preparadas, ya que en su ausencia, y en condiciones de alta concentración celular, las células tendían a agregarse (no mostrado).

La ausencia de cúmulos celulares en las suspensiones es de fundamental importancia para su utilización en posteriores análisis por CMF, en los cuales la muestra debe pasar por una pequeña boquilla, muy fácilmente ocluíble por agregados celulares en la muestra. En los análisis efectuados durante el presente trabajo se utilizó una boquilla con orificio de 70  $\mu\text{m}$  de diámetro, por lo cual puede calcularse que el agregado de unas pocas células (por ejemplo, de 3 meiocitos paquiténicos) sería suficiente para ocluírla, y entorpecer el uso del citómetro.

### **V.1.c. Viabilidad celular**

---

Los niveles de viabilidad celular determinados en las suspensiones preparadas con el Medimachine superaron el 85%, como se expuso en *Resultados*. Estos valores resultaron ampliamente aceptables, ya que las suspensiones celulares de testículo preparadas a través de otros métodos mecánicos por otros autores rindieron un máximo de 80% de células testiculares viables (e.g., Lam *et al.*, 1970; Meistrich, 1972), y este valor exhibía un cierto grado de dependencia del operador dada la abundante manipulación requerida. La utilización del Medimachine, en nuestro caso, hizo que el proceso fuera fácilmente estandarizable y reproducible, obteniéndose niveles de viabilidad estables.

Cuando la determinación se realizó empleando el *Live/Dead kit* (ver *Materiales y Métodos*) sólo un 8% de las células se manifestaron como muertas, mientras que dentro de la población de vivas aproximadamente un 20% presentó doble tinción (fluorescencia tanto roja como verde). Cabe recordar que la fluorescencia roja está dada por el homodímero-1 de etidio que penetra solamente en células muertas o que posean su membrana plasmática dañada. La causa del ingreso de este compuesto a células que aún se encuentran vivas (fluorescencia verde), probablemente se relacione con el hecho de que durante la disgregación mecánica del tejido se rompen los puentes citoplasmáticos entre las células que componen las clonas del epitelio seminífero, viéndose alterada la integridad de la membrana plasmática. Este mismo concepto podría explicar la entrada del IP (clásicamente utilizado para marcar células muertas) en las células de las suspensiones preparadas, como fue observado en nuestras investigaciones y se discutirá más adelante (V.2.b). De todos modos, no podemos descartar que las células doblemente teñidas se encuentren destinadas a morir, como fue propuesto por Kato y colaboradores (2002) para explicar la doble tinción observada en gran parte de una población de espermatozoides extraídos de epidídimo, al momento de evaluar su viabilidad utilizando tinción con homodímero-1 de etidio y calceína AM.

#### **V.1.d. Representatividad del tejido**

---

Además de la evidente importancia de los niveles de viabilidad de las suspensiones logradas, es importante que la composición de las mismas sea representativa del tejido del cual deriva. Esto es fundamental si se planea utilizar las suspensiones para realizar observaciones y sacar conclusiones acerca de los procesos que ocurren *in vivo* en las células que lo componen (por ejemplo, estimación de duración porcentual de estadios de maduración en base a su representación celular).

Cuando se utilizaron otros métodos mecánicos en el pasado, hubo casos en que se pudo constatar que algunos tipos celulares resultaban selectivamente dañados en el proceso (Meistrich, 1977; Hittmair, 1992), proporcionando suspensiones celulares cuya composición porcentual presentaba diferencias con la del tejido original. Los métodos que asocian la disociación mecánica al tratamiento enzimático rindieron, en general, mejores resultados en cuanto a la representación

de tipos celulares (Meistrich *et al.*, 1973; Meistrich, 1977) si bien no se corresponde totalmente con la del tejido fuente.

La aplicación del método desarrollado durante esta tesis permitió obtener suspensiones celulares cuya composición porcentual (en término de poblaciones C, 2C y 4C), se manifestó muy cercana a la existente en el tejido testicular original, tanto en cobayo como en ratón, de los cuales existían datos previos publicados provenientes de conteos sobre secciones transversales de túbulos seminíferos (Meistrich *et al.*, 1973; Rodríguez y Wettstein, 2004). Este hallazgo indica que el protocolo aplicado no estaría dañando ningún tipo celular en forma selectiva, lo cual representa otra cualidad del método.

Considerando todo lo antedicho, podemos afirmar que se ha desarrollado un método eficiente para la preparación de suspensiones celulares de testículo, potencialmente aplicable a una variedad de estudios sobre la gametogénesis masculina, ya que reúne muchas características deseables, a saber:

- a) es muy rápido (aproximadamente 15 min.);
- b) es altamente reproducible (prácticamente independiente del operador);
- c) no involucra acciones enzimáticas, posibilitando la posterior extracción de macromoléculas de interés como ARN y proteínas;
- d) rinde muy buenos niveles de viabilidad celular;
- e) no destruye selectivamente ningún tipo celular;
- f) no promueve la formación de cúmulos o agregados celulares;
- g) genera muy pocos multinucleados y restos celulares;
- h) es sumamente sencillo;
- i) es económicamente conveniente, ya que una vez adquirido el Medimachine (equipo pequeño, de costo menor), no requiere del uso de enzimas u otros reactivos costosos.

## V.2. Estudio del desarrollo postnatal de testículo de cobayo por citometría de flujo. Comparación del establecimiento de su primera onda espermatogénica con otros roedores

---

Los análisis mediante CMF de suspensiones celulares de testículo de roedores preparadas empleando el Medimachine resultaron altamente informativos. La cuantificación de las diferentes poblaciones celulares de testículo de *C. porcellus* en base a su contenido de ADN, complejidad interna y dispersión lateral, permitió confirmar y ampliar nuestras observaciones preliminares en esta especie.

Anteriormente, a través de conteos al MO sobre cortes transversales de túbulos seminíferos, se había estimado la duración porcentual de las diversas etapas espermatogénicas en *C. porcellus* (Rodríguez y Wettstein, 2004). Mediante esta aproximación se determinó que las divisiones meióticas en cobayo ocuparían ~55% del tiempo de un ciclo del epitelio seminífero, distribuido según sigue: L+Z ~20%; P ~25%; D junto con meiosis II ~10% del tiempo de ciclo. Dado que la primera onda espermatogénica en *C. porcellus* dura entre 40 y 45 días, los porcentajes anteriores corresponderían a las siguientes extensiones, en días: L+Z, 8-9; P, 10-11; D+II, 4.

Durante el presente estudio fue posible confirmar que estas estimaciones para la primera onda espermatogénica eran acertadas, a través una metodología totalmente diferente, de mayor exactitud y significancia estadística como es la CMF. Además pudo obtenerse información más detallada sobre el esquema temporal de la primera onda espermatogénica en esta especie: los meiocitos L+Z son observados entre los días 5-6 y 14 luego del nacimiento; el paquiteno se extiende entre los días 15 y 25-26 post-parto; las primeras espermátidas redondas aparecen a los 31-32 dpp, mientras que la fase de elongación comienza a los 37-38 dpp, como se aprecia en la tabla IV.3.

Cuando los datos obtenidos se compararon con la información publicada sobre otras especies de roedores, se encontraron diferencias muy notorias tanto respecto a la duración global de las divisiones meióticas (~58% del tiempo de ciclo, mientras que en las otras representa el 24% a 38%), como a su temprana entrada en meiosis luego del nacimiento, lo que resulta muy evidente a partir de la observación de la figura IV.6. Este último aspecto pudo ser confirmado al MO, apreciándose la rápida aparición de meiocitos tempranos post-nacimiento, así como su lenta progresión a través de una primera profase meiótica peculiarmente extensa. Por lo tanto, independientemente de la duración en días del ciclo seminífero de la

especie, las divisiones meióticas en *C. porcellus* se extienden durante más de la mitad de la primera onda espermatogénica, mientras que en las otras especies aquí estudiadas rondan el 30%.

La profase meiótica I, que se caracteriza por ser muy extensa en todas las especies estudiadas al punto que ha sido artificialmente subdividida en 5 subestadios para su estudio (ver *Introducción*), en *C. porcellus* mostró ser aún más extensa. Pfeifer y colaboradores (2001), en base a comparaciones entre las dinámicas teloméricas observadas durante la primera profase meiótica en especies con diferencias importantes en sus números cromosómicos, propusieron una hipótesis que correlacionaba el número cromosómico de la especie con la duración de ciertos eventos de la primera profase meiótica como por ejemplo la configuración cromosómica en *bouquet*. Un número mayor de cromosomas requeriría, según los autores de esta hipótesis, una mayor duración del arreglo en *bouquet*, dado el tiempo que requeriría el encuentro entre los homólogos. Nuestros hallazgos apoyan esta hipótesis, ya que el cobayo posee un mayor número cromosómico ( $2n=64$ ) que las otras especies estudiadas en este trabajo (ratón:  $2n=40$ ; rata:  $2n=42$ ; hámster dorado:  $2n=44$ ). Además, el *bouquet* es más evidente y posee una frecuencia marcadamente superior en cortes transversales de túbulos seminíferos de cobayo en comparación con los otros roedores mencionados. Es decir, que la mayor duración de la primera profase meiótica en el cobayo podría estar dada, al menos parcialmente, por la duración mayor de ciertos eventos como la configuración en *bouquet*. Por otro lado, los resultados mostrados en la figura IV.6 permiten apreciar que en las tres especies analizadas cuyos números cromosómicos son similares (rata, ratón y hámster dorado), la duración porcentual de los diferentes estadios espermatogénicos durante su primera onda de maduración posee valores proporcionalmente muy similares, a diferencia del cobayo que mostró valores muy alejados de los esperados. Sería interesante ampliar estos estudios a especies de mamíferos que posean extremas diferencias en sus números cromosómicos, por ejemplo, *Muntiacus muntjak* ( $2n=6$  en hembras,  $7$  en machos) y *Muntiacus reevesi* ( $2n=46$  en ambos sexos) (Tsipouri *et al.*, 2008, y referencias incluídas), en busca de posibles diferencias en la extensión de su profase meiótica I y en la cronología del inicio de la meiosis después del nacimiento.

En referencia al temprano ingreso en profase de la primera división meiótica en el cobayo (y quizás también en otras especies no incluídas en estos estudios) durante el desarrollo postnatal del testículo, proponemos que podría representar una

estrategia desarrollada en especies que requieren la extensión de determinados procesos (por ejemplo, constitución del *bouquet*) de modo que, a pesar de su notablemente extensa profase I, no se retrase la llegada a la edad reproductiva.

Por otra parte, el número de células que ingresan en meiosis durante la primera onda en *C. porcellus* también manifestó ser mayor que en las otras especies analizadas. Esta observación derivó de la comparación de los valores del cociente de 4C/2C (relación entre células con contenido de ADN 4C y 2C) al comienzo de la meiosis, que en cobayo mostró ser el doble de lo observado en la rata y el ratón. Además, el porcentaje relativo de células 4C en cobayos cuya primera onda acaba de completarse (30%) es significativamente superior a lo observado en la rata y el ratón (16,3% y 12,5%, respectivamente). Todo esto indica que el testículo de *C. porcellus* se encuentra realmente enriquecido en células meióticas, particularmente en meiocitos tempranos, en comparación con otros modelos de roedores usualmente empleados para su estudio.

El estudio del desarrollo postnatal de *C. porcellus* mediante CMF también permitió ratificar la incidencia del peso testicular de los especímenes en el avance de la primera onda espermatogénica, más allá de su edad cronológica (Rodríguez y Wettstein, 2004). Un claro ejemplo lo representó el análisis de dos especímenes con pesos testiculares muy similares y edades dispares (15 y 32 dpp), que rindió perfiles citométricos de gran similitud, como se ha indicado en la figura IV.4. Cabe señalar que el grado de desarrollo que mostraba este espécimen de 32 días con gónadas muy pequeñas no es el usual para cobayos de su edad. Es más, los restantes tres cobayos de 32 días de edad analizados, cuyos pesos testiculares rondaban los 0,5 g, mostraron perfiles muy similares entre sí, en los cuales ya se evidenciaba la aparición de las primeras células haploides. Cabe destacar que todos los cobayos utilizados en estos estudios provinieron de un mismo bioterio, con elevados estándares de alimentación y cuidado general de los animales. Por lo tanto, puede concluirse que además de la evidente importancia de la edad en el grado de madurez gonadal de los individuos juveniles, su masa testicular es igualmente importante, al menos en esta especie.

### **V.3. Perfiles citométricos de suspensiones celulares testiculares de cobayos adultos. Purificación de subestadios de la primera profase meiótica**

---

Las suspensiones celulares de testículo de cobayos adultos expuestas a tinción prolongada con IP o al colorante supravital específico para ADN Vybrant, exhibieron características peculiares en sus perfiles citométricos. Las mismas no poseían antecedentes reportados para ninguna otra especie estudiada mediante CMF, y tampoco pudieron ser reproducidas en nuestras manos con material proveniente de otras especies como la rata o el ratón.

Sin duda, una de las observaciones más llamativas e interesantes fue la clara distinción de dos subpoblaciones dentro de las células 4C de cobayo, en su mayoría meiocitos. Si bien algunas de las células contenidas en la población 4C correspondía a espermatogonias en fase G2 del ciclo celular, tal distinción no podía ser atribuída a ello, ya que, además de que su proporción es muy minoritaria, ni en rata ni en ratón se observaba algo similar. Por lo tanto, conociendo la elevada representación de los estadios tempranos de profase meiótica I (L y Z), y la extrema polarización de la configuración cromosómica en *bouquet* en el cobayo, comenzamos a sospechar que una clara distinción entre diferentes subestadios meióticos mediante CMF, era posible en esta especie.

Cuando se realizó la clasificación en flujo de las subpoblaciones R3 y R4 dentro de la población testicular 4C de cobayo pudo comprobarse que efectivamente correspondían a subestadios de la profase meiótica I. Mientras que en la región R3 se concentraban los estadios meióticos tempranos (L y Z), R4 correspondía a meiocitos más avanzados (P y D). Su identidad pudo determinarse inequívocamente mediante inmunomarcado de un componente de EA/ EL de CS, además de mediante inclusión en plástico de las células clasificadas y posterior análisis de secciones semifinas al MO.

Un factor fundamental para la distinción de las subpoblaciones 4C fue el tiempo de exposición al IP previo a su análisis en el citómetro. Una misma suspensión celular de testículo de cobayo analizada a diferentes tiempos de exposición a IP, exhibía perfiles citométricos diferentes en los cuales las subpoblaciones 4C (R3 y R4) aparecían progresivamente más separadas como se aprecia en la figura IV.8. Durante estos ensayos pudo volver a comprobarse que el patrón observado para la población testicular 4C en cobayo no era compartido con

rata ni ratón, cuyas suspensiones testiculares no mostraron igual comportamiento aunque se incubaran durante horas con IP.

Los meiocitos tempranos (R3) se diferencian de los medios a avanzados (R4) en varios aspectos: su tamaño nuclear y celular, la condensación de la cromatina y la distribución de los cromosomas en el espacio nuclear. Probablemente, la distinción de R3 y R4 en esta especie no se deba a una única causa, sino que tenga varios componentes que se suman:

- Las diferencias en los tamaños celulares de los meiocitos en etapas iniciales con respecto a los más avanzados provocan una dispersión frontal diferencial de la fluorescencia emitida, representando un componente en la distinción de R3 y R4.
- Considerando que el IP es un agente intercalante de tinción de ácidos nucleicos, las diferencias en la compactación de la cromatina probablemente representen un factor importante, dada la condensación diferencial que presentan en su cromatina los diferentes estadios de la profase meiótica I. Un estado más condensado permitiría que menos moléculas de IP lograsen intercalarse aún luego de exposiciones muy prolongadas, mientras que un estado más laxo de la cromatina no interferiría en la accesibilidad del agente intercalante, lográndose una marca máxima en el ADN, en un tiempo  $\geq 2$  horas. En consecuencia, células con igual contenido de ADN podrían visualizarse como diferentes en ese aspecto, debido a la compactación diferencial de su cromatina. En esta línea de pensamiento, existe en la literatura el antecedente de los espermatozoides maduros que se visualizan en los perfiles citométricos como una población aparentemente subhaploide, debido a la extrema compactación de su cromatina, empaquetada con protaminas en lugar de histonas (Spanò y Evenson, 1993, y referencias incluídas). En suma, los diferentes niveles de fluorescencia emitida detectados para las subpoblaciones R3 y R4 (ambas con contenido de ADN=4C), serían, al menos en parte, una consecuencia de una alteración en la unión estequiométrica del fluorocromo al ADN en estados de mayor compactación.
- Una distribución espacial diferente de los cromosomas en el espacio nuclear en células con igual contenido de ADN, puede hacer que la dispersión lateral de la fluorescencia emitida muestre diferencias, en

representación de su diferente complejidad interna. En el cobayo, durante la transición L/Z con los cromosomas configurados en *bouquet*, puede observarse una extrema polarización cromosómica que deja prácticamente vacía la otra mitad del núcleo. Tal polarización se pierde a partir del P que presenta sus cromosomas distribuidos de forma más o menos uniforme dentro del espacio nuclear. Estas diferencias entre los meiocitos tempranos y los medios a tardíos, estarían, entonces, siendo detectadas por el citómetro y representadas en sus gráficos salientes.

- Un diferente contenido de ARN (teñible con IP, y posible reflejo de diferentes niveles de transcripción en las células en cuestión) podría también contribuir a la distinción de subpoblaciones meióticas, en caso de que, en forma significativa, se encendieran/apagaran genes entre una etapa y otra. Cuando una suspensión testicular de cobayo previamente analizada al citómetro se trató con ARNasa y se reanalizó, se observó que las subpoblaciones R3 y R4 tomaban una posición algo más cercana (no mostrado). Sin embargo, la contribución de las diferencias en los niveles de ARN a la distinción de R3 y R4 sería menor, ya que estas subpoblaciones también fueron claramente distinguibles cuando se utilizó el colorante Vybrant, específico para ADN.

Como se mencionó anteriormente, en los estudios realizados pudimos diferenciar las subpoblaciones R3 y R4 en células testiculares del cobayo, pero no en las provenientes de la rata o el ratón. Dado que las diferencias en tamaños celulares y nucleares de los meiocitos tempranos con respecto a los avanzados, así como en sus niveles de compactación de la cromatina son compartidas por las tres especies (que posiblemente también posean similares diferencias en los niveles transcripcionales de sus meiocitos tempranos y avanzados), seguramente las diferencias interespecíficas observadas se deban a que la elevada representación de estadios meióticos tempranos en cobayo permite su visualización como una población discreta, mientras que en las otras especies el bajo número de estas células no las hace individualizables como población por CMF. Además, la extrema polarización cromosómica durante el *bouquet* en cobayo (mucho mayor que en otras especies) seguramente contribuya a la visualización de los meiocitos tempranos como un pico separado en los perfiles citométricos.

Con respecto a la importancia del componente cuantitativo, resultó interesante comprobar que, aún en el cobayo, no todos los individuos estudiados permitían una clara distinción de las subpoblaciones R3 y R4. Cuando una de las dos subpoblaciones representaba un componente muy minoritario (~30% o menos) dentro de la población 4C, el pico correspondiente en los histogramas aparecía como un único pico más o menos ancho, o como un pico principal que exhibía una especie de “hombro” hacia uno de sus lados. Los datos anteriores provenientes de conteos en secciones de túbulos seminíferos al MO fueron muy útiles en este punto, ya que nos permitieron relacionar los datos de composición relativa de la población meiótica (L+Z vs. P+D) para cobayos de diferentes pesos testiculares, con los patrones observados para la población 4C en los perfiles citométricos. El análisis de todos estos datos en conjunto permitió concluir que una contribución más o menos igualitaria de R3 y R4 a la población 4C (~40-60% de cada una), era la situación óptima para distinguir inequívocamente ambas subpoblaciones de meiocitos y su clasificación en paralelo.

Es de destacar el perfil obtenido para un cobayo inmaduro cuyo peso testicular era de 0,35 g. Aún luego de una exposición prolongada a IP, sus histogramas exhibían un único y estrecho pico para la población 4C. Cuando fueron analizados los datos disponibles de los conteos al MO, se observó que el 80% de los meiocitos primarios en cobayos de ese peso testicular correspondían a L/Z. Por lo tanto, el 20% restante correspondiente a P+D no era suficiente para distinguirlos como una población separada, y ni siquiera para ensanchar el pico de 4C. La situación observada en este cobayo juvenil inmaduro (L+Z >> P+D), ocurre a la inversa en los adultos de especies como la rata y el ratón (P+D >> L+Z), y probablemente represente la causa principal de no poder distinguir en ellas a las subpoblaciones R3 y R4.

Cabe mencionar que los estadios de L+Z en *C. porcellus*, además de mostrar una elevada representación celular en diversos niveles de maduración de los individuos, la mostraron también en los adultos. La posibilidad de purificar mediante CMF estos estadios a partir de individuos maduros, cuyo epitelio seminífero provee un entorno celular espermatogénico “completo” para las células en él contenidas, constituye una gran ventaja con respecto a otras especies, por los motivos considerados a continuación:

- El íntimo relacionamiento entre las células que integran el epitelio seminífero, probablemente incida en los procesos celulares que se están

llevando a cabo en las células que lo conforman. La presencia/ ausencia de los estadios espermatogénicos más avanzados en el epitelio, podría afectar directa o indirectamente la expresión de determinadas secuencias génicas. Además, resulta fundamental para la espermatogénesis la función nodriza de las células de Sertoli. En un epitelio en desarrollo dichas células están en contacto sólo con las células más inmaduras de la línea germinal. En el adulto, en cambio, albergan en sus cavitaciones diversas etapas de maduración de los gametos en formación. Quizás una misma célula de Sertoli, en una y otra situación (epitelio inmaduro y maduro), sea capaz de enviar diferentes señales a su entorno, comportándose diferencialmente durante la primera onda espermatogénica en comparación con las siguientes.

- El trabajoso acopio de material necesario para la realización de estudios moleculares partiendo de individuos inmaduros. Como se mencionó anteriormente, no fue posible distinguir en forma clara e inequívoca subpoblaciones de meiocitos en material proveniente de rata o ratón. Por lo tanto, las únicas posibilidades de purificar meiocitos tempranos mediante CMF en estos organismos serían: a) empleando anticuerpos generados contra algún antígeno específico de superficie de meiocitos L+Z (aún desconocidos); o b) mediante la utilización de individuos inmaduros cuyo epitelio seminífero alcanzase solamente la etapa de cigoteno, para la posterior purificación de la población 4C entera. Este último abordaje es viable, pero posee como desventajas principales: a) la falta de certeza sobre la similitud en los patrones de expresión génica existentes entre la primera onda y las siguientes, y; b) la baja frecuencia de la población a estudiar que implica el acopio de material testicular proveniente de varias decenas de especímenes. El peso testicular de un ratón de 12-13 días ronda los 8 mg, y se obtienen aproximadamente  $1 \times 10^6$  células totales en la suspensión cada 25 mg de tejido procesado en el Medimachine; además, las células 4C representan en esta etapa del desarrollo testicular del ratón ~6-7% del total, según datos de Malkov y colaboradores (1998) confirmados en nuestros estudios (no mostrado).

Los niveles de pureza obtenidos para las fracciones R3 y R4 clasificadas a partir de las suspensiones testiculares de cobayo fueron ampliamente satisfactorios,

alcanzando un 98-99%. Tales valores fueron determinados mediante un estricto reanálisis citométrico de las fracciones purificadas, con su implícita significancia estadística.

En conclusión, se ha logrado purificar meiocitos tempranos en paralelo a los estadios meióticos más avanzados, con el mayor nivel de pureza obtenido hasta el presente, y a partir de individuos cuyo epitelio seminífero confiere un entorno celular “completo”, lo cual representa un sustrato prometedor para posteriores estudios a nivel molecular.

#### V.4. Utilización del IP como agente intercalante

---

Para la gran mayoría de los ensayos realizados se utilizó tinción con el agente intercalante IP. Si bien se trata de un compuesto usualmente utilizado para teñir células fijadas o muertas, nosotros disponemos de suficientes elementos para afirmar que las células en nuestras suspensiones celulares no están muertas o severamente dañadas: a) su morfología al MO tanto antes como después de su clasificación (figuras IV.1 y IV.9, respectivamente); b) los elevados niveles de viabilidad obtenidos ( $\geq 85\%$ ); y c) la similitud entre los perfiles obtenidos con tiempos de exposición estándar al IP en el FACSVantage, y con el colorante supravital Hoechst 33342 en el MoFlo (figura IV.2).

Una explicación para nuestro resultado podría ser que, aunque el uso habitual del IP es en bajas concentraciones (por ejemplo, 1  $\mu\text{g/ml}$  en el kit Anexina V-FITC, BD Pharmingen, San Diego, CA), en el presente trabajo se utilizaron elevadas concentraciones de IP (50  $\mu\text{g/ml}$ ) para teñir las células testiculares disgregadas con el Medimachine, lo que seguramente haya potenciado el ingreso del colorante a las células. Por otra parte, su entrada a las células también se daría como consecuencia de la disgregación mecánica por cambios a nivel de la membrana plasmática de las células. En este sentido, es importante recordar que, dado que el tejido testicular es un sincitio, la disgregación celular implica la ruptura de los puentes citoplásmicos, que pasarían a constituir puntos de entrada para el colorante.

Los resultados obtenidos con el *Live-dead kit* en las suspensiones testiculares, sostienen la hipótesis que las células mantienen su viabilidad, aunque con permeabilidad aumentada o membrana celular parcialmente dañada. Sólo un 8% de las células presentó únicamente fluorescencia roja proveniente del homodímero-1 de etidio (muertas), mientras que el 92% restante fue positivo para calceína, con emisión en el verde (vivas). Sin embargo, un subconjunto de las células calceína-positivas presentó doble marcación, indicando que el homodímero-1 de etidio había logrado penetrar en esas células. Dado que este compuesto penetra sólo en células muertas o con membrana celular dañada (al igual que el IP), la ruptura de los puentes citoplásmicos del sincitio durante la disgregación mecánica podría estar vinculada a su entrada a células que aún muestran tener actividad enzimática (fluorescencia verde). Sin embargo, también debe considerarse que en aquellas células que no han sufrido daños severos durante la disgregación, es muy

probable que las aberturas a nivel de la membrana plasmática causadas por la ruptura de los puentes citoplásmicos sean rápidamente reparadas.

En relación a estas observaciones, resulta interesante el hecho de que la utilidad del IP como indicador de células muertas ha sido cuestionada en el pasado en el caso de algunas bacterias (Shi et al., 2007). Estos autores observaron que la entrada de IP a las bacterias ambientales que se encontraban estudiando dependía en gran parte de su estado fisiológico. Hasta un 40% de las células eran IP positivas en la fase de crecimiento exponencial temprano, pero permanecían cultivables luego de su clasificación sobre placas de agar. En cambio, sólo un 2 a 5% de las células resultaban positivas para el IP en la fase estacionaria de crecimiento. En base a sus observaciones, estos autores sugirieron que la significativa entrada de IP durante el crecimiento estaría causada por la inhabilidad de algunas bacterias para cerrar rápidamente rupturas a nivel de los glicanos de su pared celular. Más recientemente, otros autores demostraron que levaduras *S. cerevisiae* sometidas a diferentes formas de estrés, se tornaban transitoriamente permeables al IP debido a daños en sus membranas celulares, los cuales lograban luego ser reparados en parte de la población (Davey y Hexley, 2011). Por lo tanto, el nuestro no es el primer caso que cuestiona el carácter universal del IP como indicador de muerte celular.

Es de destacar que nosotros no hemos intentado realizar cultivos de sobrevida de las células purificadas, y, en consecuencia, no podemos descartar la posibilidad de que las mismas se encuentren destinadas a morir. Sin embargo, ello es irrelevante para nosotros, dado que hemos podido obtener ARNs de buena calidad y bandas de ADNc diferenciales a partir de dichas células.

Por otra parte, nuestro hallazgo de que es posible utilizar el IP como tinción en este tipo de procedimientos resulta ventajoso dado que es de bajo costo en comparación con otros colorantes. Además, no requiere de un citómetro de flujo con láser UV. Obviamente, el uso de IP será poco adecuado en los casos en que la clasificación celular se desarrolle para su empleo en sistemas *in vivo* como ser el trasplante de células madre o la selección de espermatozoides X/Y. En estos casos, resulta fundamental el uso de colorantes supravitales con el menor grado de citotoxicidad posible.

## V.5. Utilización de las células purificadas en análisis comparativos de expresión génica

---

Las células purificadas mediante CMF fueron utilizadas posteriormente para realizar estudios de expresión génica diferencial, a partir de su ARN total.

La calidad de los ARNs extraídos mostró ser satisfactoria, considerando el tiempo transcurrido entre la muerte del espécimen y la congelación de los precipitados celulares en N<sub>2</sub> líquido para la posterior extracción de ARN (entre 4 y 5 horas en el caso de R3 y R4, que requieren  $\geq 2$  horas de exposición al IP). Los resultados posteriores obtenidos en el DD, confirmaron que la calidad de los ARNs era suficiente para su empleo como molde primario en las amplificaciones realizadas.

En cuanto al rendimiento obtenido, las fracciones R3 y R4 fueron más limitantes con respecto a 2C, como era previsible, por los siguientes motivos:

- En las suspensiones celulares de testículo clasificadas (cobayos de 45-50 días), 8-10% corresponde a R3 y 12-15% a R4. Sin embargo, los mejores resultados se obtuvieron cuando las poblaciones R3 y R4 ascendían a 10% y 12%, respectivamente, ya que la distinción de las regiones era muy clara. Aunque estos porcentajes son relativamente bajos, la utilización de cobayos con epitelio seminífero maduro como fuente de R3 continúa siendo ventajosa en varios aspectos con respecto al alternativo empleo de ratones inmaduros de 12-13 días, cuyo contenido de R3 es igual o menor, como se mencionó más arriba.
- La cercana ubicación de las regiones R3 y R4 en los gráficos requirió que se delimitaran en forma estricta para evitar la contaminación de las fracciones durante la clasificación. Esta precaución representó sacrificar una pequeña parte de la cantidad en función de la calidad (pureza) de las fracciones clasificadas, tomando en consideración los estudios comparativos a realizar.
- Como se mencionó en *Resultados*, las cantidades de ARN obtenidas luego del tratamiento con ADNasa libre de ARNasa, fueron de unos pocos  $\mu\text{g}$ , especialmente para R3 y R4. Si bien estas cantidades son escasas, son suficientes para los ensayos de DD, que requieren de poco ARN de

partida. Además de la obvia importancia de la cantidad de células colectadas en las clasificaciones para las extracciones, existen otros factores que pueden afectar la cantidad de ARN recuperado, tales como la presencia de núcleos desnudos (con la consiguiente pérdida de gran parte del ARN), y las diferencias en los niveles de transcripción entre un tipo celular y otro. Esto último puede inferirse a partir de los rendimientos diferenciales en los ARNs obtenidos a partir de las células testiculares C, 2C y 4C clasificadas en flujo. Por ejemplo, a partir de un mismo volumen de colecta (4 ml) y, por lo tanto, de un mismo número de células (las células clasificadas están contenidas en microgotas idénticas que se forman mediante la constante vibración de la boquilla del citómetro), se obtuvieron las siguientes cantidades de ARN total: ~0,17 µg a partir de células C totales (no incluidas en el DD); ~0,20 µg a partir de 4C-R3; ~0,48 µg a partir de 4C-R4; y ~0,60 µg a partir de células 2C totales. Vale aclarar que las células C y 2C utilizadas en las extracciones fueron clasificadas en paralelo, mientras que las R3 y R4 se obtuvieron en ensayos independientes, también en paralelo.

Los resultados obtenidos en los ensayos de DD permitieron corroborar que la calidad y cantidad de los ARNs de partida había sido correctamente evaluada y cuantificada, respectivamente.

En total se utilizaron 11 combinaciones diferentes de iniciadores que, según las estimaciones teóricas desarrolladas al respecto, estarían cubriendo aproximadamente un 13% de los genes expresados en una determinada célula de mamífero (Liang *et al.*, 1994). Considerando que, a diferencia de los microarreglos o las técnicas de secuenciación masiva, el objetivo de esta metodología no es el estudio masivo de patrones de expresión génica sino que apunta a la identificación de un número relativamente bajo de genes de expresión específica en determinadas situaciones fisiológicas o en diferentes estadios de maduración, tal probabilidad de detección de transcritos específicos resulta significativa.

Cabe recordar también que, a diferencia de los microarreglos, el DD no requiere un conocimiento previo de la secuencia del ARNm a ser detectado, por lo cual constituye un sistema abierto que permite la identificación de nuevos genes, característica compartida con la secuenciación masiva de transcritos. Dado el escaso conocimiento existente sobre la transcripción de secuencias génicas durante

la meiosis temprana, la utilización de una metodología abierta a su identificación resulta fundamental.

La aplicación del DD de ARNs a las tres poblaciones celulares de testículo purificadas (2C, 4C-R3 y 4C-R4) permitió la comparación de los fragmentos de transcritos reversos amplificados y desplegados en geles desnaturalizantes de poli(acrilamida-urea). Si bien la población testicular 2C es heterogénea (ver *Introducción*), su componente mayoritario son las espermatogonias, pudiendo entonces ser tomada como representante de la premeiosis en estos ensayos. Por otra parte, la elevada pureza de las fracciones R3 y R4 las convierte en excelentes representantes de profase meiótica temprana y media-avanzada, respectivamente. En este sentido, cabe destacar que este es el primer estudio del que tengamos conocimiento, efectuado con espermatoцитos de mamífero en profase temprana purificados de individuos adultos. Con respecto a la profase media-avanzada, si bien existen estudios previos (ver *Introducción*), éstos se han llevado a cabo con poblaciones celulares enriquecidas en este tipo celular (80% en el mejor de los casos), y no puras. El presente trabajo, por lo tanto, sería también el primero en emplear poblaciones celulares de espermatoцитos medios-avanzados virtualmente puras.

El diseño experimental utilizado permite, entonces, analizar los patrones de bandas obtenidos para estas tres poblaciones celulares en busca de diferencias del tipo presencia/ausencia y diferencias notorias en la intensidad de determinada banda en una población con respecto a otra (y sus correspondientes duplicados). De este modo, pueden detectarse bandas que aparezcan:

- sólo en R3 y R4: atribuibles a la detección de algún transcrito meiosis-específico (ausente en premeiosis), cuyo ADNc, resultante de la transcripción reversa, ha servido de molde para la amplificación;
- sólo en los carriles de R3: transcritos reversos parciales que serían específicos de profase meiótica temprana;
- sólo en los carriles de R4: transcritos reversos parciales que se manifiestan como específicos de profase meiótica media-avanzada;
- sólo 2C: probablemente específicos de espermatogonias, aunque también puede tratarse de transcritos expresados a alto nivel en otro tipo celular menos abundante, como las células de Sertoli [(de hecho, estudios previos de microarreglos han demostrado que las espermatogonias son escasas en cantidad de transcritos específicos (Shima *et al.*, 2004)];

- sólo en 2C y R3: probable reflejo de alguna secuencia génica cuya expresión se enciende en la premeiosis y continúa durante las fases iniciales de la profase meiótica;
- sólo en 2C y R4: patrón no esperable en alta frecuencia desde un inicio, pero que podría darse para transcritos específicos de profase media-avanzada cuya presencia se mantiene en meiosis II, tomando en cuenta que una pequeña proporción de la población 2C son meiocitos II (espermatoцитos secundarios).

Los resultados observados en la tabla IV.5 muestran que las combinaciones de iniciadores utilizadas en los ensayos rindieron un total de 489 bandas.

Un primer análisis visual de las mismas (no mostrado en la tabla) ubicó a 119 de ellas dentro de la categoría de diferenciales (24,3%) repartidas de la siguiente manera: 28 bandas diferenciales de 2C (23,5%), 10 de 2C/R3 (8,2%), 31 de R3 (26%), 31 de R3/R4 (26%) y 19 de R4 (15%).

En un segundo análisis, efectuado empleando el programa ImageJ como se detalló en *Materiales y Métodos*, se seleccionaron las mejores 85 bandas diferenciales para ser cortadas de sus respectivos geles: 21 de 2C (24,6%), 8 de 2C/R3 (9,4%), 17 de R3 (20%), 27 de R3/R4 (32%) y 12 de R4 (14%).

Los resultados numéricos provenientes de ambos análisis son coincidentes en varios aspectos:

- El 66-67% de las bandas diferenciales corresponden a meiocitos L/Z (R3) y/o P/D (R4).
- En total, un 52% de las bandas diferenciales aparecieron, o bien exclusivamente en los carriles de R3 (20-26%), o en R3/R4 (26-32%), indicando que la transcripción de dichos genes probablemente ya se inicia durante la profase temprana.
- El 14-15% de las bandas diferenciales se mostraron como específicas de la población de meiocitos medios a avanzados (R4).
- El 23-24% de las bandas diferenciales serían exclusivas de la población 2C (esto incluye transcritos específicos de las espermatogonias, cuya expresión se detiene al iniciarse la meiosis, además de transcritos específicos de las células de sostén, principalmente las de Sertoli).

- El 8-9% de las bandas diferenciales fueron comunes a las poblaciones 2C y R3.
- No se detectaron bandas diferenciales que presentaran un evidente patrón de expresión compartido entre la población R4 y la 2C.

Tomando en cuenta el conteo secundario, la cantidad de bandas diferenciales para cada población con respecto al total de fragmentos (bandas) amplificados, las específicas de las poblaciones meióticas ascienden al 11,5%, siendo el componente mayoritario las bandas comunes a R3 y R4 (5,5%).

Resultó interesante observar que las bandas exclusivas de R4 son minoría (2,5%) con respecto a las específicas de R3 (3,5%) y a las comunes a R3 y R4. Posiblemente esto sea, al menos en parte, un reflejo de la presunta expresión existente ya desde los estadios meióticos iniciales, de genes cuyos productos actuarán durante la profase meiótica media y avanzada.

Por otra parte, existen estudios de microarreglos que evidenciaron la existencia de un importante pico de expresión génica en P, concluyendo que P era, junto con el inicio de la espermiogénesis, uno de los principales momentos de transcripción durante la espermatogénesis (Schultz *et al.*, 2003; Shima *et al.*, 2004). Sin embargo, cabe destacar que estos resultados surgieron de la comparación de poblaciones testiculares enriquecidas en espermátocitos paquiténicos con células premeióticas (espermatogonias), somáticas (Sertoli y Leydig) o postmeióticas (espermátidas redondas), pero no pudieron abordar la comparación con poblaciones celulares enriquecidas en otras etapas de la profase meiótica, como L/Z. A la luz de nuestros resultados, y si estos representaran la realidad de la situación transcripcional durante estas fases de maduración del gameto masculino, podría concluirse:

- La afirmación que el mayor pico de expresión génica de la meiosis (Almstrup *et al.*, 2004; Shima *et al.*, 2004) ocurre en P puede simplemente deberse a que esta etapa se incluyó en los estudios anteriores, desconociéndose en realidad lo que ocurre en L/Z a nivel transcripcional.
- Es también posible que gran parte de la expresión génica identificada como propia de P ya haya comenzado en estadios más tempranos, como lo sugiere la cantidad de bandas diferenciales comunes a R3 y R4 en nuestros estudios (48% del total de bandas diferenciales de meiocitos). Es decir, que en los estudios en que se analizaron, ya sea los niveles

paquiténicos de ARNm total como en los que se caracterizaron transcritos diferenciales presentes, en realidad se estaban sumando aquellos cuya transcripción se habría iniciado durante el L/Z.

- Si bien no hemos determinado niveles totales de expresión génica en R3 y R4, los rendimientos diferenciales obtenidos en las extracciones de ARN por tubo colectado de las fracciones R3 (~0,20 µg) y R4 (~0,48 µg) parecen apoyar la existencia de un pico de transcripción en P. Sin embargo, la mayor cantidad de bandas diferenciales exclusivas de profase temprana (R3) que se obtuvieron en comparación con las exclusivas de profase media/avanzada (R4) en este trabajo, sugieren que en P se “encenderían” menos genes que en L/Z. Además de que, como hemos mencionado, parte de los transcritos presentes en P inician su transcripción previamente, podría ocurrir que el nivel de transcripción de algunos o muchos de los genes específicos de P fuera muy elevado. En otras palabras, la superioridad transcripcional en P podría tener un carácter cuantitativo y no tanto cualitativo como ha sido sugerido en el pasado (Almstrup *et al.*, 2004; Shima *et al.*, 2004). Un ejemplo de ello podrían constituirlo las bandas diferenciales comunes a R3 y R4 (reflejo de genes encendidos en profase temprana que continuaron su expresión en profase media/avanzada), varias de las cuales mostraron una elevada intensidad para las células provenientes de la región R4.

El análisis de las secuencias de los fragmentos de transcritos reversos que han sido seleccionados para ser reamplificados, probablemente ayudará a aclarar la veracidad de estas hipótesis. Resultará de especial interés determinar la identidad de los transcritos reversos parciales específicos de R3, para comenzar a tejer nuevas hipótesis sobre sus posibles funciones en el metabolismo de los meiocitos durante la primera profase meiótica.

## **VI. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS**

- Hemos desarrollado un método de preparación de suspensiones celulares de testículo de roedores que reúne muchas características deseables como su sencillez, velocidad y alta reproducibilidad, y que conduce a la obtención de células testiculares viables bien disgregadas, aptas para su utilización en CMF. Además, la no utilización de enzimas disgregadoras ni de ARNasas durante el proceso, ha permitido la recuperación de macromoléculas de interés a partir de las células analizadas/clasificadas en el citómetro.
- Se analizó mediante CMF el establecimiento de la primera onda espermatogénica en *Cavia porcellus* lo que permitió confirmar que la mayor representación de meiocitos en L/Z observada en esta especie era consecuencia de su inusual extensión temporal y una mayor proporción de células que ingresan en forma muy precoz en meiosis. Asimismo, se pudo comprobar que la mayor duración en el cobayo de las divisiones meióticas, en general, y de L/Z, en particular, no se explican por la diferente duración del ciclo del epitelio seminífero en las otras especies estudiadas, sino que son desproporcionalmente más extensas.
- Hemos puesto a punto un protocolo para el análisis de suspensiones celulares de testículo de roedores mediante CMF en base a su contenido de ADN, tamaño y complejidad interna. El mismo ha sido, a su vez, optimizado para visualizar en cobayo a los meiocitos tempranos (L/Z) como una población separada de la de meiocitos medios a avanzados (P/D), distinción que no fue posible reproducir en material proveniente de rata o ratón en idénticas condiciones, y que fue de fundamental importancia para los objetivos del presente trabajo.
- La visualización en los gráficos citométricos de la población de L/Z permitió su selección en los gráficos para su posterior clasificación, en forma separada de los meiocitos P/D, con altos niveles de pureza, e incluso a partir de individuos adultos. Esto representó un logro muy significativo, considerando que la diferencia en el conocimiento molecular de las etapas de L/Z con respecto a P, es en gran parte una consecuencia de la disponibilidad diferencial de métodos para su purificación. Se trata del primer informe publicado de la obtención de meiocitos tempranos de mamífero en forma pura.

- Hemos podido recuperar el ARN total de las células clasificadas por FACS en cantidad y calidad suficientes para su empleo en estudios de expresión génica, en busca de secuencias génicas de expresión diferencial durante la premeiosis (2C), la profase meiótica temprana (R3) y la profase meiótica media a avanzada (R4). El análisis preliminar de las cantidades de bandas de ADNc diferenciales obtenidas con las 11 combinaciones de iniciadores ensayadas (que se estima cubrirían ~13% de los transcriptos presentes) indicó que aproximadamente la mitad de las bandas diferenciales específicas de meiosis serían comunes a profase meiótica temprana y media/tardía, mientras que ~1/3 de ellas serían específicas de profase temprana y ~1/5 específicas de profase media/tardía. Estos resultados podrían estar indicando, por primera vez, la existencia de un importante nivel de expresión génica durante la profase meiótica temprana de los mamíferos, datos que, complementados con otros, esperamos publicar en el futuro.

- Disponemos actualmente de un conjunto de bandas de ADNc correspondientes a genes que son diferencialmente expresados en el testículo del cobayo. Un subconjunto de éstas corresponde a las espermatogonias/células somáticas. El segundo subconjunto corresponde a las etapas tempranas de la profase meiótica, dividido a su vez entre genes que se “encienden” y “apagan” durante la misma y aquellos que mantienen su expresión hasta las etapas medias de la profase meiótica. Finalmente, el tercer subconjunto corresponde a genes cuya expresión corresponde a la profase meiótica media y/o tardía. Si bien nos proponemos abordar el estudio de todas estas bandas, interesan especialmente las correspondientes a las subpoblaciones R3 y R3/R4, cuya identidad (análisis de secuencias) será estudiada en los próximos meses. En conclusión, se dispone por primera vez de la información y las herramientas metodológicas para la realización de análisis de expresión génica tendientes a la identificación y caracterización de genes expresados durante las etapas iniciales de la profase meiótica en mamíferos adultos.

- Colateralmente, hemos demostrado que el IP en altas concentraciones ingresa a las células testiculares disgregadas mecánicamente, y disponemos de numerosas observaciones que indican que esas células son viables. Nuestra hipótesis es que el IP logra ingresar a las células vivas en la suspensión debido a

alteraciones a nivel de la permeabilidad de su membrana plasmática durante el procesamiento del tejido. Nuestros resultados, junto con algunos resultados puntuales obtenidos por otros grupos en microorganismos, contribuirían a derribar la conclusión de que el IP es incapaz de ingresar en células vivas no fijadas. Nos proponemos realizar experimentos tendientes a demostrar esta hipótesis, incluyendo cultivos de sobrevivencia de las células procesadas.

## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adelfalk C, Janschek J, Revenkova E, Blei C, Liebe B, Göb E, Alsheimer M, Benavente R, de Boer E, Novak I, Höög C, Scherthan H, Jessberger R. Cohesion SMC1beta protects telomeres in meocytes. *J Cell Biol* 187(2):185-199 (2009).
- Allers T, Lichten M. Differential timing and control of noncrossover and crossover recombination during meiosis. *Cell* 106:47-57 (2001).
- Almstrup K, Nielsen JE, Hansen MA, Tanaka M, Skakkeak NE, Leffers H. Analysis of cell-type-specific gene expression during mouse spermatogenesis. *Biol Reprod* 70:1751-1761 (2004).
- Alonso JM, Stepanova AN, Leisse TJ, Kim CJ, Chen H, Shinn P, Stevenson DK, Zimmerman J, Barajas P, Cheuk R, Gadrinab C, Heller C, Jeske A, Koesema E, Meyers CC, Parker H, Prednis L, Ansari Y, Choy N, Deen H, Geralt M, Hazari N, Hom E, Karnes M, Mulholland C, Ndubaku R, Schmidt I, Guzman P, Aguilar-Henonin L, Schmid M, Weigel D, Carter DE, Marchand T, Risseuw E, Brogden D, Zeko A, Crosby WL, Berry CC, Ecker JR. Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* 301:653–657 (2003).
- Alsheimer M. The dance floor of meiosis: evolutionary conservation of nuclear envelope attachments and dynamics of meiotic telomeres. *Genome Dyn* 5:81-93 (2009).
- Alsheimer M, Fecher E, Benavente R. Nuclear envelope remodelling during rat spermiogenesis: distribution and expression pattern of LAP2/thymopoietins. *J Cell Sci* 111(15):2227-2234 (1998).
- Anway MD, Li Y, Ravindranath N, Dym M, Griswold MD. Expression of testicular germ cell genes identified by differential display analysis. *J Androl.* 24(2):173-184 (2003).
- Aravindan GR, Ravindranath N, Gopalakrishnan K, Moudgal NR. DNA flow-cytometric analysis of testicular germ cell populations of the bonnet monkey (*Macaca radiata*) as a function of sexual maturity. *J Reprod Fertil* 89:397-406 (1990).
- Armstrong SJ, Jones GH. Meiotic cytology and chromosome behaviour in wild-type *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot* 54:1–10 (2003).
- Aslam H, Schneiders A, Perret M, Weinbauer GF, Hodges JK. Quantitative assessment of testicular germ cell production and kinematic and morphometric parameters of ejaculated spermatozoa in the grey lemur, *Microebus murinus*. *Reproduction* 123:323-332 (2002).

- Baudat F, Manova K, Yuen JP, Jasin M, Keeney S. Chromosome synapsis defects and sexually dimorphic meiotic progression in mice lacking Spo11. *Mol Cell* 6:989-998 (2000).
- Bechtold N, Ellis J, Pelletier G. *In planta Agrobacterium* mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. *C R Acad Sci Paris* 316:1194–1199 (1993).
- Beissbarth T, Borisevich I, Hörlein A, Kenzelmann M, Hergenahn M, Klewe-Nebenius A, Klären R, Korn B, Schmid W, Vingron M, Schütz G. Analysis of CREM-dependent gene expression during mouse spermatogenesis. *Mol Cell Endocrinol.* 212(1-2):29-39 (2003).
- Blanchard Y, Lavault MT, Querne D, Le Lannou D, Lobel B, Lescoat D. Preparation of spermatogenic cell populations at specific stages of differentiation in the human. *Mol Reprod Dev* 30:275-282 (1991).
- Blottner S, Schön J, Roelants H. Apoptosis is not the cause of seasonal testicular involution in roe deer. *Cell Tissue Res* 327:615-624 (2007).
- Bogdanov YF, Dadashev SY, Grishaeva TM. *In silico* search for functionally similar proteins involved in meiosis and recombination in evolutionarily distant organisms. *In Silico Biol* 3:173–185 (2003).
- Bolcun-Filas E, Costa Y, Speed R, Taggart M, Benavente R, De Rooij DG, Cooke HJ. SYCE2 is required for synaptonemal complex assembly, double strand break repair, and homologous recombination. *J. Cell Biol* 176:741-747 (2007).
- Bonilla E, Xu EY. Identification and characterization of novel mammalian spermatogenic genes conserved from fly to human. *Mol Hum Reprod* 14(3):137-142 (2008).
- Borde V, Robine N, Lin W, Bonfils S, Géli V, Nicolas A. Histone H3 lysine 4 trimethylation marks meiotic recombination initiation sites. *EMBO J* 28:99-111 (2009).
- Bowles J, Knight D, Smith C, Wilhelm D, Richman J, Mamiya S, Yashiro K, Chawengsaksophak K, Wilson MJ, Rossant J, Hamada H, Koopman P. Retinoid signaling determines germ cell fate in mice. *Science* 312: 596-600 (2006).
- Bowles J, Koopman P. Retinoic acid, meiosis and germ cell fate in mammals. *Development* 134:3401-3411 (2007).
- Braun RE, Behringer RR, Peschon JJ, Brinster RL, Palmiter RD. Genetically haploid spermatids are phenotypically diploid. *Nature* 337(6205):373-376 (1989).
- Buard J, Barthes P, Grey C., de Massy B. Distinct histone modifications define initiation and repair of meiotic recombination in the mouse. *EMBO J.* 27:2616-2624 (2009).

- Bucci LR, Brock WA, Johnson TS, Meistrich ML. Isolation and biochemical studies of enriched populations of spermatogonia and early primary spermatocytes from rat testes. *Biol Reprod* 34:195-206 (1986).
- Buonomo SB, Clyne RK, Fuchs J, Loidl J, Uhlmann F, Nasmyth K. Disjunction of homologous chromosomes in meiosis I depends on proteolytic cleavage of the meiotic cohesin Rec8 by separin. *Cell* 103(3):387-398 (2000).
- Carballo J, Johnson A, Sedgwick S, Cha R. Phosphorylation of the axial element protein Hop1 by Mec1/Tel1 ensures meiotic interhomolog recombination. *Cell* 132:758-770 (2008).
- Chan WY, Lee TL, Wu SM, Ruszczyc L, Alba D, Baxendale B, Rennert OM. Transcriptome analyses of male germ cells with serial analysis of gene expression (SAGE). *Mol Cell Endocrinol* 16:8-19 (2006).
- Chen C, Farmer AD, Langley RJ, Mudge J, Crow JA, May GD, Huntley J, Smith AG, Retzel EF. Meiosis-specific gene discovery in plants: RNA-Seq applied to isolated *Arabidopsis* male meiocytes. *BMC Plant Biology* 10:280 (2010).
- Chen C, Ouyang W, Grigura V, Zhou Q, Carnes K, Lim H, Zhao GQ, Arber S, Kurpios N, Murphy TL, Cheng AM, Hassell JA, Chandrashekar V, Hofmann MC, Hess RA, Murphy KM. ERM is required for transcriptional control of the spermatogonial stem cell niche. *Nature* 436(7053):1030-1034 (2005).
- Chikashige Y, Tsutsumi C, Yamane M, Okamasa K, Haraguchi T, Hiraoka Y. Meiotic proteins bqt1 and bqt2 tether telomeres to form the bouquet arrangement of chromosomes. *Cell* 125(1):59-69 (2006).
- Chu S, DeRisi J, Eisen M, Mulholland J, Botstein D, Brown PO, Herskowitz I. The transcriptional program of sporulation in budding yeast. *Science* 282:699-705 (1998).
- Churakov G, Sadasivuni MK, Rosenbloom KR, Huchon D, Brosius J, Schmitz J. Rodent evolution: back to the root. *Mol Biol Evol* 27(6):1315-1326 (2010).
- Clark NL, Aagaard JE, Swanson WJ. Evolution of reproductive proteins from animals and plants. *Reproduction* 131(1):11-22 (2006).
- Clausen OP, Abyholm T. Deoxyribonucleic acid flow cytometry of germ cells in the investigation of male infertility. *Fertil Steril* 34:369-374 (1980).
- Clausen OP, Parvinen M, Kirkhus B. Stage-related variations in DNA fluorescence distribution during rat spermatogenic cycle measured by flow cytometry. *Cytometry* 2:421-425 (1982).

- Clermont Y. Cycle of the seminiferous epithelium of the guinea pig. A method for identification of the stages. *Fertil Steril* 11:563-573 (1960).
- Clermont Y. The cycle of the seminiferous epithelium in man. *Am J Anat* 112:35-51 (1963).
- Cohen PE, Pollack SE, Pollard JW. Genetic analysis of chromosome pairing, recombination, and cell cycle control during first meiotic prophase in mammals. *Endocr Rev* 27:398-426 (2006).
- Colaiácovo MP. The many facets of SC function during *C. elegans* meiosis. *Chromosoma* 115(3):195-211 (2006).
- Conrad MN, Lee CY, Chao G, Shinohara M, Kosaka H, Shinohara A, Conchello JA, Dresser ME. Rapid telomere movement in meiotic prophase is promoted by NDJ1, MPS3, and CSM4 and is modulated by recombination. *Cell* 133(7):1175-1187 (2008).
- Cordelli ET, Eleuteri P, Leter G, Rescia M, Spano M. Flow cytometry applications in the evaluation of sperm quality: semen analysis, sperm function and DNA integrity. *Contraception* 72:273-279 (2005).
- Costa Y, Cooke HJ. Dissecting the mammalian synaptonemal complex using targeted mutations. *Chromosome Res* 15:579-589 (2007).
- Costa Y, Speed R, Ollinger R, Alsheimer M, Semple CA, Gautier P, Maratou K, Novak I, Höög C, Benavente R, Cooke HJ. Two novel proteins recruited by synaptonemal complex protein 1 (SYCP1) are at the centre of meiosis. *J Cell Sci* 118(12):2755-2762 (2005).
- Crismani W, Baumann U, Sutton T, Shirley N, Webster T, Spangenberg G, Langridge P, Able JA. Microarray expression analysis of meiosis and microsporogenesis in hexaploid bread wheat. *BMC Genomics* 7:267 (2006).
- Cromie GA, Smith GR. Branching out: meiotic recombination and its regulation. *Trends Cell Biol* 17:448-455 (2007).
- Culty M. Gonocytes, the forgotten cells of the germ cell lineage. *Birth Defects Res C Embryo Today* 87(1):1-26 (2009).
- Davey HM, Hexley P. Red but not dead? Membranes of stressed *Saccharomyces cerevisiae* are permeable to propidium iodide. *Environ Microbiol* 13(1):163-171 (2011).
- Davis L, Smith GR. Meiotic recombination and chromosome segregation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Proc Natl Acad Sci USA* 98(15):8395-8402 (2001).
- de Boer E, Heyting C. The diverse roles of transverse filaments of synaptonemal complexes in meiosis. *Chromosoma* 115:220-234 (2006).

- de Boer E, Lhuissier FGP, Heyting C. Cytological Analysis of Interference in Mouse Meiosis. En: *Meiosis*, Volumen 2: *Cytological Methods* (Scott Keeney, ed.). Humana Press. pp. 355-382. Springerprotocols.com. DOI 10.1007/978-1-60761-103-5\_21 (2009).
- De Iuliis GN, Thomson LK, Mitchell LA, Finnie JM, Koppers AJ, Hedges A, Nixon Brett, Aitken RJ. DNA damage in human spermatozoa is highly correlated with the efficiency of chromatin remodeling and the formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, a marker of oxidative stress. *Biol Reprod* 81:517-524 (2009).
- Deng W, Lin H. miwi, a murine homolog of piwi, encodes a cytoplasmic protein essential for spermatogenesis. *Dev Cell* 2(6):819-830 (2002).
- D'Erchia AM, Gissi C, Pesole G, Saccone C, Arnason U. The guinea-pig is not a rodent. *Nature* 381(6583):597-600 (1996).
- De Robertis EDP, De Robertis EMF. Biología celular y molecular. 10ª Ed. 613p. Buenos Aires: El Ateneo (1981).
- de Rooij DG. Proliferation and differentiation of spermatogonial stem cells. *Reproduction* 121:347-354 (2001).
- de Vries FA, de Boer E, van den Bosch M, Baarends WM, Ooms M, Yuan L, Liu JG, van Zeeland AA, Heyting C, Pastink A. Mouse *Sycp1* functions in synaptonemal complex assembly, meiotic recombination, and XY body formation. *Genes Dev* 19:1376-1389 (2005).
- Ding X, Xu R, Yu J, Xu T, Zhuang Y, Han M. SUN1 is required for telomere attachment to nuclear envelope and gametogenesis in mice. *Dev Cell* 12: 863-872 (2007).
- Dobson MJ, Pearlman RE, Karaiskakis A, Spyropoulos B, Moens PB. Synaptonemal complex proteins: occurrence, epitope mapping and chromosome disjunction. *J Cell Sci* 107(10):2749-2760 (1994).
- Dong H, Roeder GS. Organization of the yeast Zip1 protein within the central region of the synaptonemal complex. *J Cell Biol* 148(3):417-426 (2000).
- Doutriaux MP, Couteau F, Bergounioux C, White C. Isolation and characterisation of the RAD51 and DMC1 homologs from *Arabidopsis thaliana*. *Mol Gen Genet* 257:283-291 (1998).
- Druart X, Gatti JL, Huet S, Dacheux JL, Humblot P. Hypotonic resistance of boar spermatozoa: sperm subpopulations and relationship with epididymal maturation and fertility. *Reproduction* 137:205-213 (2009).
- Dym M. The male reproductive system. En: *Histology* (L. Weiss y R.O. Greep, eds.), 4ª Ed., pp 979-1038. New York: McGraw-Hill (1977).

- Dym M, Fawcett DW. Further observations on the numbers of spermatogonia, spermatocytes, and spermatids connected by intercellular bridges in the mammalian testis. *Biol Reprod* 4(2):195-215 (1971).
- Eijpe M, Offenberg H, Jessberger R, Revenkova E, Heyting C. Meiotic cohesin REC8 marks the axial elements of rat synaptonemal complexes before cohesins SMC1beta and SMC3. *J Cell Biol* 160(5):657-670 (2003).
- Elliott D. Pathways of post-transcriptional gene regulation in mammalian germ cell development. *Cytogenet Genome Res* 103(3-4):210-216 (2003).
- Ellis PJ, Furlong RA, Conner SJ, Kirkman-Brown J, Afnan M, Barratt C, Griffin DK, Affara NA. Coordinated transcriptional regulation patterns associated with infertility phenotypes in men. *J Med Genet* 44:498-508 (2007).
- Esponda P, Giménez-Martín G. The attachment of the synaptonemal complex to the nuclear envelope. *Chromosoma* 38:405-417 (1972).
- Evenson DP, Kasperson K, Wixon RL. Analysis of sperm DNA fragmentation using flow cytometry and other techniques. *Soc Reprod Fertil Suppl* 65:93-113 (2007).
- Falciatori I, Borsellino G, Haliassos N, Boitani C, Corallini S, Battistini L, Bernardi G, Stefanini M, Vicini E. Identification and enrichment of spermatogonial stem cells displaying side-population phenotype in immature mouse testis. *FASEB J* 18:376-378 (2004).
- Fawcett DW, Ito S, Slautterback D. The occurrence of intercellular bridges in groups of cells exhibiting synchronous differentiation. *J Biophys Biochem Cytol.* 5(3):453-460 (1959).
- Feig C, Kirchhoff C, Ivell R, Naether O, Schulze W, Spiess AN. A new paradigm for profiling testicular gene expression during normal and disturbed human spermatogenesis. *Hum Molec Reprod* 13:33-43 (2007).
- Feldmann KA, Marks MD. *Agrobacterium* mediated transformation of germinating seeds of *Arabidopsis thaliana*: a non-tissue culture approach. *Mol Gen Genet* 208:1-9 (1987).
- Firooznia A, Revenkova E, Jessberger R. From the XXVII North American Testis Workshop: the function of SMC and other cohesin proteins in meiosis. *J Androl* 26(1):1-10 (2005).
- Fujii T, Tamura K, Masai K, Tanaka H, Nishimune Y, Nojima H. Use of stepwise subtraction to comprehensively isolate mouse genes whose transcription is up-regulated during spermiogenesis. *EMBO Rep* 3(4):367-372 (2002).
- Fujita K, Ohta H, Tsujimura A, Takao T, Miyagawa Y, Takada S, Matsumiya K, Wakayama T, Okuyama A. Transplantation of spermatogonial stem cells isolated from leukemic mice restores fertility without inducing leukemia. *J Clin Invest* 115:1855-1860 (2005).

- Fujita K, Tsujimura A, Miyagawa Y, Kiuchi H, Matsuoka Y, Takao T, Takada S, Nonomura N, Okuyama A. Isolation of germ cells from leukemia and lymphoma cells in a human *in vitro* model: potential clinical application for restoring human fertility after anticancer therapy. *Cancer Res* 66:11166-11171 (2006).
- Fukuda T, Daniel K, Wojtasz L, Toth A, Höög C. A novel mammalian HORMA domain-containing protein, HORMAD1, preferentially associates with unsynapsed meiotic chromosomes. *Exp Cell Res* 316:158-171 (2010).
- Furnes B, Schimenti J. Fast forward to new genes in mammalian reproduction. *J Physiol* 578(1):25-32 (2007).
- Garner DL. Flow cytometric sexing of mammalian sperm. *Theriogenology* 65:943-957 (2006).
- Garrido N, Meseguer M, Remohi J, Pellicer A, Simón C. Flow cytometry in human reproductive biology. *Gynecol Endocrinol* 16:505-521 (2002).
- Geisinger A. Expresión génica diferencial durante la espermatogénesis de la rata. Tesis de Doctorado, PEDECIBA Biología, UdelaR. 148p. (2003)
- Geisinger A, Alsheimer M, Wettstein R, Benavente R. The mammalian gene pecanex-1 is differentially expressed during spermatogenesis. *Biochim Biophys Acta* 1728:34-43 (2005).
- Geisinger A, Dos Santos A, Benavente R, Wettstein R. Identification and characterization of Srsp1, a rat gene differentially expressed during spermatogenesis and coding for a serine stretch-containing protein. *Cytogenet Genome Res* 98:249-254 (2002).
- Geisinger A, Rodríguez-Casuriaga R. Flow cytometry for gene expression studies in mammalian spermatogenesis. *Cytogenet Genome Res* 128:46-56 (2010).
- Geisinger A, Wettstein R, Benavente R. Stage-specific gene expression during rat spermatogenesis: application of the mRNA differential display method. *Int J Dev Biol* 40:385-388 (1996).
- Go VLW, Vernon RG, Fritz IB. Studies on spermatogenesis in rats. I. Application of the sedimentation velocity technique to an investigation of spermatogenesis. *Can J Biochem* 49:753-760 (1971).
- Göb E, Schmitt J, Benavente R, Alsheimer M. Mammalian sperm head formation involves different polarization of two novel LINC complexes. *PLoS One* 5(8):e12072 (2010).
- Golan R, Weissenberg R, Oschry Y, Shochat L, Lewin LM. Spermatogenesis in the golden hamster during the first spermatogenic wave: a flow cytometric analysis. *Mol Reprod Dev* 55(2):205-211 (2000).

- Graur D, Hide WA, Li WH. Is the guinea-pig a rodent? *Nature* 351(6328):649-652 (1991).
- Gregan J, Rabitsch PK, Rumpf C, Novatchkova M, Schleiffer A, Nasmyth K. High-throughput knockout screen in fission yeast. *Nat Protoc* 1(5):2457-2464 (2006).
- Grogan WM, Farnham WF, Sabau JM. DNA analysis and sorting of viable mouse testis cells. *J Histochem Cytochem* 29:738-746 (1981).
- Guillon H, Baudat F, Grey C, Liskay RM, de Massy B. Crossover and noncrossover pathways in mouse meiosis. *Mol Cell* 20:563-573 (2005).
- Hamano KI. Sex preselection in bovine by separation of X- and Y-chromosome bearing spermatozoa. *J Reprod Dev* 53:27-38 (2007).
- Hamer G, Gell K, Kouznetsova A, Novak I, Benavente R, Höög C. Characterization of a novel meiosis-specific protein within the central element of the synaptonemal complex. *J Cell Sci* 119(19):4025-4032 (2006).
- Hamer G, Wang H, Bolcun-Filas E, Cooke HJ, Benavente R, Höög C. Progression of meiotic recombination requires structural maturation of the central element of the synaptonemal complex. *J Cell Sci* 121:2445-2451 (2008).
- Handel MA, Schimenti JC. Genetics of mammalian meiosis: regulation, dynamics and impact on fertility. *Nat Rev Genet* 11(2):124-136 (2010).
- Harper L, Golubovskaya I, Cande WZ. A bouquet of chromosomes. *J Cell Sci* 117:4025-4032 (2004).
- Hermann BP, Sukhwani M, Simorangkir DR, Chu T, Plant TM, Orwig KE. Molecular dissection of the male germ cell lineage identifies putative spermatogonial stem cells in rhesus macaques. *Human Reprod* 24:1704-1716 (2009).
- Heyting C. Synaptonemal complexes: structure and function. *Curr Opin Cell Biol* 8(3):389-396 (1996).
- Heyting C, Dietrich AJ, Moens PB, Dettmers RJ, Offenberger HH, Redeker EJ, Vink AC. Synaptonemal complex proteins. *Genome* 31(1):81-87 (1989).
- Higgins JD, Armstrong SJ, Franklin FCH, Jones GH. The *Arabidopsis* MutS homolog AtMSH4 functions at an early step in recombination: evidence for two classes of recombination in *Arabidopsis*. *Genes Dev* 18:2557-2570 (2004).
- Higgins JD, Sánchez-Morán E, Armstrong SJ, Jones GH, Franklin FCH. The *Arabidopsis* synaptonemal complex protein ZYP1 is required for chromosome synapsis and normal fidelity of crossing over. *Genes Dev* 19:2488-2500 (2005).
- Hittmair A, Rogatsch H, Mikuz G, Feichtinger H. Quantification of spermatogenesis by dual-parameter flow cytometry. *Fertil Steril* 61:746-750 (1994).

- Hittmair A, Rogatsch H, Offner F, Feichtinger H, Ofner D, Mikuz G. Deoxyribonucleic acid flow cytometry and semiquantitative histology of spermatogenesis: a comparative study. *Fertil Steril* 58:1040-1045 (1992).
- Hochwagen A, Amon A. Checking your breaks: surveillance mechanisms of meiotic recombination. *Curr Biol* 16(6):217-228 (2006).
- Hofmann MC, Narisawa S, Hess RA, Millán JL. immortalization of germ cells and somatic testicular cells using the SV40 large T antigen. *Exp Cell Res* 201:417-435 (1992).
- Hollingsworth NM, Goetsch L, Byers B. The HOP1 gene encodes a meiosis-specific component of yeast chromosomes. *Cell* 61(1):73-84 (1990).
- Hollingsworth NM, Johnson AD. A conditional allele of the *Saccharomyces cerevisiae* HOP1 gene is suppressed by overexpression of two other meiosis-specific genes: RED1 and REC104. *Genetics* 133(4):785-797 (1993).
- Hong S, Choi I, Woo JM, Oh J, Kim T, Choi E, Kim TW, Jung YK, Kim DH, Sun CH, Yi GS, Eddy EM, Cho C. Identification and integrative analysis of 28 novel genes specifically expressed and developmentally regulated in murine spermatogenic cells. *J Biol Chem* 280(9):7685-7693 (2005).
- Hotta Y, Tabata S, Stubbs L, Stern H. Meiosis-specific transcripts of a DNA component replicated during chromosome pairing: homology across the phylogenetic spectrum. *Cell* 40:785-793 (1985).
- Huang MD, Wei FJ, Wu CC, Hsing YI, Huang AH. Analyses of advanced rice anther transcriptomes reveal global tapetum secretory functions and potential proteins for lipid exine formation. *Plant Physiol* 149(2):694-707 (2009).
- Huang X, Li J, Lu L, Xu M, Xiao J, Yin L, Zhu H, Zhou Z, Sha J. Novel development-related alternative splices in human testis identified by cDNA microarrays. *J Androl* 26:189-196 (2005).
- Hunt PA. Meiosis in mammals: recombination, non-disjunction and the environment. *Biochem Soc Transact* 34:574-577 (2006).
- Iguchi N, Tobias JW, Hecht NB. Expression profiling reveals meiotic male germ cell mRNAs that are translationally up- and down-regulated. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:7712-7717 (2006).
- Jagetia GC, Jyothi P, Krishnamurthy H. Flow cytometric evaluation of the effect of various doses of vindesine sulphate on mouse spermatogenesis. *Reprod Toxicol* 11:867-874 (1997).

- Jagetia GC, Krishnamurthy H, Jyothi P. Evaluation of cytotoxic effects of different doses of vinblastine on mouse spermatogenesis by flow cytometry. *Toxicology* 112:227-236 (1996).
- Jambhekar A, Amon A. Control of meiosis by respiration. *Curr Biol* 18:969-975 (2008).
- Janca FC, Jost LK, Evenson DP. Mouse testicular and sperm cell development characterized from birth to adulthood by dual parameter flow cytometry. *Biol Reprod* 34:613-623 (1986).
- Jeyaraj DA, Grossman G, Weaver C, Petrus P. Dynamics of testicular germ cell proliferation in normal mice and transgenic mice overexpressing rat androgen-binding protein: a flow cytometric evaluation. *Biol Reprod* 66:877-885 (2002).
- Jyothi P, Jagetia GC, Krishnamurthy H. Evaluation of teniposide (VM-26)-induced toxicity on mouse spermatogenesis by flow cytometry. *Toxicology* 163:163-174 (2001).
- Kato M, Makino S, Kimura H, Ota T, Furuhashi T, Nagamura Y. Evaluation of mitochondrial function and membrane integrity by dual fluorescent staining for assessment of sperm status in rats. *J Toxicol Sci* 27(1):11-18 (2002).
- Kassir Y, Adir N, Boger-Nadjar E, Raviv NG, Rubin-Bejerano I, Sagee S, Shenhar G. Transcriptional regulation of meiosis in budding yeast. *Int Rev Cytol* 224 111-171 (2003).
- Kassir Y, Granot D, Simchen G. *IME1*, a positive regulator gene of meiosis in *S. cerevisiae*. *Cell* 52:853-862 (1988).
- Kimble J, Crittenden SL. Controls of germline stem cells, entry into meiosis, and the sperm/oocyte decision in *Caenorhabditis elegans*. *Annu Rev Cell Dev Biol* 23:405-433 (2007).
- Kleckner N. Chiasma formation: chromatin/axis interplay and the role(s) of the synaptonemal complex. *Chromosoma* 115:175-194 (2006).
- Klimyuk VI, Jones JDG. AtDMC1, the *Arabidopsis* homologue of the yeast DMC1 gene: characterization, transposon-induced allelic variation and meiosis-associated expression. *Plant J* 11:1-14 (1997).
- Kniewel R, Keeney S. Histone methylation sets the stage for meiotic DNA breaks. *EMBO J* 28:81-83 (2009).
- Kostakopoulos A, Georgoulakis J, Deliveliotis C, Spanakis G, Filippidou A, Tamvakis N. Deoxyribonucleic acid flow cytometry in the assessment of spermatogenesis. *J Urol* 158:79-81 (1997).

- Koszul R, Kim KP, Prentiss M, Kleckner N, Kameoka S. Meiotic chromosomes move by linkage to dynamic actin cables with transduction of force through the nuclear envelope. *Cell* 133(7):1188-1201 (2008).
- Kotaja N, Kimmins S, Brancorsini S, Hentsch D, Vonesch JL, Davidson I, Parvinen M, Sassone-Corsi P. Preparation, isolation and characterization of stage-specific spermatogenic cells for cellular and molecular analysis. *Nat Methods* 1:249-254 (2004).
- Koubova J, Menke DB, Zhou Q, Capel B, Griswold MD, Page DC. Retinoic acid regulates sex-specific timing of meiotic initiation in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:2474-2479 (2006).
- Kralewski M, Novello A, Benavente R. A novel Mr 77,000 protein of the XY body of mammalian spermatocytes: its localization in normal animals and in Searle's translocation carriers. *Chromosoma* 106(3):160-167 (1997).
- Kriegs JO, Churakov G, Kiefmann M, Jordan U, Brosius J, Schmitz J. Retroposed elements as archives for the evolutionary history of placental mammals. *PLoS Biol* 4(4):e91 (2006).
- Kumar R, Bourbon HM, de Massy B. Functional conservation of Mei4 for meiotic DNA double-strand break formation from yeasts to mice. *Genes Dev* 24(12):1266-1280 (2010).
- Lam DMK, Furrer R, Bruce WR. The separation, physical characterization, and differentiation kinetics of spermatogonial cells of the mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* 65:192-199 (1970).
- Lammers JH, Offenberg HH, van Aalderen M, Vink AC, Dietrich AJ, Heyting C. The gene encoding a major component of the lateral elements of synaptonemal complexes of the rat is related to X-linked lymphocyte-regulated genes. *Mol Cell Biol* 14(2):1137-1146 (1994).
- Lassalle B, Bastos H, Louis JP, Riou L, Testart J, Dutrillaux B, Fouchet P, Allemand I. 'Side Population' cells in adult mouse testis express Bcrp1 gene and are enriched in spermatogonia and germinal stem cells. *Development* 131(2):479-487 (2004).
- Leblond CP, Clermont Y. Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. *Ann N Y Acad Sci* 55:548-573 (1952).
- Lee DR, Kaproth MT, Parks JE. *In vitro* production of haploid germ cells from fresh or frozen-thawed testicular cells of neonatal bulls. *Biol Reprod* 65:873-878 (2001).
- Lee JH, Gye MC, Choi KW, Hong JY, Lee YB, Park DW, Lee SJ, Min CK. *In vitro* differentiation of germ cells from nonobstructive azoospermic patients using three-dimensional culture in a collagen gel matrix. *Fertil Steril* 84:824-833 (2007).

- Lee JH, Kim HJ, Kim H, Lee SJ, Gye MC. *In vitro* spermatogenesis by three-dimensional culture of rat testicular cells in collagen gel matrix. *Biomaterials* 27:2845-2853 (2006).
- Lee JH, Oh JH, Lee JH, Kim MR, Min CK. Evaluation of *in vitro* spermatogenesis using poly (D,L-lactic-co-glycolic acid) (PLGA)-based macroporous biodegradable scaffolds. *J Tissue Eng Regen Med* 5(2):130-137 (2011).
- Lei K, Zhang X, Ding X, Guo X, Chen M, Zhu B, Xu T, Zhuang Y, Xu R, Han M. SUN1 and SUN2 play critical but partially redundant roles in anchoring nuclei in skeletal muscle cells in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 106(25):10207-10212 (2009).
- Lessard C, Pendola JK, Hartford SA, Schimenti JC, Handel MA, Eppig JJ. New mouse genetic models for human contraceptive development. *Cytogenet Genome Res* 105(2-4):222-227 (2004).
- Liang P, Pardee AB. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* 257(5072):967-971 (1992).
- Liang P, Zhu W, Zhang X, Guo Z, O'Connell RP, Averboukh L, Wang F, Pardee AB. Differential display using one-base anchored oligo-dT primers. *Nucleic Acids Res* 22(25):5763-5764 (1994).
- Libby BJ, Reinholdt LG, Schimenti JC. Positional cloning and characterization of *Mei1*, a vertebrate-specific gene required for normal meiotic chromosome synapsis in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:15706-15711 (2003).
- Lin Y, Gill ME, Koubova J, Page DC. Germ cell-intrinsic and -extrinsic factors govern meiotic initiation in mouse embryos. *Science* 322:1685-1687 (2008).
- Lin Z, Kong H, Nei M, Ma H. Origins and evolution of the *recA/RAD51* gene family: evidence for ancient gene duplication and endosymbiotic gene transfer. *Proc Natl Acad Sci USA* 103(27):10328-10333 (2006).
- Liu JG, Yuan L, Brundell E, Björkroth B, Daneholt B, Höög C. Localization of the N-terminus of SCP1 to the central element of the synaptonemal complex and evidence for direct interactions between the N-termini of SCP1 molecules organized head-to-head. *Exp Cell Res* 226(1):11-19 (1996).
- Liu L, Franco S, Spyropoulos B, Moens PB, Blasco MA, Keefe DL. Irregular telomeres impair meiotic synapsis and recombination in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:6496-6501 (2004).
- Luk JM, Mok BW, Shum CK, Yeung WS, Tam PC, Tse JY, Chow JF, Woo J, Kam K, Lee KF. Identification of novel genes expressed during spermatogenesis in stage-synchronized rat testes by differential display. *Biochem Biophys Res Commun* 307(4):782-790 (2003).

- Ma J, Duncan D, Morrow DJ, Fernandes J, Walbot V. Transcriptome profiling of maize anthers using genetic ablation to analyze pre-meiotic and tapetal cell types. *Plant J* 50(4):637-648 (2007).
- Mahadevaiah SK, Turner JM, Baudat F, Rogakou EP, de Boer P, Blanco-Rodríguez J, Jasin M, Keeney S, Bonner WM, Burgoyne PS. Recombinational DNA double-strand breaks in mice precede synapsis. *Nature Genet* 27:271-276 (2001).
- Maleki S, Neale MJ, Arora C, Henderson KA, Keeney S. Interactions between Mei4, Rec114, and other proteins required for meiotic DNA double-strand break formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Chromosoma* 116:471-486 (2007).
- Malkov M, Fisher Y, Don J. Developmental schedule of the postnatal rat testis determined by flow cytometry. *Biol Reprod* 59:84-92 (1998).
- Maratou K, Forster T, Costa Y, Taggart M, Speed RM, Ireland J, Teague P, Roy D, Cooke HJ. Expression profiling of the developing testis in wild-type and *Dazl* knockout mice. *Molec Reprod Dev* 67:26-54 (2004).
- Marchesi DE, Feng HL, Hershlag A. Current assessment of sperm DNA integrity. *Arch Androl* 53:239-247 (2007).
- Martignetti JA, Brosius J. Neural BC1 RNA as an evolutionary marker: guinea pig remains a rodent. *Proc Natl Acad Sci USA* 90(20):9698-9702 (1993).
- Martínez-Pastor F, Fernández-Santos MR, del Olmo E, Domínguez-Rebolledo AE, Estes MC, Montoro V, Garde JJ. Mitochondrial activity and forward scatter vary in necrotic, apoptotic and membrane-intact spermatozoan subpopulations. *Reprod Fertil Dev* 20:547-556 (2008).
- Mata J, Lyne R, Burns G, Bahler J. The transcriptional program of meiosis and sporulation in fission yeast. *Nature Genet* 32:143-147 (2002).
- Mays-Hoopers LL, Bolen J, Riggs AD, Singer-Sam J. Preparation of spermatogonia, spermatocytes, and round spermatids for analysis of gene expression using fluorescence-activated cell sorting. *Biol Reprod* 53:1003-1011 (1995).
- Meistrich ML. Separation of mouse spermatogenic cells by velocity sedimentation. *J Cell Physiol* 80(2):299-312 (1972).
- Meistrich ML. Separation of spermatogenic cells and nuclei from rodent testes. *Methods Cell Biol* 15:15-54 (1977).
- Meistrich ML, Bruce WR, Clermont Y. Cellular composition of fractions of mouse testis cells following velocity sedimentation separation. *Exp Cell Res* 79:213-227 (1973).

- Meistrich ML, Lake S, Steinmetz LL, Gledhill BL. Flow cytometry of DNA in mouse sperm and testis nuclei. *Mutat Res* 49:383-396 (1978).
- Meistrich ML, Longtin J, Brock WA, Grimes SR, Mace ML. Purification of rat spermatogenic cells and preliminary biochemical analysis of these cells. *Biol Reprod* 25:1065-1077 (1981).
- Mercier R, Jolivet S, Vezon D, Huppe E, Chelysheva L, Giovanni M, Nogu   F, Doutriaux M, Horlow C, Grelon G. Two meiotic crossover classes cohabit in *Arabidopsis*: one is dependent on MER3, whereas the other one is not. *Curr Biol* 15:692-701 (2005).
- Meuwissen RL, Offenberg HH, Dietrich AJ, Riesewijk A, van Iersel M, Heyting C.. A coiled-coil related protein specific for synapsed regions of meiotic prophase chromosomes. *EMBO J* 11:5091-5100 (1992).
- Miki F, Kurabayashi A, Tange Y, Okazaki K, Shimanuki M, Niwa O. Two-hybrid search for proteins that interact with Sad1 and Kms1, two membrane-bound components of the spindle pole body in fission yeast. *Mol Genet Genomics* 270(6):449-461 (2004).
- Moens PB, Marcon E, Shore JS, Kochakpour N, Spyropoulos B. Initiation and resolution of interhomolog connections: crossover and non-crossover sites along mouse synaptonemal complexes. *J Cell Sci* 120(6):1017-1027 (2007).
- Moses MJ. Synaptonemal complex. *Annu Rev Genet* 2:363-412 (1968).
- Munroe RJ, Bergstrom RA, Zheng QY, Libby B, Smith R, John SW, Schimenti KJ, Browning VL, Schimenti JC. Mouse mutants from chemically mutagenized embryonic stem cells. *Nat Genet* 24(3):318-321 (2000).
- Murakami H, Keeney S. Regulating the formation of DNA double-strand breaks in meiosis. *Genes Dev* 22:286-292 (2008).
- Neubauer K, Jewgenow K, Blottner S, Wildt DE, Pukazhenthil BS. Quantity rather than quality in teratospermic males: a histomorphometric and flow cytometric evaluation of spermatogenesis in the domestic cat (*Felis catus*). *Biol Reprod* 71:1517-1524 (2004).
- Niu H, Wan L, Baumgartner B, Schaefer D, Loidl J, Hollingsworth NM. Partner choice during meiosis is regulated by Hop1-promoted dimerization of Mek1. *Mol Biol Cell* 16:5804-5818 (2005).
- Offenberg HH, Dietrich AJ, Heyting C. Tissue distribution of two major components of synaptonemal complexes of the rat. *Chromosoma* 101(2):83-91 (1991).
- Offenberg HH, Schalk JA, Meuwissen RL, van Aalderen M, Kester HA, Dietrich AJ, Heyting C. SCP2: a major protein component of the axial elements of synaptonemal complexes of the rat. *Nucleic Acids Res* 26(11):2572-2579 (1998).

- Ojha P, Dhar JD, Dwivedi AK, Singh RL, Gupta G. Rat testicular germ cell type(s) targeted by anti-spermatogenic agents *in vivo* and their recovery on withdrawal of treatment—a flow cytometric study. *Anim Reprod Sci* 103:135-148 (2008).
- Oskam IC, Ropstad E, Andersen Berg K, Fredriksen B, Larsen S, Dahl E, Andresen O. Testicular germ cell development in relation to 5 $\alpha$ -androstenone levels in pubertal entire male pigs. *Theriogenology* 69(8):967-976 (2008).
- Osman K, Sánchez-Morán E, Higgins JD, Jones GH, Franklin FC. Chromosome synapsis in *Arabidopsis*: analysis of the transverse filament protein ZYP1 reveals novel functions for the synaptonemal complex. *Chromosoma* 115(3):212-219 (2006).
- Ostergaard L, Yanofsky MF. Establishing gene function by mutagenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 39:682–696 (2004).
- Page SL, Hawley RS. The genetics and molecular biology of the synaptonemal complex. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20:525-558 (2004).
- Paigen K, Szatkiewicz JP, Sawyer K, Leahy N, Parvanov ED, Ng SH, Graber JH, Broman KW, Petkov PM. The recombinational anatomy of a mouse chromosome. *PLoS Genet* 4:e1000119 (2008).
- Pang AL, Taylor HC, Johnson W, Alexander S, Chen Y, Su YA, Li X, Ravindranath N, Dym M, Rennert OM, Chan WY. Identification of differentially expressed genes in mouse spermatogenesis. *J Androl* 24(6):899-911 (2003).
- Pelttari J, Hoja MR, Yuan L, Liu JG, Brundell E, Moens P, Santucci-Darmanin S, Jessberger R, Barbero JL, Heyting C, Höög C. A meiotic chromosomal core consisting of cohesin complex proteins recruits DNA recombination proteins and promotes synapsis in the absence of an axial element in mammalian meiotic cells. *Mol Cell Biol* 21(16):5667-5677 (2001).
- Petit JM, Ratinaud MH, Cordelli E, Spano M, Julien R: Mouse testis cell sorting according to DNA and mitochondrial changes during spermatogenesis. *Cytometry* 19:304-312 (1995).
- Petronczki M, Chwalla B, Siomos MF, Yokobayashi S, Helmhart W, Deutschbauer AM, Davis RW, Watanabe Y, Nasmyth K. Sister-chromatid cohesion mediated by the alternative RF-CCtf18/Dcc1/Ctf8, the helicase Chl1 and the polymerase-alpha-associated protein Ctf4 is essential for chromatid disjunction during meiosis II. *J Cell Sci* 117(16):3547-3559 (2004).
- Pfeiffer C, Thomsen PD, Scherthan H. Centromere and telomere redistribution precedes homologue pairing and terminal synapsis initiation during prophase I of cattle spermatogenesis. *Cytogenet Cell Genet* 93:304-314 (2001).

- Plug AW, Xu J, Reddy G, Golub EI, Ashley T. Presynaptic association of Rad51 protein with selected sites in meiotic chromatin. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:5920-5924 (1996).
- Prieto I, Suja JA, Pezzi N, Kremer L, Martínez-A C, Rufas JS, Barbero JL. Mammalian STAG3 is a cohesin specific to sister chromatid arms in meiosis I. *Nat Cell Biol* 3(8):761-766 (2001).
- Primig M, Williams RM, Winzeler EA, Tevzadze GG, Conway AR, Hwang SY, Davis RW, Esposito RE. The core meiotic transcriptome in budding yeasts. *Nat Genet* 26(4):415-423 (2000).
- Rath D, Johnson LA. Application and commercialization of flow cytometrically sex-sorted semen. *Reprod Domest Anim* 43(2):338-346 (2008).
- Razafsky D, Hodzic D. Bringing KASH under the SUN: the many faces of nucleo-cytoskeletal connections. *J Cell Biol* 186(4):461-472 (2009).
- Revenkova E, Eijpe M, Heyting C, Hodges CA, Hunt PA, Liebe B, Scherthan H, Jessberger R. Cohesin SMC1 $\beta$  is required for meiotic chromosome dynamics, sister chromatid cohesion and DNA recombination. *Nature Cell Biol* 6:555-562 (2004).
- Rice WR, Chippindale AK. Sexual recombination and the power of natural selection. *Science* 294:555-559 (2001).
- Rodríguez-Casuriaga R. Espermatogénesis de *Cavia porcellus*. Su evaluación como modelo para el análisis molecular de la profase meiótica temprana y la localización de componentes proteicos de la envoltura nuclear. Tesis de Maestría, PEDECIBA Biología, UdelAR. 61p. (2000).
- Rodríguez-Casuriaga R, Geisinger A, López-Carro B, Porro V, Wettstein R, Folle GA. Ultrafast and optimized method for the preparation of rodent testicular cells for flow cytometric analysis. *Biol Proced Online* 11:184-195 (2009).
- Rodríguez-Casuriaga R, Geisinger A, Santiñaque FF, López-Carro B, Folle GA. High-purity flow sorting of early meiocytes based on DNA analysis of guinea pig spermatogenic cells. *Cytometry A* 79(8):625-634 (2011).
- Rodríguez R, Wettstein R. Quantitative study on guinea pig spermatogenesis shows a relative high percentage of early meiotic prophase stages. *Anat Rec* 278:493-504 (2004).
- Roeder GS, Bailis JM. The pachytene checkpoint. *Trends Genet* 16:395-403 (2000).
- Romanienko PJ, Camerini-Otero RD. The mouse *Spo11* gene is required for meiotic chromosome synapsis. *Mol Cell* 6:975-987 (2000).

- Romrell LJ, Bellvé AR, Fawcett DW. Separation of mouse spermatogenic cells by sedimentation velocity. *Dev Biol* 19:119-131 (1976).
- Rossi P, Dolci S, Sette C, Capolunghi F, Pellegrini M, Loiarro M, Di Agostino S, Paronetto MP, Grimaldi P, Merico D, Martegani E, Geremia R. Analysis of the gene expression profile of mouse male meiotic germ cells. *Gene Expr Patt* 4:267-281 (2004).
- Ryu BY, Kubota H, Avarbock MR, Brinster RL. Conservation of spermatogonial stem cell self-renewal signaling between mouse and rat. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:14302-14307 (2005).
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. 3 vol. New York: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Scherthan H. A bouquet makes ends meet. *Nature Rev Mol Cell Biol* 2:621-627 (2001).
- Scherthan H. Telomere attachment and clustering during meiosis. *Cell Mol Life Sci* 64(2):117-124 (2007).
- Schlecht U, Demougin P, Koch R, Hermida L, Wiederkehr C, Descombes P, Pineau C, Jégou B, Primig M. Expression profiling of mammalian male meiosis and gametogenesis identifies novel candidate genes for roles in the regulation of fertility. *Mol Biol Cell* 15:1031-1043 (2004).
- Schmekel K, Daneholt B. The central region of the synaptonemal complex revealed in three dimensions. *Trends Cell Biol* 5(6):239-242 (1995).
- Schmekel K, Meuwissen RL, Dietrich AJ, Vink AC, van Marle J, van Veen H, Heyting C. Organization of SCP1 protein molecules within synaptonemal complexes of the rat. *Exp Cell Res* 226:20-30 (1996).
- Schmitt J, Benavente R, Hodzic D, Höög C, Stewart CL, Alsheimer M. Transmembrane protein Sun2 is involved in tethering mammalian meiotic telomeres to the nuclear envelope. *Proc Natl Acad Sci USA* 104(18):7426-7431 (2007).
- Schramm S, Fraune J, Naumann R, Hernandez-Hernandez A, Höög C, Cooke HJ, Alsheimer M, Benavente R. A novel mouse synaptonemal complex protein is essential for loading of central element proteins, recombination, and fertility. *PLoS Genet* 7(5): doi:10.1371/journal.pgen.1002088 (2011).
- Schultz N, Hamra FK, Garbers DL. A multitude of genes expressed solely in meiotic or postmeiotic spermatogenic cells offers a myriad of contraceptive targets. *Proc Natl Acad Sci USA* 100(21):12201-12206 (2003).

- Sha J, Zhou Z, Li J, Yin L, Yang H, Hu G, Luo M, Chan HC, Zhou K. Identification of testis development and spermatogenesis-related genes in human and mouse testes using cDNA arrays. *Mol Hum Reprod* 8(6):511-517 (2002).
- Sharpe JC, Evans KM. Advances in flow cytometry for sperm sexing. *Theriogenology* 71:4-10 (2009).
- Shi L, Günther S, Hübschmann T, Wick LY, Harms H, Müller S. Limits of propidium iodide as a cell viability indicator for environmental bacteria. *Cytometry A* 71(8):592-598 (2007).
- Shima JE, McLean DJ, McCarrey JR, Griswold MD. The murine testicular transcriptome: characterizing gene expression in the testis during the progression of spermatogenesis. *Biol Reprod* 71:319-330 (2004).
- Shinkai Y, Satoh H, Takeda N, Fukuda M, Chiba E, Kato T, Kuramochi T, Araki Y. A testicular germ cell-associated serine-threonine kinase, MAK, is dispensable for sperm formation. *Mol Cell Biol* 22:3276-3280 (2002).
- Shinohara T, Orwig KE, Avarbock MR, Brinster RL. Spermatogonial stem cell enrichment by multiparameter selection of mouse testis cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:8346-8351 (2000).
- Smith A, Benavente R. Identification of a short nuclear lamin protein selectively expressed during meiotic stages of rat spermatogenesis. *Differentiation* 52(1):55-60 (1992a).
- Smith A, Benavente R. Identification of a structural protein component of rat synaptonemal complexes. *Exp Cell Res* 198(2):291-297 (1992b).
- Sofikitis N, Pappas E, Kawatani A, Baltogiannis D, Loutradis D, Kanakas N, Giannakis D, Dimitriadis F, Tsoukanelis K, Georgiou I, Makrydimas G, Mio Y, Tarlatzis V, Melekos M, Miyagawa I. Efforts to create an artificial testis: culture systems of male germ cells under biochemical conditions resembling the seminiferous tubular biochemical environment. *Hum Reprod Update* 11:229-259 (2005).
- Spano M, Evenson DP. Flow cytometric analysis for reproductive biology. *Biol Cell* 78:53-62 (1993).
- Stern H, Hotta Y. Chromosome organization in the regulation of meiotic prophase. *Symp Soc Exp Biol* 38:161-175 (1984).
- Stern H, Hotta Y. Molecular biology of meiosis: synapsis-associated phenomena. En: *Aneuploidy: Etiology and Mechanisms* (V. Dellarco, P.E. Voytek y A. Mollandes, eds.), pp. 305-316. New York: Plenum (1985).
- Stukenborg JB, Schlatt S, Simoni M, Yeung CH, Elhija MA, Luetjens CM, Huleihel M, Wistuba J. New horizons for *in vitro* spermatogenesis? An update on novel three-

- dimensional culture systems as tools for meiotic and post-meiotic differentiation of testicular germ cells. *Mol Hum Reprod* 15(9):521-529 (2009).
- Stukenborg JB, Wistuba J, Luetjens CM, Elhija MA, Huleihel M, Lunenfeld E, Gromoll J, Nieschlag E, Schlatt S. Coculture of spermatogonia with somatic cells in a novel three-dimensional soft-agar-culture-system. *J Androl* 29(3):312-329 (2008).
- Suter L, Koch E, Bechter R, Bobadilla M. Three-parameter flow cytometric analysis of rat spermatogenesis. *Cytometry* 27:161-168 (1997).
- Swanson WJ, Vacquier VD. The rapid evolution of reproductive proteins. *Nat Rev Genet* 3(2):137-144 (2002).
- Sym M, Engebrecht JA, Roeder GS. ZIP1 is a synaptonemal complex protein required for meiotic chromosome synapsis. *Cell* 72(3):365-378 (1993).
- Tanaka K, Tamura H, Tanaka H, Katoh M, Futamata Y, Seki N, Nishimune Y, Hara T. Spermatogonia-dependent expression of testicular genes in mice. *Dev Biol* 246:466-479 (2002).
- Tanaka SS, Toyooka Y, Akasu R, Katoh-Fukui Y, Nakahara Y, Suzuki R, Yokoyama M, Noce T. The mouse homolog of *Drosophila* Vasa is required for the development of male germ cells. *Genes Dev* 14(7):841-853 (2000).
- Thomas KH, Wilkie TM, Tomashefsky P, Bellvé AR, Simon MI. Differential gene expression during spermatogenesis. *Biol Reprod* 41:729-739 (1989).
- Tsipouri V, Schueler MG, Hu S; NISC Comparative Sequencing Program, Dutra A, Pak E, Riethman H, Green ED. Comparative sequence analyses reveal sites of ancestral chromosomal fusions in the Indian muntjac genome. *Genome Biol* 9(10):R155 (2008).
- Tsuda M, Sasaoka Y, Kiso M, Abe K, Haraguchi S, Kobayashi S, Saga Y. Conserved role of nanos proteins in germ cell development. *Science* 301(5637):1239-1241 (2003).
- van der Wee KS, Johnson EW, Dirami G, Dym TM, Hofmann MC. Immunomagnetic isolation and long-term culture of mouse type A spermatogonia. *J Androl* 22:696-704 (2001).
- Van Dilla MA, Trujillo TT, Mullaney PF, Coulter JR. Cell microfluorometry: a method for rapid fluorescence measurement. *Science* 163(872):1213-1214 (1969).
- Van Kroonenburgh MJ, Beck JL, Scholtz JW, Hacker-Klom U, Herman CJ. DNA analysis and sorting of rat testis cells using two parameter flow cytometry. *Cytometry* 6:321-326 (1985).
- Vázquez JM, Parrilla I, Gil MA, Cuello C, Caballero I, Vazquez JL, Roca J, Martínez EA. Improving the efficiency of insemination with sex-sorted spermatozoa. *Reprod Domest Anim* 43(4):1-8 (2008).

- Ventelä S, Toppari J, Parvinen M. Intercellular organelle traffic through cytoplasmic bridges in early spermatids of the rat: mechanisms of haploid gene product sharing. *Mol Biol Cell*. 14(7):2768-2780 (2003).
- Vershon AK, Pierce M. Transcriptional regulation of meiosis in yeast. *Curr Opin Cell Biol* 12(3):334-339 (2000).
- Vester B, Smith A, Krohne G, Benavente R. Presence of a nuclear lamina in pachytene spermatocytes of the rat. *J Cell Sci* 104(2):557-563 (1993).
- Vigodner M, Lewin LM, Shochat L, Mittelman L, Golan R. Meiosis in the golden hamster: a confocal microscopy and flow cytometric analysis. *Molec Reprod Dev* 64:86-95 (2003).
- Vigodner M, Lewy H, Lewin LM, Shochat L, Golan R. Evidence for biological rhythm in spermatogenesis in the pubertal hamster (*Mesocricetus auratus*): a flow cytometric study. *Life Sci* 74:1119-1126 (2004).
- Villardell J, Coll MD, Querol E, Egozcue J. Histone electrophoretic pattern in the characterization of synaptonemal complexes. *Cell Mol Biol* 35:201-214 (1989).
- Von Wettstein D, Rasmussen SW, Holm PB. The synaptonemal complex in genetic segregation. *Ann Rev Genet* 18:331-413 (1984).
- Wang PJ, McCarrey JR, Yang F, Page DC. An abundance of X-linked genes expressed in spermatogonia. *Nat Genet* 27(4):422-426 (2001).
- Wang Y, Song W, Li S, Guan X, Miao S, Zong S, Koide SS, Wang L. GC-1 mRHBDD1 knockdown spermatogonia cells lose their spermatogenic capacity in mouse seminiferous tubules. *BMC Cell Biol* 10:25 doi: 10.1186/1471-2121-10-25 (2009).
- Wang Z, Liang Y, Li C, Xu Y, Lan L, Zhao D, Chen C, Xu Z, Xue Y, Chong K. Microarray analysis of gene expression involved in anther development in rice (*Oryza sativa L.*). *Plant Mol Biol* 58(5):721-737 (2005).
- Ward JO, Reinholdt LG, Hartford SA, Wilson LA, Munroe RJ, Schimenti KJ, Libby BJ, O'Brien M, Pendola JK, Eppig J, Schimenti JC. Toward the genetics of mammalian reproduction: induction and mapping of gametogenesis mutants in mice. *Biol Reprod* 69:1615-1625 (2003).
- Watanabe T, Miyashita K, Saito TT, Yoneki T, Kakihara Y, Nabeshima K, Kishi YA, Shimoda C, Nojima H. Comprehensive isolation of meiosis-specific genes identifies novel proteins and unusual non-coding transcripts in *Schizosaccharomyces pombe*. *Nucleic Acids Res* 29(11):2327-2337 (2001).
- Weiss M, Vigier M, Hue D, Perrard-Sapori MH, Marret C, Avallet O, Durand P. Pre- and postmeiotic expression of male germ cell-specific genes throughout 2-week cocultures of rat germinal and Sertoli cells. *Biol Reprod* 57:68-76 (1997).

- Wettstein R, Sotelo JR. The molecular architecture of synaptonemal complexes. En: *Advances in Cell and Molecular Biology* (DuPraw EJ, ed.), vol 1. pp 109-152. New York: Academic Press (1971).
- Whitby MC. Making crossovers during meiosis. *Biochem Soc Trans* 33(6):1451-1455 (2005).
- Wijeratne AJ, Zhang W, Sun Y, Liu W, Albert R, Zheng Z, Oppenheimer DG, Zhao D, Ma H. Differential gene expression in *Arabidopsis* wild-type and mutant anthers: insights into anther cell differentiation and regulatory networks. *Plant J* 52(1):14-29 (2007).
- Winkel K, Alsheimer M, Öllinger R, Benavente R. Protein SYCP2 provides a link between transverse filaments and lateral elements of mammalian synaptonemal complexes. *Chromosoma* 118:259-267 (2009).
- Wistuba J, Schrod A, Greve B, Hodges JK, Aslam H, Weinbauer GF, Luetjens M. Organization of seminiferous epithelium in primates: relationship to spermatogenic efficiency, phylogeny, and mating system. *Biol Reprod* 69:582-591 (2003).
- Wistuba J, Stukenborg JB, Luetjens CM. Mammalian Spermatogenesis. *Funct Dev Embryol* 1:99-117 (2007).
- Wojtasz L, Daniel K, Roig I, Bolcun-Filas E, Xu H, Boonsanay V, Eckmann CR, Cooke HJ, Jasin M, Keeney S, McKay MJ, Toth A. Mouse HORMAD1 and HORMAD2, two conserved meiotic chromosomal proteins, are depleted from synapsed chromosome axes with the help of TRIP13 AAA-ATPase. *PLoS Genet* 5:e1000702 (2009).
- Wrobel G, Primig M. Mammalian male germ cells are fertile ground for expression profiling of sexual reproduction. *Reproduction* 129:1-7 (2005).
- Wu SM, Baxendale V, Chen Y, Pang AL, Stitely T, Munson PJ, Leung MY, Ravindranath N, Dym M, Rennert OM, Chan WY. Analysis of mouse germ-cell transcriptome at different stages of spermatogenesis by SAGE: biological significance. *Genomics* 84(6):971-981 (2004).
- Xu EY, Lee DF, Klebes A, Turek PJ, Kornberg TB, Reijo Pera RA. Human BOULE gene rescues meiotic defects in infertile flies. *Hum Mol Genet* 12(2):169-175 (2003).
- Yang F, De La Fuente R, Leu NA, Baumann C, McLaughlin KJ, Wang PJ. Mouse SYCP2 is required for synaptonemal complex assembly and chromosomal synapsis during male meiosis. *J Cell Biol* 17:497-507 (2006).
- Yang F, Wang PJ. The mammalian synaptonemal complex: a scaffold and beyond. *Genome Dyn* 5:69-80 (2009).
- Yao J, Chiba T, Sakai J, Hirose K, Yamamoto M, Hada A, Kuramoto K, Higuchi K, Mori M. Mouse testis transcriptome revealed using serial analysis of gene expression. *Mammalian Genome* 15(6):433-451 (2004).

- Yoon CY, Hong CM, Cho YY, Chung YH, Min HK, Yun YW, Lee BJ, Yang KH, Lee YS, Kim CK. Flow cytometric assessment of ethylene glycol monoethyl ether on spermatogenesis in rats. *J Vet Med Sci* 65:207-212 (2003).
- Yu Z, Guo R, Ge Y, Ma J, Guan J, Li S, Sun X, Xue S, Han D. Gene expression profiles in different stages of mouse spermatogenic cells during spermatogenesis. *Biol Reprod* 69(1):37-47 (2003).
- Yuan L, Liu JG, Zhao J, Brundell E, Daneholt B, Höög C. The murine *SCP3* gene is required for synaptonemal complex assembly, chromosome synapsis, and male fertility. *Mol Cell* 5:73-83 (2000).
- Zamore PD, Ma S. Isolation of *Drosophila melanogaster* testes. *J Vis Exp* 51:2641. doi: 10.3791/2641 (2011).
- Zetka M. Homologue pairing, recombination and segregation in *Caenorhabditis elegans*. *Genome Dyn* 5:43-55 (2009).
- Zhou Q, Li Y, Nie R, Friel P, Mitchell D, Evanoff RM, Pouchnik D, Banasik B, McCarrey JR, Small C, Griswold MD. Expression of stimulated by retinoic acid gene 8 (Stra8) and maturation of murine gonocytes and spermatogonia induced by retinoic acid *in vitro*. *Biol Reprod* 78:537-545 (2008).
- Zhou KW, Zheng XM, Yang ZW, Zhang L, Chen HD. Overexpression of CIRP may reduce testicular damage induced by cryptorchidism. *Clin Invest Med* 32:103-111 (2009).
- Zickler D. From early homologue recognition to synaptonemal complex formation. *Chromosoma* 115:158-174 (2006).
- Zickler D, Kleckner N. The leptotene-zygotene transition of meiosis. *Annu Rev Genet* 32:619-697 (1998).

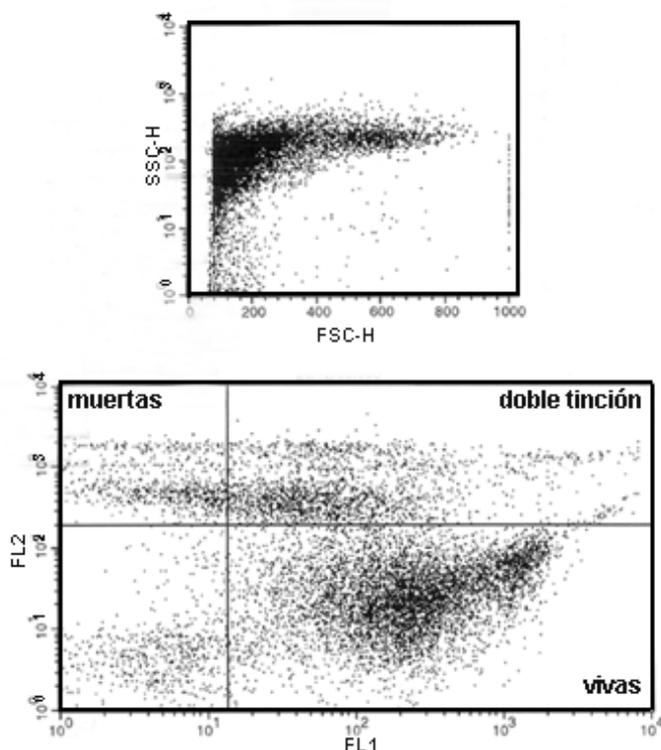
## VIII. ANEXOS

### VIII.1. Lista de abreviaturas

<p><b>AP</b> - <i>primer</i> o iniciador arbitrario</p> <p><b>AR</b> - ácido retinoico</p> <p><b>BrEt</b> - bromuro de etidio</p> <p><b>BSA</b> - seroalbúmina bovina</p> <p><b>CMF</b> - citometría de flujo</p> <p><b>CS</b> - complejo sinaptonémico</p> <p><b>Ct</b> - región carboxilo terminal</p> <p><b>D</b> - diploteno</p> <p><b>DD</b> - <i>Differential display</i></p> <p><b>DMEM</b> - <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i></p> <p><b>DMPC</b> - dimetil-pirocarbonato</p> <p><b>DMSO</b> - dimetil-sulfóxido</p> <p><b>dpp</b> - días post-parto</p> <p><b>DSB</b> - cortes doble hebra</p> <p><b>EA</b> - elementos axiales</p> <p><b>EL</b> - elemento lateral</p> <p><b>EM</b> - elemento medial</p> <p><b>EN</b> - envoltura nuclear</p> <p><b>FACS</b> – <i>Fluorescent Activated Cell Sorting</i></p> <p><b>FL2-A</b> - Intensidad de la fluorescencia emitida</p> <p><b>FL2-W</b> - Duración de la fluorescencia emitida</p> <p><b>FSC-H</b> - <i>Forward Scatter</i> o Dispersión frontal</p> <p><b>IP</b> - yoduro de propidio</p> <p><b>L</b> - leptoteno</p> <p><b>ME</b> - microscopio electrónico</p> <p><b>MNE</b> - membrana nuclear externa</p> <p><b>MNI</b> - membrana nuclear interna</p> <p><b>MO</b> - microscopio óptico</p> <p><b>NDA</b> - ácido naftol-disulfónico</p> <p><b>P</b> - paquiteno</p> <p><b>PBS</b> - buffer fosfato salino</p> <p><b>PCR</b> - reacción en cadena de la polimerasa</p> <p><b>PFA</b> - paraformaldehído</p> <p><b>PMSF</b> - fenil-metil-sulfonil-fluoruro</p> <p><b>RT</b> – transcripción/ transcriptasa reversa</p> <p><b>SFB</b> - suero fetal bovino</p> <p><b>SSC-H</b> - <i>Side Scatter</i> o Dispersión lateral</p> <p><b>TAE</b> - buffer tris-acetato-EDTA</p> <p><b>Z</b> - cigoteno</p>
---

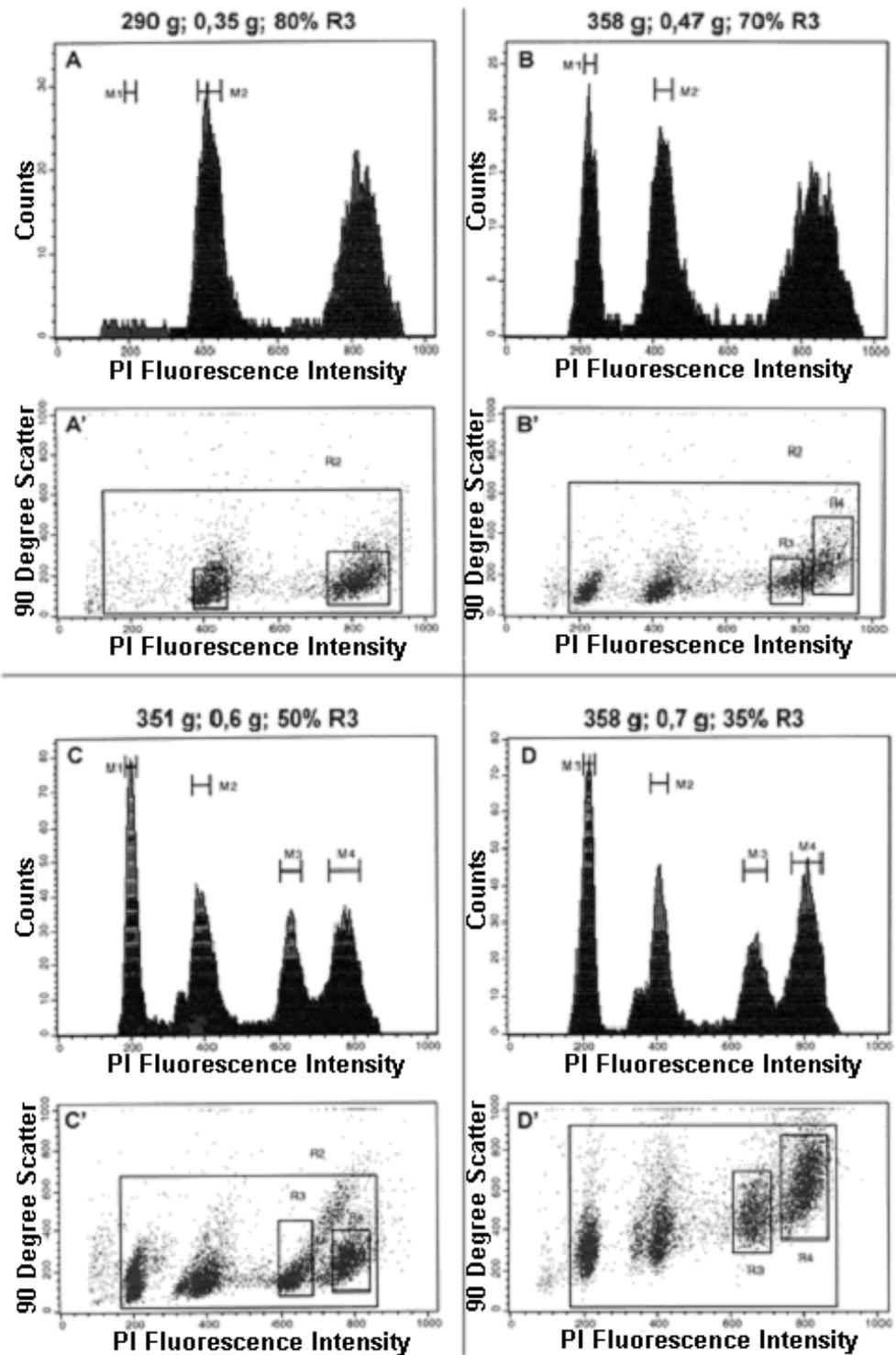
## VIII.2. Gráficos adicionales de CMF

### VIII.2.a. Evaluación de viabilidad celular con Live/Dead kit:



**Figura VIII.1.-** Análisis citométrico de la viabilidad en las suspensiones celulares preparadas con el Medimachine, utilizando el *Live/Dead kit* (Molecular Probes). *Arriba:* Gráfico de puntos representando la dispersión frontal de la luz (FSC-H) en función de la dispersión lateral (SSC-H) por parte de las células en la suspensión. *Abajo:* Representación de fluorescencia verde (FL1) vs fluorescencia roja (FL2). El cuadrante inferior izquierdo corresponde a células no marcadas, mientras que en el inferior derecho se encuentran las células con fluorescencia verde (“vivas”, 70%). Las células muertas emiten en el rojo y se ubican en el cuadrante superior izquierdo (8%). El cuadrante superior derecho corresponde a las células que exhibieron en forma simultánea fluorescencias roja y verde, que constituyeron un porcentaje importante de la población (20%). Considerando que estas últimas presentan cambios en su membrana a consecuencia de la disgregación mecánica con ruptura de puentes citoplásmicos pero aún son viables, se totaliza un 90% de células viables.

## VIII.2.b. Distinción de R3 y R4 dentro de población 4C:

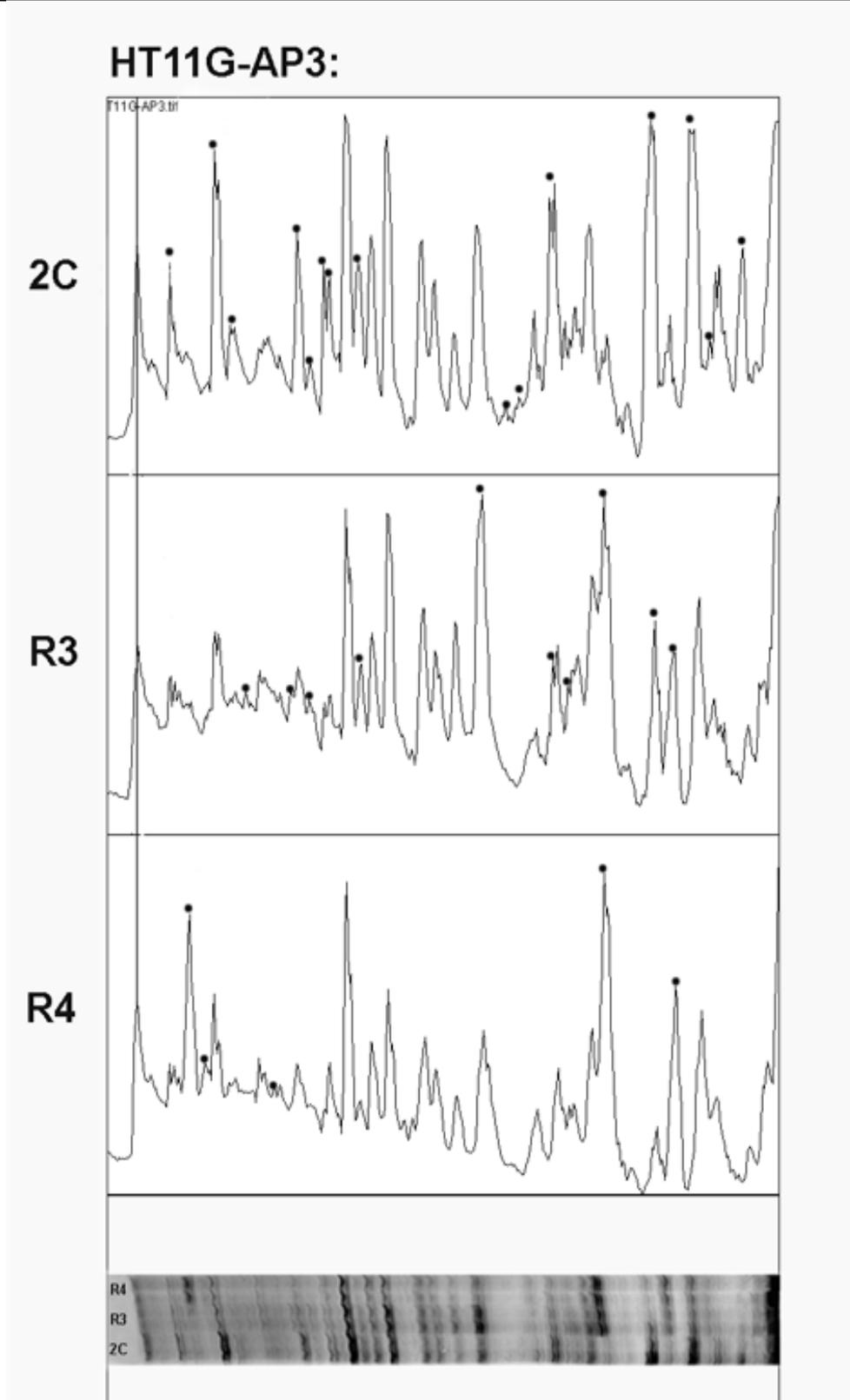


**Figura VIII.2.-** Análisis mediante CMF de suspensiones celulares de testículo de cobayos de 45-50 días de edad con diferencias en sus pesos corporales y/o testiculares. En todos los casos se realizaron incubaciones prolongadas con el colorante IP ( $\geq 2$  horas) antes del análisis citométrico. Sin embargo, no en todos los casos pudo lograrse una clara distinción de las poblaciones R3 y R4 (**A**, **A'** y **B**, **B'**). Aquellos en que se logró

distinguir inequívocamente a R3 y R4 (**C, C'** y **D, D'**), tuvieron en común que el aporte relativo de cada una de estas poblaciones era  $\geq 35\%$  de las células 4C. Los datos de cada espécimen se muestran en el siguiente orden: peso corporal, peso testicular y porcentaje aproximado de meiocitos tempranos (R3) con respecto a las células 4C totales. Los datos porcentuales provienen de estudios anteriores (Rodríguez y Wettstein, 2004).

---

### VIII.3. Análisis de bandas del DD con el programa ImageJ



**Figura VIII.3.-** Análisis comparativo de las bandas obtenidas en el DD, utilizando el programa *ImageJ*. A modo de ejemplo, se muestra el análisis de las bandas obtenidas con los iniciadores HT<sub>11</sub>G y AP-3 para las tres poblaciones celulares en comparación (2C, R3 y R4). La línea vertical que pasa por el primer pico de la izquierda en cada caso,

se tomó como referencia para alinear las tres poblaciones y evitar posibles errores causados por la inclinación de las bandas en los carriles durante la corrida electroforética (ver gel abajo). Los puntos sobre los picos señalan las bandas diferenciales de una población con respecto a otra/s, ya sean los casos de presencia/ausencia o por diferencia de intensidad notoria.

---

---

#### **VIII.4. Publicaciones en revistas internacionales arbitradas en el marco de la tesis**

---

Geisinger A, Rodríguez-Casuriaga R. Flow cytometry for gene expression studies in mammalian spermatogenesis. *Cytogenet Genome Res* 128:46-56 (2010).

Rodríguez-Casuriaga R, Geisinger A, López-Carro B, Porro V, Wettstein R, Folle GA. Ultra-fast and optimized method for the preparation of rodent testicular cells for flow cytometric analysis. *Biol Proced Online* 11:184-195 (2009).

Rodríguez-Casuriaga R, Geisinger A, Santiñaque FF, López-Carro B, Folle GA. High-purity flow sorting of early meiocytes based on DNA analysis of guinea pig spermatogenic cells. *Cytometry A* 79(8):625-634 (2011).

Rodríguez-Casuriaga R, Folle GA, Santiñaque FF, López-Carro B, Geisinger A. Simple and efficient technique for the preparation of testicular cell suspensions. Manuscrito y video en preparación para ser enviados a *J Vis Exp (Journal of Visualized Experiments)*.