## **UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA**

# **Facultad de Ciencias Médicas**

**Tesis de Doctorado en Ciencias de la Salud** 

### MECANISMOS DE APOPTOSIS EN TESTÍCULOS DE RATONES CON REARREGLOS CROMOSÓMICOS ROBERTSONIANOS

Lic. Valeria Andrea Rodríguez

Directora de Tesis: Dra. Nori Tolosa de Talamoni

## 2010

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Metabolismo Fosfocálcico y Vitamina D "Dr. Fernando Cañas" de la Cátedra de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba Dedicada

A mi mamá

A mi esposo

A mi hija

Tesis Doctoral de: VALERIA ANDREA RODRÍGUEZ

Escribir los agradecimientos de esta Tesis Doctoral significa haber concluido un inmenso trabajo realizado en colaboración con varias personas que me han apoyado durante los años que he dedicado a la realización de este proyecto.

Quiero expresar, en primer lugar, mi más sincero agradecimiento a la Prof. Dra. Nori Tolosa de Talamoni por la confianza depositada en mí al aceptarme en su grupo de investigación para realizar esta Tesis. Además, por su dedicación, por su continua labor de orientación en la dirección de la misma, conocimientos y motivación.

A los Señores Profesores de la Comisión Asesora de Seguimiento: Dr. Rubén Hugo Ponce y Dr. Carlos Rafael López, por sus constantes estímulos para seguir adelante con los resultados de esta Tesis.

Mi gratitud también a mis compañeras de laboratorio: Gabi, Adri, Vivi, Ana María, Elena, María Angélica, Ceci, Lu, Agata, y un agradecimiento especial a Gaby Díaz, con quien compartí muchas horas contando células y armando los paneles de fotos.

A todos mis compañeros de Cátedra, por su afecto.

Tesis Doctoral de: VALERIA ANDREA RODRÍGUEZ

A todas las personas que me ayudaron en la captura de los ratones Graomys griseoflavus: integrantes del laboratorio "Dr. Cañas", Dr. Gerardo Theiler, Dr. Rubén Hugo Ponce, y los ratones Graomys centralis: Dr. Ricardo Ojeda.

A las Dras. Silvia Garagna y Valeria Merico, por sus asesoramientos en espermatogénesis y por sus colaboraciones en el trabajo.

A la Dra. Liliana Muñoz por las determinaciones de testosterona.

A mi papá, por ser mi ángel guardián. A mi mamá, por brindarme día a día con ternura todo su apoyo.

Finalmente, debo un agradecimiento especial a mi esposo Guillermo, por su amor, comprensión y aliento constante. Y a mi hija Azul, quien siempre me esperó después del trabajo con los brazos abiertos, ella me da la fuerza para concretar todos mis sueños. Con los resultados de esta Tesis se realizaron las siguientes publicaciones:

"A mitochondrial mechanism is involved in apoptosis of Robertsonian mouse germ cells". V. Merico, G. Díaz de Barboza, C. Vasco, R. Ponce, V. Rodríguez, S. Garagna, N. Tolosa de Talamoni. 2008. *Reproduction*. 135: 797-804. Cambridge, Inglaterra.

"Spermatocyte apoptosis, wich involves both intrinsec and extrinsec pathways, explains the sterility of *Graomys griseoflavus* x *Graomys centralis* male hybrids". V. Rodríguez, G. Díaz de Barboza, R. Ponce, V. Merico, N. Tolosa de Talamoni. 2010. *Reproduction, Fertility and Development*. 22: 478-488. Collingwood, Australia. El trabajo de esta Tesis se realizó con los aportes recibidos de FONCYT (PICT 2005-32464), CONICET (PIP 2005-2006), SECyT (UNC 2006-2007) (Dra. Nori Tolosa de Talamoni). Convenio Bilateral (2005-2007) entre SECyT (Dra. Nori Tolosa de Talamoni) y Ministero degli Affari Steri (Italia) (Dra. Silvia Garagna).

#### "LA FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS NO SE HACE SOLIDARIA CON LAS OPINIONES DE ESTA TESIS"

### ÍNDICE DE CONTENIDO

RESUMEN1
SUMMARY4
ABREVIATURAS
INTRODUCCIÓN8
MATERIAL Y MÉTODOS26
Animales de experimentación27
Análisis morfológico28
Histología <b>28</b>
Microscopía óptica29
Microscopía electrónica29
Ensayo hormonal
Análisis inmunohistoquímico <b>30</b>
Análisis de la fragmentación del ADN
Análisis de Western blots32
Análisis estadístico35
RESULTADOS
Ratones Mus musculus domesticus
Ratones Graomys45
DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES
BIBLIOGRAFÍA

#### ÍNDICE DE TABLAS

### ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1. Esquema representativo de las vías apoptóticas20
Fig. 2. Tinción de TUNEL en túbulos seminíferos de los ratones CD1, Milano
II e híbridos
Fig. 3. Microfotografías electrónicas de células germinales de testículos de
ratones CD1 e híbridos
Fig. 4. Túbulos seminíferos en el estadio XII en ratones híbridos. Tinción de
Bax, citocromo c, calbindina D <sub>28k</sub> y TUNEL <b>41</b>
Fig. 5. Representación de Western blots obtenidos usando anticuerpos anti-
Bax, anti-citocromo c y anti-calbindina D <sub>28k</sub> en homogeneizados de testículos
de ratones CD1, Milano II e híbridos43
Fig. 6. Fotografía del testículo izquierdo de ratón G. centralis e híbrido,
ambos de 3 meses de edad45
Fig. 7. Tinción de túbulos seminíferos de los ratones Graomys con
Hematoxilina-PAS y TUNEL
Fig. 8. Microfotografías electrónicas de células germinales de testículos de
ratones <i>G. centralis</i> de 1, 2 y 3 meses de edad49
Fig. 9. Microfotografías electrónicas de células germinales de testículos de
ratones <i>G. griseoflavus</i> de 1, 2 y 3 meses de edad <b>50</b>
Fig. 10. Microfotografías electrónicas de células germinales de testículos de
ratones híbridos de 1, 2 y 3 meses de edad <b>51</b>
Fig. 11. Túbulos seminíferos de ratones híbridos mostrando tinción de Fas,
Bax y citocromo c de 1, 2 y 3 meses de edad58
Fig. 12. Representación de Western blots y análisis densitométrico
cuantitativo de Fas, Fas-L (soluble) y Fas-L (membrana) de testículos de los
ratones <i>Graomys</i> de 1, 2 y 3 meses de edad60
Fig. 13. Representación de Western blots y análisis densitométrico
cuantitativo de Bax y citocromo c de testículos de los ratones Graomys de 1,
2 y 3 meses de edad61

Fig. 14. Representación de Western blots y análisis densitométrico
cuantitativo de procaspasa-3 y caspasa-3 activa testículos de los ratones
<i>Graomys</i> de 1, 2 y 3 meses de edad62
Fig. 15. Túbulos seminíferos con tinción de TUNEL y calbindina $D_{28k}$ de
híbridos de 2 meses de edad63
Fig. 16. Representación de Western blots y análisis densitométrico
cuantitativo de calbindina $D_{56k}$ y calbindina $D_{28k}$ de testículos de los ratones
<i>Graomys</i> de 1, 2 y 3 meses de edad65



Se han reportado casos de esterilidad masculina en seres humanos portadores de fusiones Robertsonianas. En este trabajo se estudió el deterioro espermatogénico y la participación de las vías apoptóticas en dos modelos animales de ratones machos: híbridos subfértiles (hembras CD1 x machos Milano II) de 5 meses de edad e híbridos infértiles (hembras Graomys griseoflavus x machos Graomys centralis) de 1, 2 y 3 meses de edad, con fusiones Robertsonianas. La presencia de apoptosis se estudió mediante inmunohistoquímica y análisis de Western blots de las moléculas proapoptóticas Fas, Fas-L, Bax, citocromo c y caspasa-3, y calbindina D<sub>28K</sub> como molécula antiapoptótica. La fragmentación del ADN se analizó mediante la técnica de TUNEL. La ultraestructura testicular se visualizó por microscopía electrónica. Los resultados revelaron que la morfología y las asociaciones celulares del epitelio seminífero fueron anormales en los ratones híbridos Robertsonianos, con un mayor deterioro en los híbridos infértiles. Un intenso proceso apoptótico se observó en los túbulos seminíferos del estadio XII en los híbridos subfértiles, principalmente en los espermatocitos en metafase. Estos espermatocitos también mostraron redistribución de Bax y citocromo c. Los ratones híbridos infértiles presentaron mayor mortalidad de células germinales, con arresto de la espermatogénesis en estadios pre-meióticos. La apoptosis de las células germinales se produjo especialmente a nivel de los espermatocitos en paquitene, no llegándose en ningún caso a la espermatogénesis completa. Los espermatocitos de los tres grupos de animales Graomys de 1 mes de edad fueron positivos para todos los marcadores apoptóticos. En los parentales, esta expresión disminuyó a los 2 y 3 meses, mientras que permaneció elevada en los testículos de los híbridos.

El porcentaje de espermatocitos en paquitene TUNEL (+) alcanzó en los híbridos un valor de 78% y 44% a los 2 y 3 meses de edad, respectivamente. ultraestructural reveló EI estudio en ambos híbridos abundantes espermatocitos con mitocondrias alrededor del núcleo, membrana nuclear alterada y condensaciones de la cromatina compatibles con características apoptóticas. Estos datos sugieren que la vía apoptótica intrínseca está involucrada en la muerte de los espermatocitos de los ratones híbridos. Además, la alta expresión de Fas, Fas-L y caspasa-3 indica que la vía extrínseca estaría involucrada en una manera dependiente de caspasa en la muerte de las células germinales de los ratones híbridos infértiles. En los híbridos subfértiles e infértiles, calbindina se expresó principalmente en espermatocitos de túbulos en donde ocurrió la masiva muerte celular por apoptosis. Sin embargo, la colocalización de calbindina con los distintos marcadores apoptóticos fue muy limitada. La mayor expresión de calbindina en células germinales de los ratones híbridos con rearreglos Robertsonianos, tanto subfértiles como infértiles, podría ser un mecanismo de protección contra la apoptosis de la progenie espermatogénica, sin embargo no logra prevenir totalmente la muerte celular desencadenada por las alteraciones cromosómicas.



There have been reported cases of male infertility in humans carrying Robertsonian fusions. In this work, the spermatogenic impairment and the involvement of apoptotic pathways in two animal models of male mice with Robertsonian fusion were studied. Testes from subfertile hybrids (CD1 females x Milano II males) of 5 months old and infertile hybrids (Graomys griseoflavus females x Graomys centralis males) at 1, 2 and 3 months of age were analyzed. The presence of apoptosis was studied by immunohistochemistry and Western blots analysis of the proapoptotic molecules Fas, Fas ligand, Bax, cytochrome c and caspase-3 and calbindin  $D_{28k}$  as an antiapoptotic molecule. DNA fragmentation was detected by using the TUNEL technique. Testicular ultrastructure was visualized by electron microscopy. The results reveal that the morphology and cellular associations of the seminiferous epithelium were abnormal in Robertsonian hybrid mice, with a further deterioration in infertile hybrids. An intense apoptotic process was observed in seminiferous tubules at stage XII in subfertile hybrids, mainly in the metaphase spermatocytes. These spermatocytes also showed redistribution of Bax and cytochrome c. Infertile hybrid mice showed higher mortality of germ cells, with arrest of spermatogenesis in pre-meiotic stages. The germ cell apoptosis occurred particularly at the stage of pachytene spermatocytes not reaching, in any case, the complete spermatogenesis. Spermatocytes of the three groups of animals Graomys at 1 month of age were all positive for apoptotic markers. In the parental cytotypes, the expression of the apoptotic molecules decreased at 2 and 3 months, while remaining high in the testes of hybrids. The percentage of TUNEL (+) pachytene spermatocytes in hybrids reached a value of 78% and 44% at 2 and 3 months of age, respectively. The ultrastructural study revealed

in both hybrids abundant spermatocytes with mitochondria around the nucleus, altered nuclear membrane and chromatin condensation consistent with apoptotic features. These data suggest that the intrinsic apoptotic pathway is involved in the death of spermatocytes in hybrid mice. Moreover, the high expression of Fas, Fas ligand and caspase-3 indicate that the extrinsic pathway would be involved in a caspase-dependent manner in the death of germ cells of infertile hybrid mice. In subfertile and infertile hybrids, calbindin was expressed mainly in spermatocytes of tubules, where massive cell death occurred by apoptosis. However, the colocalization of calbindin with different apoptotic markers was very limited. Most of calbindin expression in germ cells of hybrid mice with Robertsonian rearrangements, both subfertile and infertile, could be a protective mechanism against apoptosis of spermatogenic progeny; however, it can not completely prevent cell death triggered by chromosomal abnormalities.

#### ABREVIATURAS UTILIZADAS

Apaf-1: factor de activación de la proteasa apoptótica.

Ca<sup>+2</sup>: calcio iónico.

**CB:** calbindina.

**DAB:** tetrahidrocloruro de 3,3'-diaminobencidina.

FADD: dominio de muerte asociado a Fas.

GAPDH: gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa.

G. centralis: Graomys centralis.

G. griseoflavus: Graomys griseoflavus.

IAPs: proteínas inhibidoras de apoptosis.

ITS: sitios teloméricos intersticiales.

M. domesticus: Mus musculus domesticus ó Mus domesticus.

NF-kappaB: factor nuclear kappa B.

PARP: poli (ADP-Ribosa) polimerasa.

**PBS:** buffer fosfato salino.

PMSF: fluoruro de fenilmetanosulfonilo.

**Raidd:** proteína homóloga a la proteína CED-3 que interactúa con el receptor y que posee dominio de muerte.

Rb: Robertsoniano/a.

SDS: dodecilsulfato sódico.

Smac: segundo activador de caspasas derivado de mitocondria.

TdT: deoxinucleotidil terminal transferasa.

**TNF:** factor de necrosis tumoral.

Tradd: dominio de muerte asociado al receptor de TNF.

**TUNEL:** Terminal deoxinucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling.



La infertilidad masculina puede estar asociada a anomalías cromosómicas constitucionales (25). Numerosas fuentes de estudios citogenéticos en varones infértiles documentan que entre el 10 y 15% tienen anomalías cromosómicas constitucionales (95). Los rearreglos cromosómicos estructurales balanceados representan aproximadamente el 20% de todas las anomalías cromosómicas. Las más frecuentes son las translocaciones Robertsonianas (Rb), las translocaciones recíprocas y las inversiones. Todas ellas se caracterizan por expresar esterilidad y/o infertilidad en vida adulta. Si bien aún no se conocen los motivos por los cuales causan infertilidad, se las relaciona con los disturbios de la sinapsis de los cromosomas homólogos que ocasionarían diferentes grados de detención en el proceso meiótico, que conducirían a azoospermia u oligospermia y, de acuerdo con las posibilidades de segregación anormal, podrían originar gametos anormales responsables de abortos o nacidos malformados (95).

En seres humanos se han reportado casos de esterilidad en pacientes portadores de translocaciones Rb, como por ejemplo las fusiones cromosómicas Rb (13;14), Rb (14;21), Rb (14;22), Rb (14;15), Rb (13;15), Rb (21;22) y se ha sugerido que dichas translocaciones podrían afectar el proceso de espermatogénesis, causando problemas en la fertilidad (4, 31, 90, 36, 13). Bacetti y col. (4) han analizado por microscopía electrónica espermatozoides de hombres estériles portadores de la fusión Rb (14;22) observando morfología anormal del esperma, a causa del efecto de las translocaciones sobre la diferenciación de los espermatozoides y su desarrollo.

Debido a que existen pocos estudios histológicos y moleculares de los efectos de estas mutaciones sobre la espermatogénesis, en el presente trabajo se realiza un análisis de los procesos apoptóticos involucrados en las alteraciones de la gametogénesis en dos modelos de ratones machos que producen híbridos subfértiles o infértiles y que presentan rearreglos cromosómicos Rb. Como se mencionó previamente, en humanos portadores de translocaciones Rb existen alteraciones en la espermatogénesis. Estudios en animales pueden contribuir al conocimiento de dichas alteraciones reproductivas que presentan los humanos portadores de fusiones cromosómicas Rb.

La espermatogénesis es un proceso complejo, el cual comprende la proliferación mitótica de las espermatogonias, divisiones meióticas de espermatocitos y la diferenciación de las espermátides haploides a espermatozoides, e involucra un balance controlado entre proliferación y muerte celular (75). Consecuentemente, los túbulos seminíferos se caracterizan por asociaciones celulares típicas de varias progenies de células germinales (cada una en un diferente estado de diferenciación), conocidas como estadios del ciclo espermatogénico. La duración ciclo del espermatogénico, así como el patrón y el número de asociaciones celulares varía enormemente entre las especies, habiéndose descripto para muchos mamíferos (71, 89, 122, 57, 12, 61, 67). En el ratón doméstico (Mus musculus domesticus) se han evidenciado doce estadios o asociaciones celulares de maduración del epitelio seminífero (espermatogénesis), con una composición celular constante en cada estadio (89, 105). Esta clasificación está basada principalmente en los cambios de morfología de las espermátides durante los diferentes estadios de la espermiogénesis. La espermiogénesis se puede dividir mediante un criterio morfológico en varios pasos de desarrollo, basados inicialmente en la forma del acrosoma y más tardíamente en la forma de la cabeza de la espermátide y en el grado de condensación de la cromatina (105).

La infertilidad o los desórdenes testiculares pueden aparecer cuando el balance de la espermatogénesis no está regulado correctamente (42, 43, 35). Hay muchas causas diferentes de alteración de la regulación entre proliferación y muerte celular a lo largo de la espermatogénesis. Sin embargo, un cariotipo normal es un prerrequisito esencial para la espermatogénesis, ya que reordenamientos estructurales del cariotipo producen efectos perjudiciales en este proceso (99, 132).

Estudios citogenéticos realizados en mamíferos han demostrado que aquellos animales que poseen rearreglos en su cariotipo presentan fertilidad alterada (55, 4). El daño causado por estos rearreglos cromosómicos en el proceso espermatogénico depende de una serie de factores tales como el número de fusiones Rb o la incompatibilidad génica (22, 50, 77, 112, 135). Las fusiones Rb son reordenamientos cromosómicos que implican una fusión céntrica de dos cromosomas telocéntricos o acrocéntricos para formar un único cromosoma metacéntrico, lo que determina una disminución del número haploide (103). Algunas translocaciones implican la pérdida de un centrómero de uno de los elementos acrocéntricos, mientras que otras simplemente implican la fusión de dos regiones paracentroméricas generando cromosomas metacéntricos dicéntricos. El epónimo se refiere a Rees B. Robertson (103) quien concluyó, a partir de un estudio de cariotipos de saltamontes, que un único cromosoma en forma de V en un individuo o especie correspondía a dos cromosomas separados en otro individuo. Cincuenta años más tarde, Léonard y Deknudt (74) descubrieron, en una cepa de laboratorio, un ratón con 38 cromosomas con un par de cromosomas metacéntricos. En el mismo año, Evans y col. (39) refirieron otra translocación en ratones de laboratorio. Años después, Miller y col. (81) identificaron los cromosomas acrocéntricos incorporados en estos cromosomas metacéntricos, lo cual indicaba que la translocación encontrada por Léonard y Deknudt correspondía a la unión de los cromosomas 6 y 15, y la hallada por Evans y col. a la fusión de los cromosomas 9 y 19.

Aunque las causas que dan lugar a estas fusiones no son claras, parece ser que los telómeros juegan un papel muy importante en este tipo de mutaciones (118). Los telómeros son estructuras especializadas, situadas en los extremos de los cromosomas, que se requieren para el mantenimiento de la estabilidad y la integridad de éstos (138). Como consecuencia, un prerrequisito para la formación de las fusiones Rb debería ser la eliminación o inactivación de los telómeros. En las poblaciones naturales del ratón doméstico, los telómeros del brazo p (brazo corto del cromosoma en contraposición al brazo largo o brazo q) son eliminados por rotura cromosómica antes de la formación de la fusión Rb (44, 87). Además, otros autores sugieren que el acortamiento del telómero inducido por el gen mutado de la ARN telomerasa, en la línea germinal del ratón, da lugar a la pérdida del telómero y a elevadas frecuencias de fusiones Rb en las células somáticas de esta especie (11). Por el contrario, en un gran número de especies, se han

mencionado sitios teloméricos intersticiales (ITS) en regiones pericentroméricas de cromosomas metacéntricos (80), lo cual sugiere que la presencia de fusiones Rb, sin la pérdida de los telómeros, podría deberse a la inactivación de éstos.

Las fusiones Rb son el tipo de reordenamiento cromosómico mayoritariamente encontrado entre especies y es de gran importancia en la evolución del cariotipo de los mamíferos (87). Sin duda, una de las especies más estudiadas por su diversidad en razas cromosómicas es el ratón doméstico, *Mus musculus domesticus* ó *Mus domesticus* (141, 6, 52, 113, 18, 19, 16).

El cariotipo estándar de *M. domesticus* es de 2n = 40, con 19 pares de cromosomas acrocéntricos y la pareja de cromosomas sexuales. Se cree que este cariotipo es el ancestral de todas las variantes cromosómicas que se pueden localizar en *M. domesticus* desde las Islas Orcadas a las costas del norte de África (7, 52, 85). En *M. domesticus* se produce frecuentemente reducción del número diploide debido a la presencia de translocaciones Rb. Se ha descrito una amplia gama de fusiones entre los diferentes cromosomas, pudiéndose identificar números diploides comprendidos entre 22 y 39. Tan sólo los cromosomas sexuales no se han encontrado fusionados nunca en la especie en su estado natural. La translocación Rb se denomina según los cromosomas que la forman, así un metacéntrico resultante de la fusión entre los cromosomas 5 y 12 recibe el nombre de Rb (5;12). La primera descripción de una fusión Rb en *Mus domesticus* data de 1967 en linajes de laboratorio (39, 74). Las primeras fusiones estudiadas en poblaciones salvajes de ratón doméstico fueron descritas por Gropp y col. (47). Estos animales que se

hallaron en el este de Suiza tenían 26 cromosomas, de los cuales siete parejas fueron del tipo metacéntrico (Rb (1;3), Rb (4;6), Rb (5;15), Rb (8;12), Rb (9;14), Rb (11;13), Rb (16;17)) y 6 parejas del tipo acrocéntrico (47). Esta primera demostración de la existencia de fusiones Rb en el ratón doméstico fue la precursora del inicio de importantes estudios evolutivos (14, 106, 86) y de investigaciones biomédicas que utilizan a los cromosomas Rb como marcadores genéticos de polimorfismo (49, 54, 23). Estudios posteriores demostraron que esta reducción en el número cromosómico atribuible a la presencia de fusiones Rb no estaba limitada a ese lugar, sino que también se extendía a otras poblaciones de Italia y Suiza (48, 17), así como a otros países (2, 6, 65, 16, 51). La relación de fijación de las fusiones Rb en M. domesticus es de por lo menos dos órdenes de magnitud mayor que en otras especies de mamíferos (70, 86). Además, se ha confirmado que las fusiones Rb aparecen en *M. domesticus* de forma espontánea en cepas de laboratorio (39, 74). Así, se considera que estas translocaciones son la fuente más importante de diversidad cromosómica en el ratón doméstico. Las poblaciones Rb están normalmente rodeadas por áreas ocupadas por ejemplares de 2n=40 (cariotipo estándar). Cuando dos poblaciones con distinto número cromosómico entran en contacto dan lugar a zonas híbridas (121, 28, 111, 107). Éstas se caracterizan por tener un número cromosómico comprendido entre las dos poblaciones que las han generado y por la presencia de individuos con diferentes condiciones de heterocigosidad para las fusiones Rb.

El género Graomys comprende un grupo de roedores distribuido en América del Sur, desde Paraguay, Brasil, Bolivia hasta Santa Cruz en Argentina (84, 69). En poblaciones de *Graomys* de distintas regiones del país se han hallado polimorfismos cromosómicos que determinan diferentes números diploides. En el sudoeste de la provincia de Catamarca, noroeste de La Rioja, norte y centro de Mendoza, sur de Buenos Aires y centro de La Pampa se han hallado ejemplares con complementos diploides 34, 35, 36, 37 ó 38, mientras que en el norte y centro de Córdoba y sudeste de la provincia de La Rioja se capturaron individuos con 2n = 41-42 (92, 104, 139, 123, 127). El área de distribución de los citotipos 2n = 34-38 corresponde preferentemente a la región fitogeográfica llamada "Monte" mientras los de citotipos 2n = 41-42, se hallan en la región del "Espinal" y "Chaco Occidental" (123). Los individuos con diferentes citotipos son morfológicamente indistinguibles.

Un estudio citogenético realizado por Zambelli y col. (139) mostró que los citotipos 2n = 34-38 son generados por una serie de fusiones cromosómicas a partir del citotipo 2n = 42. Las fusiones Rb entre los pares de cromosomas 15 y 17 (Rb 15;17) y 16 y 18 (Rb 16;18) producen dos pares de cromosomas largos submetacéntricos en individuos con 2n = 38. El citotipo 2n= 36 muestra una tercera fusión entre los pares 1 y 6 (Rb 1;6); el citotipo 2n =37 es heterocigota para esta última fusión. El citotipo 2n = 34, presenta una cuarta fusión entre los pares 2 y 5 (Rb 2;5), siendo el citotipo 2n = 35heterocigota para esta fusión.

Los animales que tienen los complementos cromosómicos 2n = 34-38 son interfértiles, lo que indica que pertenecen a una especie cariotípicamente polimórfica llamada por Theiler y Blanco (123) "complejo 2n = 34-38". Al analizar las relaciones entre las diferentes formas, se ha demostrado la existencia de una serie de barreras reproductivas entre el citotipo 2n = 42 y el complejo 2n = 34-38 que incluyen mecanismos de aislamiento tanto postcigóticos como pre-cigóticos (123, 125). El aislamiento post-cigótico es asimétrico, los apareamientos entre machos 2n = 42 y hembras 2n = 34-38 producen híbridos con complementos diploide 38, 39 ó 40. En los cruzamientos recíprocos no se obtiene descendencia. El 77% de las hembras y el 100% de los machos híbridos son estériles. El 23% remanente de las hembras híbridas muestran una disminución drástica en la fertilidad si se las compara con las hembras no híbridas. Ninguna descripción sobre el arresto de la espermatogénesis en los híbridos machos *Graomys* está presente en la literatura.

Existen también barreras reproductivas pre-copulatorias: 1) de tipo etológico: las hembras 2n = 42 no copulan con los machos 2n = 34-38 y, en caso de hacerlo, hay reabsorción embrionaria; 2) reconocimiento olfatorio: tanto las hembras del complejo 2n = 34-38 como las 2n = 42 tienen capacidad para reconocer a los machos mediante el olfato, y muestran una marcada preferencia por machos con citotipos compatibles. La capacidad discriminatoria de las hembras se manifiesta solamente durante el estro, lo que sugiere que está relacionada con el reconocimiento pre-copulatorio (124).

En base a la evidencia mencionada, Theiler y Blanco (123) propusieron que el complejo 2n = 34-38, y el citotipo 2n = 42 constituyen dos especies completamente separadas. Theiler (126) ha propuesto conservar el nombre específico *Graomys griseoflavus* (*G. griseoflavus*) para el complejo 2n = 34-38 y denominar *Graomys centralis* (*G. centralis*) a la especie 2n = 42. Como las dos especies son morfológicamente indistinguibles, la única manera de determinar la pertenencia de un individuo a una de ellas es determinando su número diploide.

Estudios filogenéticos basados en determinaciones de citocromo b y fragmentos del asa D (D-loop) del ADN mitocondrial mostraron que los individuos con 2n = 41-42, pertenecientes a *G. centralis*, forman un "clado" (conjunto de especies con un antepasado común) separado de los individuos con 2n = 34-38, pertenecientes a *G. griseoflavus* (21).

El estudio de la espermatogénesis en heterocigotos Rb ha demostrado que tanto los estadios pre-meióticos como los meióticos están alterados y que estas alteraciones son más importantes en los heterocigotos múltiples que en los simples. Tres fases principales parecen particularmente sensibles y pueden explicar el deterioro de la espermatogénesis en cualquier estadio del proceso y la aparición de estadios atípicos. Una primera fase es a nivel premeiótico, cuando el número de espermatogonias proliferativas se reduce (99). Una segunda fase se produce a nivel meiótico, en la que la mayoría de espermatocitos en paquitene son incapaces de seguir unos patrones de citodiferenciación normales (99). Finalmente, una tercera fase de alteración del proceso se da a nivel de la espermiogénesis, cuando las espermátides experimentan cambios morfológicos y fisiológicos, pudiéndose producir una reducción drástica en el número de espermátides, relacionado con una alta proporción de espermátides aneuploides que aparecen después de la segunda división meiótica (100). A pesar de que se han realizado estudios sobre las consecuencias de la presencia de las fusiones Rb durante la meiosis en el ratón doméstico (5, 40, 20), existe poca información sobre los efectos de estas mutaciones sobre la espermatogénesis en poblaciones naturales.

Garagna y col. (45) demostraron que la heterocigosis Rb introduce cambios a gran escala en los territorios cromosómicos; ellos sugieren que la nueva arquitectura puede tener cambios en la interacción física de porciones específicas del genoma que actúan como factores epigenéticos en el control de la expresión de genes tanto en células somáticas como germinales.

Merico y col. (79) han analizado el proceso de espermatogénesis en ratones machos adultos que presentan rearreglos cromosómicos Rb. El análisis de la espermatogénesis confirmó en los heterocigotas un deterioro en el proceso espermatogénico debido a la muerte celular y a la alteración de la morfología del esperma. Los ratones heterocigotas Rb mostraron un alto porcentaje de túbulos seminíferos defectuosos, que contenían degeneración masiva de células meióticas y post-meióticas, con pocas espermátides. El proceso de espermiogénesis también fue afectado en estos ratones, lo que ocasionó la subfertilidad de los mismos.

La muerte celular por apoptosis en los testículos es un proceso normal para el desarrollo y mantenimiento de la homeostasis, pero este mecanismo se incrementa cuando existe infertilidad ó alteración de la espermatogénesis. La apoptosis o muerte celular programada es un proceso fisiológico caracterizado por modificaciones morfológicas y bioquímicas. Está estrictamente regulada mediante la activación secuencial de vías de transducción de señales, perturbación de la función de la membrana mitocondrial causando la liberación de proteínas intramitocondriales dentro del citosol, y finalmente degradación de la célula (140) (Fig. 1). Existen proteínas llamadas antiapoptóticas que pueden promover la supervivencia de la célula (Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1, A1/Bfl-1, Calbindina) y proteínas pro-apoptóticas que pueden acelerar la muerte celular (Bax, Bak, Bcl-Xs, Bad, Bid, Bik, Hrk, Bok) (140, 1, 38). Los mecanismos de acción de los agentes apoptóticos, tanto intracelulares como extracelulares, convergen para activar un grupo de proteasas específicas denominadas caspasas, caracterizadas por presentar cisteína en su sitio activo que rompen sus sustratos en un residuo de ácido aspártico, de lo que deriva su nombre (cisteinil-aspartato-proteasas) (140). Se han descrito dos vías principales que conllevan a la apoptosis celular, la vía extrínseca o vía del receptor de muerte, y la vía intrínseca o vía mitocondrial, aunque existen evidencias que sugieren que en ciertos tipos celulares estas vías deben interaccionar (101, 142). La vía intrínseca de la apoptosis involucra la liberación de citocromo c desde la mitocondria hacia el citosol, donde se formará el "apoptosoma" por el ensamblamiento de Apaf-1 ("Apoptotic protease-activating factor", factor de activación de la proteasa apoptótica) que resulta en la activación de la caspasa iniciadora 9 y la siguiente activación proteolítica de las caspasas ejecutoras 3, 6 y 7. Al activarse, estas caspasas son luego involucradas en el clivaje de un set de proteínas, como poli (ADP-Ribosa) polimerasa (PARP), laminina, actina y gelsolina, y causan cambios morfológicos de la célula incluyendo el núcleo (115, 136). Los miembros de proteínas de la familia Bcl-2 juegan un rol importante en esta vía apoptótica dependiente de mitocondria, con proteínas que actúan como inductoras de

apoptosis (ej. Bax) y proteínas que actúan como supresoras de la muerte celular (ej. Bcl-2) (1). También existe una proteína mitocondrial denominada Smac ("Second mitochondria-derived activator of caspases", Segundo activador de caspasas derivado de mitocondria) o Diablo, la cual es liberada desde la mitocondria al citosol siguiendo el estímulo apoptótico y promoviendo apoptosis por inhibición de las proteínas denominadas IAPs ("Inhibitor of apoptotic protein", proteínas inhibidoras de apoptosis) (32, 131).



Fig. 1. Esquema representativo de las vías apoptóticas.

La vía extrínseca involucra la participación de receptores de membrana para su activación, tales como el receptor de muerte Fas (o CD95) y el del factor de necrosis tumoral (TNF). La unión de la proteína transmembrana Fas al ligando FasL (o CD95L) induce trimerización de receptores Fas, los cuales reclutan a FADD ("Fas associated death domain", dominio de muerte asociado a Fas). El complejo Fas/FADD luego se une a la caspasa iniciadora 8 ó 10 a través de interacciones entre el dominio efector de muerte de FADD y las moléculas de caspasa. Dichas caspasas iniciadoras activan a las caspasas ejecutoras 3, 6 y 7, las cuales conducen al desensamblaje celular. Ambas vías convergen en la caspasa-3 y otras caspasas ejecutoras y nucleasas que llevan a la fragmentación del ADN nuclear, evento terminal de la muerte celular programada (130). Algo similar sucede con el otro receptor de membrana para TNF. Su porción intracelular conecta con proteínas como Tradd ("TNF receptor associated death domain", dominio de muerte asociado al receptor de TNF) y Raidd ("receptor interacting protein ICH-1/CED-3 homologous protein with a death domain", proteína homóloga a la proteína CED-3 que interactúa con el receptor y que posee dominio de muerte) que activan a las caspasas iniciadoras.

Se ha demostrado que el sistema Fas puede estar involucrado en la regulación de la apoptosis de células germinales en testículos de rata (24). Lizama y col. (75) han puesto en evidencia que el sistema Fas produce apoptosis en espermatocitos de la primera onda de la espermatogénesis en rata. Cuando la apoptosis ocurre en los espermatocitos en paquitene como resultado de estímulos tales como el calor o la deprivación hormonal, parece ser que solamente la vía intrínseca apoptótica está estimulada (116). El mecanismo independiente de caspasas disparado por activación de calpaínas es otro mecanismo que se ha sugerido que participaría en la muerte por apoptosis de células germinales (29). Los miembros de la familia p53 y las

altas concentraciones de calcio intracelular también parecen ser importantes reguladores de la muerte apoptótica en células espermatogénicas (82, 94). Mizuno y col. (83) han demostrado que la activación del factor de transcripción NF-kappaB ("nuclear factor-kappa B", factor nuclear-kappa B) está asociado con la apoptosis de las células germinales en testículos criptorquidios de rata inducidos experimentalmente, lo cual sugiere que el NF-kappaB desempeña ciertos roles en la apoptosis de las células germinales.

Existen algunas evidencias que sugieren que el calcio está involucrado en procesos que ocurren durante el desarrollo y función del espermatozoide (117, 133). Proteínas dependientes de calcio, entre ellas calmodulina, son expresadas durante la espermatogénesis en mamíferos, lo cual indica que el calcio toma parte en esta regulación (9). Sin embargo, los roles precisos del calcio en la espermatogénesis no se han dilucidado totalmente.

Calbindina  $D_{28K}$  (CB) es una proteína citosólica con capacidad de modular los niveles de calcio iónico intracelular, y algunos autores le adjudican una función citoprotectora (134, 96). Desde hace mucho tiempo se conoce que esta proteína se expresa en testículo de rata y pollo en relación temporal con los procesos de espermatogénesis y de esteroidogénesis (58, 62). Se ha demostrado que la vitamina D aumenta la expresión de CB en testículos de pollos, independientemente de los niveles séricos de calcio, fósforo y testosterona (59). Estos autores sugieren que la vitamina D puede jugar un rol a nivel molecular en la reproducción de pollos machos vía inducción de CB. Sin embargo, el mecanismo de acción de la vitamina D y CB en reproducción no está bien dilucidado. Se ha atribuido a CB la función de proteger a las células de insultos citotóxicos a través de su capacidad de "bufferizar" la elevación del calcio iónico intracelular (78). En células tales como neuronas y osteoblastos, se ha demostrado que CB protege de la muerte por apoptosis modulando las variaciones de Ca<sup>+2</sup> intracelular o inhibiendo a la caspasa-3 (27). Proteínas que fijan Ca<sup>+2</sup> tales como parvalbúmina, calrretinina, calmodulina y recoverina, podrían jugar un papel similar al de CB. Su rol como molécula que podría demorar la muerte celular y acelerar la proliferación celular se ha propuesto anteriormente (128, 98). Recientemente, Cui y col. (30) al realizar un análisis proteómico en biopsias de testículos humanos tratados con undecanoato de testosterona, solo o en combinación con levonorgestrel, sugirieron que la parvalbúmina podría proteger a las células testiculares de la apoptosis y promover la sobrevida celular.

Debido a que en los ratones heterocigotas Robertsonianos *Mus musculus domesticus* se observa una masiva muerte de células germinales en cada etapa de la diferenciación celular y que el número de espermatocitos en paquitene disminuye significativamente desde el estadio I al XII (79), se propone la siguiente **hipótesis de trabajo**: "Los rearreglos cromosómicos alteran la expresión de genes que conducen a la apoptosis de células germinales y, en forma directa o indirecta, producen mayor expresión del gen de calbindina  $D_{28K}$  en determinadas células de la serie espermatogénica con el propósito de evitar la muerte celular".
En base a las consideraciones que preceden, se propuso el siguiente **OBJETIVO GENERAL**:

Conocer los mecanismos pro y antiapoptóticos desencadenados por los rearreglos cromosómicos Robertsonianos en testículos de ratones.

Para ello se plantearon los siguientes **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**:

- Analizar los cambios morfológicos estructurales y ultraestructurales de los testículos en ratones híbridos subfértiles e infértiles que resultan del cruzamiento de ratones con distinto número cromosómico.
- Determinar la cascada de señales apoptóticas desencadenada por los rearreglos cromosómicos en testículos de dichos animales.
- Demostrar un posible rol de calbindina D<sub>28K</sub> como agente antiapoptótico en testículos de los mismos animales.



#### ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Se emplearon dos modelos animales experimentales de ratones machos híbridos con fusiones Rb:

1) híbridos subfértiles (2n = 32, con ocho fusiones Rb en condición heterocigota) de 5 meses de edad surgidos del cruzamiento de ratones hembras CD1 (2n = 40) y machos Milano II ó Mil II (2n = 24, con ocho fusiones Rb en condición homocigota) de la especie *Mus musculus domesticus* (provenientes de Lombardía, Italia);

2) híbridos infértiles (2n = 38, con cuatro fusiones Rb en condición heterocigota) de 1, 2 y 3 meses de edad obtenidos del cruzamiento de hembras *Graomys griseoflavus* (*G. griseoflavus*) (2n = 34, con cuatro fusiones Rb en condición homocigota) y machos G*raomys centralis* (*G. centralis*) (2n = 42). Los ratones de la especie *G. centralis* se capturaron en el área de Montecristo y Capilla de los Remedios (Córdoba, Argentina), los ratones *G. griseoflavus* se capturaron en La Paz y Ñacuñan (Mendoza, Argentina), y los híbridos se obtuvieron en el laboratorio "Dr. Cañas" de la Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba.

Los ratones se mantuvieron en bioterio con temperatura controlada (25  $\pm$  2°C), con un fotoperíodo de 12h luz: 12h oscuridad. El alimento y el agua se ofrecieron *ad libitum*. El cariotipo de cada animal fue controlado a través de preparaciones metafásicas obtenidas de médula ósea (41). Se utilizaron tres a cuatro individuos de cada grupo de ratones para cada experimento. Los animales se sacrificaron por dislocación cervical.

# ANÁLISIS MORFOLÓGICO

Se estimaron las siguientes características morfológicas de los ratones híbridos subfértiles, infértiles y sus respectivos parentales: largo corporal (medida desde el extremo del hocico hasta el origen de la cola) (cm), largo de la cola (cm), peso corporal (gr.), longitud testicular (cm) y peso testicular (gr.) a diferentes edades.

# HISTOLOGÍA

Se obtuvieron los testículos derechos de cada ratón, los cuales se fijaron en solución de Bouin durante 4 horas. Luego, se realizaron una serie de lavados con alcohol 70°. Los testículos fijados se embebieron en paraplast (Oxford Labware, Saint Louis, MO, USA) siguiendo el procedimiento tradicional de inclusión en parafina, para lo cual se sometieron a una serie de soluciones deshidratantes alcohólicas (etanol 80° durante 1 hora y 15 minutos, etanol 96° durante 1 hora y 30 minutos, dos pasajes de etanol 100° de 1 hora cada uno y dos pasajes de acetona de 30 minutos cada uno) para finalizar sumergiéndolos en paraplast a 55°C durante toda la noche. Por último, con los testículos parafinizados se obtuvieron cortes tisulares seriados de 5 µm de espesor empleando un micrótomo de congelación (Leica SM 2000 R, Leica Microsystems Nussloch GmbH, Nussloch, Alemania). Las secciones tisulares se colocaron sobre portaobjetos especiales para inmunohistoquímica (HiFix NH, InProt, Munro, Argentina).

Para el análisis morfológico de las células germinales y la identificación de los estadios del epitelio seminífero se empleó la tinción de hematoxilina - PAS (Periodic – Acid Schiff) (89).

# MICROSCOPÍA ÓPTICA

Los preparados se analizaron con un microscopio LEICA Micro Star IV (Leica Microscopy and Scientific Instruments Group, Buffalo, NY, USA) y se obtuvieron microfotografías de las secciones tisulares empleando una video cámara digital LEICA DC180 (Programa Leica IM50 Image Manager, Leica, Cambridge, Gran Bretaña). Se utilizó Adobe Photoshop CS como programa de apoyo.

### MICROSCOPÍA ELECTRÓNICA

Para el análisis ultraestructural, los testículos de los diferentes grupos de ratones se fijaron por inmersión en una solución de formaldehído al 4% (V/V) y glutaraldehído al 2% (V/V) en un buffer cacodilato de sodio 0,1 M a 4°C. Luego los tejidos fueron postfijados en una solución de tetróxido de osmio al 1% (P/V) en una solución acuosa de ferrocianuro de potasio al 1,5% y posteriormente incluidos en resinas epoxi. Para la concreción de estos estudios, los cortes y microfotografías electrónicas se realizaron en el Centro Microscópico Electrónico de la Universidad Nacional de Córdoba (Dra. Cristina Maldonado).

#### ENSAYO HORMONAL

Los niveles de testosterona sérica de los ratones *Graomys* híbridos y parentales se midieron por inmunoquimioluminiscencia (ECLIA) (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania). No pudo realizarse este ensayo con los ratones provenientes de Italia, debido a la dificultad del envío de material biológico.

# ANÁLISIS INMUNOHISTOQUÍMICO

Antisueros empleados: En las diferentes tinciones realizadas se emplearon los anticuerpos primarios que se detallan a continuación, cuya reactividad frente a los correspondientes epitopes de las proteínas de testículo de ratón se comprobó previamente:

- a) anticuerpo monoclonal de ratón anti-Fas humano (BD Pharmingen Biosciences, San José, CA, USA).
- b) anticuerpo policional de conejo anti-Bax de ratón (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA).
- c) anticuerpo monoclonal de ratón anti-citocromo c de paloma (BD
  Pharmingen Biosciences, San José, CA, USA).
- d) anticuerpo monoclonal de ratón anti-calbindina D<sub>28K</sub> de intestino de pollo (SIGMA-Aldrich, Inc., St. Louis, MO, USA).

En los ratones CD1, Milano II y sus híbridos subfértiles se determinó la expresión de las siguientes proteínas: Bax, citocromo c y CB. En los ratones *Graomys* híbridos y parentales además de las proteínas antes mencionadas se determinó la expresión de la proteína pro-apoptótica Fas.

# Técnica de inmunoperoxidasa en tres pasos sobre secciones tisulares parafinizadas:

Se empleó la técnica de inmunoperoxidasa en tres pasos utilizando el sistema estreptavidina-biotina (Histostain-SP Kit, ZYMED Laboratories, Inc., San Francisco, California, USA) sobre tejidos parafinizados. Después de la desparafinización (tres pasajes de xilol durante cinco minutos cada uno), las

secciones se hidrataron e incubaron con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0,5% diluido en metanol (V/V) durante 10 minutos para reducir la actividad de la peroxidasa endógena. Los preparados se lavaron con PBS (NaCl 0,15 M / NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2,6 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>7,4mM, pH 7,3) y se bloquearon los sitios de unión inespecíficos con suero normal bovino (ZYMED Laboratories, Inc., San Francisco, CA, USA). Luego, los anticuerpos primarios se aplicaron en diferentes diluciones: anticuerpo anti-Bax (dilución: 1:500), anti-citocromo c (dilución: 1:1000), anti-Fas (dilución: 1:500) y anti-calbindina D<sub>28K</sub> (dilución: 1:1000). Las incubaciones con los anticuerpos primarios anti-Fas y anti-Bax se realizaron a 4°C durante toda la noche, mientras los anticuerpos anti-citocromo c y anti-CB a 37°C durante 2 horas. Posteriormente, las secciones se lavaron con PBS y se incubaron con el anticuerpo secundario biotinilado (ZYMED Laboratories, Inc., San Francisco, CA, USA). A los 30 minutos, se incubaron con estreptavidina peroxidasa-conjugada (ZYMED Laboratories, Inc., San Francisco, CA, USA). Para revelar la actividad peroxidasa se usó tetrahidrocloruro de 3,3'-diaminobencidina (DAB) (ZYMED Laboratories, Inc., San Francisco, CA, USA) en presencia de peróxido de hidrógeno. Las secciones tisulares se contratiñeron con hematoxilina (Biopur, Rosario, Argentina) para una mejor visualización de su morfología.

# ANÁLISIS DE LA FRAGMENTACIÓN DEL ADN

#### Técnica de TUNEL:

Para detectar la fragmentación del ADN por endonucleasas endógenas, paso final de la muerte por apoptosis, se empleó la técnica de TUNEL (Terminal deoxinucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling) sobre secciones transversales de túbulos seminíferos de 5 µm de espesor utilizando el kit ApopTag Plus Peroxidase *in situ* Apoptosis Detection (Chemicon International, Temecula, CA, USA). Las secciones se permeabilizaron por incubación con proteinasa K (20 µg/ml) (SIGMA-Aldrich, Inc., St. Louis, MO, USA) durante 10 minutos, y luego se expusieron a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3% durante 5 minutos para inhibir la peroxidasa endógena. Posteriormente, se incubaron con la enzima deoxinucleotidil terminal transferasa (TdT) durante 1 hora a 37°C, se lavaron con PBS, se incubaron con el conjugado anti-digoxigenina y finalmente se revelaron con DAB (ZYMED Laboratories, Inc., San Francisco, CA, USA). Las secciones se contratiñeron con verde de metilo al 0,5% (P/V) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Los controles negativos y positivos se incluyeron en cada experimento. Los controles positivos se establecieron usando preparados provistos por el mismo Kit. Las secciones procesadas sin la enzima TdT en la reacción se usaron como controles negativos.

Los resultados se analizaron en comparación con la inmuno-expresión de CB en secciones tisulares paralelas realizadas según la técnica descrita anteriormente.

#### ANÁLISIS DE WESTERN BLOTS

Se realizó la técnica de Western blots con los testículos izquierdos (libres de la membrana albugínea) de ratones CD1, Milano II, híbridos subfértiles, *G. centralis, G. griseoflavus* e híbridos infértiles para detectar la expresión de Bax, citocromo c y CB. En los ratones *Graomys*, además se

determinó la expresión de las siguientes proteínas: Fas y Fas-L de la vía apoptótica extrínseca y, pro-caspasa-3 y caspasa-3 activa.

Homogeneizados de tejidos testiculares se prepararon con buffer de lisis RIPA (radioinmunoprecipitación) constituido por: dodecilsulfato sódico (SDS) 1% (Amersham Biosciences, Gran Bretaña), Triton X-100 1%, deoxicolato de sodio 0,5% en PBS, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 1 mM (SIGMA-Aldrich, Inc., St. Louis, MO, USA) y NaF 1 mM. La suspensión se centrifugó a 13.000 g durante 10 minutos y la concentración de proteínas se determinó usando el método de Gornall y col. (46). Alícuotas de 50 µg de proteínas se diluyeron en 12 µl de una solución de disociación constituida por: SDS 5% P/V, β mercaptoetanol 10% V/V, Tris-HCl 0,5 M, glicerol 20% V/V y azul de bromofenol 0,5% P/V. Las muestras se calentaron a 95°C durante cinco minutos. A continuación, las proteínas se separaron mediante electroforesis en mini-geles desnaturalizantes de poliacrilamida con SDS (12%) según la técnica de Laemmli (68), aplicando un voltaje constante de 120 V durante aproximadamente 2 horas. En el mismo gel se corrieron proteínas estándares preteñidas de peso molecular conocido (SIGMA-Aldrich, Inc., St. Louis, MO, USA) distribuidas en un rango de peso molecular de 26 a 180 kDa. Posteriormente, se electrotransfirieron a hojas de nitrocelulosa de 0,45 µm de espesor (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) durante 1 hora aplicando un voltaje de 100 V y 350 mA de corriente de acuerdo con el procedimiento de Towbin y col. (129). El buffer de transferencia estaba constituido por: Tris-HCl 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0,05% P/V y metanol 20% V/V. Para el bloqueo de los sitios inespecíficos, la membrana de nitrocelulosa se incubó con un agente bloqueante 2% (Amersham Biosciences, Gran Bretaña) en solución Tris-Salina 0,5 M, pH 7,5 durante 1 hora y media. La inmunodetección de las proteínas se realizó incubando la membrana durante toda la noche a 4°C con los siguientes anticuerpos:

- a) anticuerpo monoclonal de ratón anti-Fas humano (BD Pharmingen Biosciences, San José, CA, USA).
- b) anticuerpo policional de conejo anti-Fas-L de rata (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA).
- c) anticuerpo policional de conejo anti-Bax de ratón (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA).
- d) anticuerpo monoclonal de ratón anti-citocromo c de paloma (BD Pharmingen Biosciences, San José, CA, USA).
- e) anticuerpo monoclonal de conejo anti-caspasa 3 activa humano (BD Pharmingen Biosciences, San José, CA, USA).
- f) anticuerpo monoclonal de ratón anti-calbindina D<sub>28K</sub> de intestino de pollo (SIGMA-Aldrich, Inc., St. Louis, MO, USA).

Luego de tres lavados, las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario biotinilado a 37°C durante 1 hora y posteriormente se añadió la estreptavidina peroxidasa-conjugada (Histostain-SP Kit, ZYMED Laboratories, Inc., San Francisco, CA, USA) durante 30 minutos a temperatura ambiente. En todos los casos, la detección se realizó revelando la actividad peroxidasa en presencia de peróxido de hidrógeno con DAB (ZYMED Laboratories, Inc., San Francisco, California, USA) como cromógeno, hasta la aparición de las bandas de color marrón (5-10 minutos); la reacción se detuvo con agua destilada. Los anticuerpos monoclonales anti-gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

(GAPDH) de ratón (SIGMA-Aldrich, Inc., St. Louis, MO, USA) y anti-actina de rata (SIGMA-Aldrich, Inc., St. Louis, MO, USA) se usaron para detectar las proteínas GAPDH y actina utilizadas como marcadores para normalizar la expresión relativa de otras proteínas.

Se obtuvieron densidades ópticas relativas de las bandas inmunorreactivas empleando un programa KS Lite 2.0 (Kontron Elektronik, Eching, Alemania) sobre imágenes digitales de las membranas de nitrocelulosa.

#### ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se seleccionaron al azar cinco secciones de cada testículo para los estudios inmunohistoquímicos y el ensayo de TUNEL. Un túbulo seminífero por sección testicular se consideró apoptótico (túbulo TUNEL (+)) cuando se hallaron 2 o más células TUNEL (+) presentes dentro del epitelio seminífero (33). Dos secciones seriadas se trataron con dos diferentes anticuerpos (CB y Fas, CB y Bax, CB y citocromo c) o con el anticuerpo anti-CB y TUNEL, para comparar y analizar la colocalización de los diferentes marcadores. Dos operadores independientes observaron las secciones seriadas y realizaron los conteos de células y túbulos seminíferos bajo el microscopio.

Los resultados se evaluaron estadísticamente mediante ANOVA a una vía seguido del test de Bonferroni que se empleó como test post-hoc. Las diferencias entre grupos se consideraron significativas a P < 0,05.

#### Tesis Doctoral de: VALERIA ANDREA RODRÍGUEZ



# RATONES MUS MUSCULUS DOMESTICUS

Los ratones CD1, Milano II y los híbridos subfértiles de 5 meses de edad (n = 5) no mostraron diferencias en longitud corporal (CD1:  $9 \pm 1$  cm, Milano II:  $7 \pm 2$  cm, híbridos:  $9 \pm 1$  cm), en el largo de la cola (CD1:  $10 \pm 2$  cm, Milano II:  $9 \pm 3$  cm, híbridos:  $9 \pm 2$  cm) y en el peso corporal (CD1:  $40 \pm 3$  gr., Milano II:  $39 \pm 2$  gr., híbridos:  $40 \pm 2$  gr.). Tampoco difirieron en la longitud testicular (CD1:  $0.78 \pm 0.1$  cm, Milano II:  $0.76 \pm 0.1$  cm, híbridos:  $0.75 \pm 0.1$  cm).

Es de resaltar que se emplearon ratones de 5 meses de edad, ya que previamente Merico y col. (79) habían demostrado que en los ratones híbridos *Mus musculus domesticus* el proceso espermatogénico se hallaba más deteriorado a los 5 meses que a los 3 y 7 meses de edad.

La histología testicular de los ratones parentales fue de apariencia normal, mientras que los híbridos mostraron una gran proporción de túbulos seminíferos defectuosos, con asociaciones celulares atípicas y severa pérdida de células germinales, como se había demostrado previamente (79).

Los ratones CD1 y Milano II exhibieron escasas células TUNEL (+) por túbulo seminífero, mientras que los híbridos presentaron una fuerte tinción de TUNEL (Fig. 2). El porcentaje de túbulos TUNEL (+) por sección testicular fue significativamente más alto en los testículos de los híbridos en comparación con el de los parentales (Tabla 1). La mayoría de los túbulos mostraron apoptosis de células germinales en el estadio XII del ciclo del epitelio seminífero. El porcentaje de células TUNEL (+) por túbulo seminífero fue siete y nueve veces más alto en los ratones híbridos comparado con el de los ratones CD1 y Milano II, respectivamente, lo cual sugiere que la masiva muerte celular de las células germinales en los híbridos ocurrió vía apoptosis. Aunque los ratones Milano II presentaron un mayor porcentaje de túbulos TUNEL (+) comparado con el de los ratones CD1, no se demostraron diferencias significativas en el porcentaje de túbulos TUNEL (+) ni en el porcentaje de células TUNEL (+) por sección testicular.



**Fig. 2.** Tinción de TUNEL en túbulos seminíferos de los ratones CD1 (A), Milano II (B) e híbridos (C). Las flechas indican espermatocitos en metafase TUNEL positivos del estadio XII. El color marrón indica positividad de TUNEL. La barra de magnificación equivale a 50 µm.

Tabla 1. Frecuencia de túbulos seminíferos TUNEL positivos por sección testicular y porcentaje de células germinales TUNEL positivas por túbulo seminífero en los ratones CD1, Milano II e híbridos subfértiles

Citotipo	Porcentaje de túbulos seminíferos TUNEL (+)/ sección testicular	Porcentaje de células TUNEL (+)/túbulo seminífero
CD1 Milano II Híbridos	$\begin{array}{rrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrr$	$\begin{array}{rrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrr$

Los datos son expresados como medias  $\pm$  ES. \* P< 0,004 *vs* CD1 y Milano II. <sup>†</sup> P< 0,001 *vs* CD1 y Milano II. La microscopía electrónica reveló que los espermatocitos de los híbridos presentaban un gran número de mitocondrias conglomeradas alrededor del núcleo (Fig. 3B), mientras que en los espermatocitos de los parentales las mitocondrias se hallaban dispersas (Fig. 3A). El movimiento de las mitocondrias alrededor del núcleo de los espermatocitos en los híbridos puede ser considerado una indicación de apoptosis. De hecho, la redistribución de las mitocondrias alrededor del núcleo se ha observado en células apoptóticas de testículos de ratones después de una inducción apoptótica (130). En los híbridos, también se observaron irregularidades en la membrana nuclear de los espermatocitos y espermátides y malformaciones del acrosoma en las espermátides (Fig. 3B).



**Fig. 3.** Microfotografías electrónicas de células germinales de testículos de ratones CD1 (A) e híbridos (B). La flecha en (A) indica mitocondrias dispersas en los espermatocitos y la flecha en (B) indica un conglomerado de mitocondrias alrededor del núcleo de un espermatocito. El asterisco muestra un acrosoma defectuoso de una espermátide. La barra de magnificación equivale a 5 μm.

Al observar los cambios ultraestructurales en las células germinales, se formuló la hipótesis de que la vía apoptótica intrínseca o mitocondrial podría estar involucrada en la apoptosis de las células espermatogénicas. Para demostrar esto, se examinó por inmunohistoquímica la localización de Bax, molécula pro-apoptótica que transloca desde el citoplasma al núcleo, y la liberación de citocromo c desde la mitocondria al citoplasma y núcleo.

En la Fig. 4 se observa una intensa tinción de Bax y citocromo c en el citoplasma y en el núcleo en las células germinales de ratones híbridos, índice de que el mecanismo apoptótico intrínseco estaría involucrado en la muerte de las células germinales. La redistribución de Bax y citocromo c ocurrió en los mismos túbulos seminíferos defectuosos que mostraron tinción positiva de TUNEL. En los híbridos, estos marcadores apoptóticos fueron principalmente detectados en los espermatocitos en metafase del estadio XII del ciclo del epitelio seminífero (Tabla 2). Bax prácticamente estuvo ausente en otros tipos celulares, pero citocromo c además se expresó en 2,5% de espermatocitos en paquitene, 11% de espermátides y 11% de células de Sertoli por túbulo seminífero, mientras que la reactividad de TUNEL se detectó solamente en el 3% de espermatocitos en paquitene por sección tubular.



**Fig. 4.** Túbulos seminíferos en el estadio XII en ratones híbridos. Tinción de Bax (A), citocromo c (B), calbindina  $D_{28k}$  (C) y TUNEL (D). La mayoría de las células positivas son espermatocitos en metafase (flechas e insertos). El asterisco indica colocalización de espermatocitos CB y TUNEL positivos. La barra de magnificación equivale a 50 µm.

Tabla 2. Frecuencia de espermatocitos en metafase positivos por sección testicular para los marcadores apoptóticos estudiados en ratones híbridos subfértiles

_	Porcentaje de espermatocitos en metafase (+) / sección testicular					
Citotipo	Bax	Citocromo c	TUNEL	СВ		
Híbridos	78,95 ± 7,14	64,14 ± 10,24	63,48 ± 8,74	56,66 ± 5,81		

Los datos son expresados como medias  $\pm$  ES.

La redistribución de Bax y citocromo c no se acompañó de incremento en la expresión de la proteína, ya que la cantidad de Bax y citocromo c en los testículos de los tres grupos experimentales no difirieron entre sí, como puede observarse en los Western blots (Fig. 5).

Por el contrario, CB, una proteína anti-apoptótica que puede prevenir o bloquear la muerte por apoptosis, se expresó mucho más en los testículos de los ratones híbridos que en los testículos de ratones CD1 y Milano II, como se muestra en los análisis de Western blots (Fig. 5). Se puede apreciar que, CB presentó dos bandas (28 kDa y 56 kDa), lo cual indica que esta proteína forma dímeros en los testículos de los ratones. La dimerización de CB también se ha demostrado en el endometrio humano (76). En los testículos de los híbridos, la cantidad del monómero y del dímero de CB fue tres y dos veces superior, respectivamente, que la correspondiente en ambos parentales.

La inmunohistoquímica reveló que las células CB positivas se expresaron principalmente en túbulos del estadio XII (Fig. 4). En los híbridos, la reactividad de CB fue mayor en los espermatocitos en metafase, en aproximadamente 56,6% del total de estas células (Tabla 2). CB también se expresó en menor medida en otras células: espermátides 14,19%, células de Sertoli 8,95% y espermatocitos 2,74%. Solamente el 2-3% de las espermátides/sección testicular expresaron CB en los testículos de los ratones CD1 y Milano II.



**Fig. 5.** Representación de Western blots obtenidos usando anticuerpos anti-Bax, anticitocromo c y anti-calbindina  $D_{28k}$  en homogeneizados de testículos de ratones CD1, Milano II e híbridos. El anticuerpo anti-actina fue utilizado como control de carga. Calbindina  $D_{28k}$  presenta dos bandas, una de 28kDa (monómero) y otra de 56 kDa (dímero).

La colocalización de CB y TUNEL fue limitada en los tres grupos de animales. La colocalización de CB/Bax, CB/citocromo c y CB/TUNEL fue casi ausente en los testículos de los ratones parentales. En los híbridos, en cambio, la colocalización de CB/Bax, CB/citocromo c y CB/TUNEL se observó en el 9,99% ± 3,13, 10,14% ± 1,94 y 3,01% ± 1,10, respectivamente, de espermatocitos en metafase por sección testicular (Tabla 3). Los datos indican que el número de células que mostraron colocalización CB/Bax y CB/citocromo c fue más frecuente que la colocalización CB/TUNEL.

El porcentaje de células que presentaron expresión de CB y fragmentación del ADN fue muy bajo en comparación con el porcentaje de células en las cuales CB y Bax o CB y citocromo c se co-expresaron. El resto de las células CB (+) no mostraron reactividad con la tinción de TUNEL o con los anticuerpos anti-Bax o anti-citocromo c.

Tabla 3. Colocalización de calbindina con los distintos marcadoresapoptóticos en testículos de ratones híbridos subfértiles

Porcentaje de colocalización de marcadores en espermatocitos en metafase (+) / sección testicular							
Citotipo	CB / Bax	CB / Cit c	CB / TUNEL				
Híbridos	9,99 ± 3,13	10,61 ± 1,94	3,01 ± 1,10 *				

Los datos son expresados como medias ± ES. \* P< 0,05 vs CB/Bax y CB/cit c.

# **RATONES** GRAOMYS

Los tres grupos de animales experimentales (*G. centralis*, *G. griseoflavus* e híbridos) no mostraron diferencias en longitud y peso corporal, pero el tamaño y el peso testicular fueron menores en los híbridos en comparación con los de los parentales (Fig. 6).

La relación peso testicular/peso corporal incrementó con la edad en ambos parentales y en el híbrido (Tabla 4). No obstante, esta relación fue menor en los híbridos en comparación con la de los parentales en las tres edades estudiadas.

Los niveles séricos de testosterona incrementaron en los parentales de 1 a 2 meses de edad. Los híbridos exhibieron valores inferiores de la hormona con respecto a sus parentales en concordancia con el menor tamaño testicular (Tabla 4). Si bien la concentración de testosterona aumentó en los ratones híbridos significativamente a los 3 meses en comparación con la de los híbridos más jóvenes, fue ocho veces más baja que la de los parentales.



**Fig. 6.** Fotografía del testículo izquierdo de ratón *G. centralis* (a) e híbrido (b), ambos de tres meses de edad. La barra de magnificación equivale a 0,5 cm.

Tabla 4. Relación peso testicular/peso corporal y testosterona sérica de

Citotipo	Edad (meses)	Peso Testicular/ Peso Corporal 10 <sup>-4</sup>	Testosterona sérica (ng/mL)		
<i>G. centralis G. griseoflavus</i> Híbridos	1	$\begin{array}{rrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrr$	$\begin{array}{rrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrr$		
<i>G. centralis G. griseoflavus</i> Híbridos	2	$\begin{array}{rrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrr$	$\begin{array}{rrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrr$		
<i>G. centralis G. griseoflavus</i> Híbridos	3	$\begin{array}{rrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrr$	$\begin{array}{rrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrr$		

los diferentes citotipos de Graomys

Los datos son expresados como medias  $\pm$  ES. \* P< 0,05 vs animales de 2 y 3 meses con el mismo citotipo. \*\* P<0,001 vs híbridos de 1 y 2 meses. <sup>†</sup> P<0,001 vs *G. centralis* de la misma edad. <sup>‡</sup> P< 0,05 vs *G. griseoflavus* e híbridos de la misma edad. <sup>§</sup> P<0,001 vs *G. centralis* y *G. griseoflavus* de la misma edad.

Los parentales presentaron una histología testicular normal acorde con el tiempo de desarrollo. Al mes de edad, los ratones *G. centralis* presentaron algunas pocas espermátides (Fig. 7a), los *G. griseoflavus* mostraron espermatocitos en leptotene (Fig. 7e) y los híbridos revelaron la presencia de algunos espermatocitos en paquitene tempranos (Fig. 7i). El epitelio seminífero de los parentales a los 2 y 3 meses mostró una espermatogénesis completa con 12 estadios de diferenciación y maduración de células germinales. Por el contrario, los híbridos mostraron arresto de la espermatogénesis con una severa pérdida de células germinales y células meióticas con alto grado de degeneración (Fig. 7k).

La tinción de TUNEL reveló un número significativo de células apoptóticas en túbulos seminíferos de ratones *G. centralis* de un mes de edad (Fig. 7b). En los ratones *G. griseoflavus* y en los híbridos de la misma edad se observaron muy pocas células TUNEL (+) por túbulo seminífero. En los tres grupos estudiados, la mayoría de las células TUNEL (+) fueron espermatocitos en paquitene. El elevado número de células apoptóticas en los testículos de ratones *G. centralis* estaría indicando que en este tiempo (1 mes) se produciría la primera onda de la espermatogénesis. En cambio, en los otros dos grupos de animales la espermatogénesis sería más tardía. A los 2 y 3 meses, los parentales presentaron muy pocas células TUNEL (+) por túbulo seminífero (Fig. 7d, h), y los híbridos exhibieron un gran número de células apoptóticas por túbulo seminífero (Fig. 7l). Las células de Leydig no revelaron tinción positiva para TUNEL en ninguno de los grupos experimentales estudiados, indicando ausencia de muerte celular.



**Fig. 7.** Tinción de túbulos seminíferos de los ratones *Graomys* con Hematoxilina-PAS y TUNEL. Túbulos seminíferos teñidos con Hematoxilina-PAS (a, c, e, g, i, k) y TUNEL (b, d, f, h, j, l) de *G. centralis* (a-d), de *G. griseoflavus* (e-h) e híbridos (i-l). (a, b, e, f, i, j): animales de 1 mes; (c, d, g, h, k, l): animales 3 meses de edad. La flecha y el inserto muestran espermátides. El color marrón indica positividad de TUNEL. La barra de magnificación equivale a 20 µm.

Con el propósito de analizar más detalladamente la morfología de las células germinales, se realizó el estudio ultraestructural de los testículos de los ratones *Graomys* parentales y de los híbridos.

Ambos parentales revelaron la presencia de células germinales de apariencia normal, que se detalla a continuación.



**Fig. 8.** Microfotografías electrónicas de células germinales de testículos de ratones *G. centrali*s de 1 mes (a, b, c), 2 meses (d, e, f) y 3 meses de edad (g, h, i). N: nucleolo, \*: cuerpo apoptótico, vs: vesícula sexual, RE: retículo endoplásmico, M: mitocondrias, flecha: hebra de cromatina. La barra de magnificación equivale a 10  $\mu$ m (a, b, d, e, g, h) y 5  $\mu$ m (c, f, i).

El análisis ultraestructural de los testículos de los ratones *G. centralis* reveló una espermatogénesis con características normales. Al mes de edad, se observaron espermatocitos primarios de tamaño pequeño y con cromatina condensada característica de los primeros estadios (a partir de este momento comienzan a incrementar de tamaño) (Fig. 8a, b, c) y células de Sertoli con su nucleolo (N) sobre la membrana basal (Fig. 8a). En este período también se observaron algunos cuerpos apoptóticos (\*) característicos de la primera onda de la espermatogénesis (Fig. 8b). A los 2 meses, los espermatocitos en paquitene (Fig. 8d, e, f) se encontraron en estadios más avanzados (presencia la vesícula sexual, núcleo ovoide). A mayor aumento, en la Fig. 8f, se aprecia

un espermatocito en leptotene con finas hebras de cromatina en el núcleo (flecha) y, retículo endoplásmico (RE) y mitocondrias (M) en el citoplasma. A esta edad, también comienzan a observarse espermátides redondas (Fig. 8d) y elongadas (Fig. 8e), lo cual indica maduración del epitelio seminífero. A los 3 meses además de presentar las células antes mencionadas (Fig. 8g, i), se observaron espermatozoides (Fig. 8h) alineados, listos para liberarse. La cabeza del espermatozoide fue de forma espigada. Alrededor del mismo, se observaron cuerpos residuales (restos de citoplasma y organelas) y vacuolas. En la Fig. 8i se muestra con más detalle una espermátide característica del estadio VII.



**Fig. 9.** Microfotografías electrónicas de células germinales de testículos de ratones *G. griseoflavus* de 1 mes (a, b, c), 2 meses (d, e, f) y 3 meses de edad (g, h, i). vs: vesícula sexual. Flecha: complejo sinaptonémico. La barra de magnificación equivale a 10  $\mu$ m (a, b, d, g, h) y 5  $\mu$ m (c, e, f, i).

En los testículos de los ratones *G. griseoflavus* al igual que el de los ratones *G. centralis*, se observó una espermatogénesis completa y normal. Al mes de edad, se observaron espermatocitos primarios con distintos grados de diferenciación (Fig. 9a, b), y muy pocas espermátides (Fig. 9a, c). A los 2 meses de edad, presentaron espermatocitos en paquitene, como se observa claramente en la Fig. 9e, con presencia del complejo sinaptonémico (flecha), con cromatina finamente condensada y la vesícula sexual (vs). También, exhibieron espermátides (Fig. 9d) en distintos estadios y espermatozoides (Fig. 9f) alineados y rodeados de cuerpos residuales. A los 3 meses, mostraron los mismos tipos celulares que a los 2 meses de edad (Fig. 9g, h, i). En la Fig. 9i se muestra una espermátide del estadio II, con dos gránulos acrosomales.



**Fig. 10.** Microfotografías electrónicas de células germinales de testículos de ratones híbridos de 1 mes (a, b, c), 2 meses (d, e, f) y 3 meses de edad (g, h, i). (1), (2), (3): células en distintos estadios de la apoptosis. Flecha: espermátide con doble cabeza. La barra de magnificación equivale a 10  $\mu$ m (a, d, e, h) y 5  $\mu$ m (b, c, f, g, i).

Los testículos de los ratones híbridos, a diferencia de los de los parentales, revelaron células con características ultraestructurales de apoptosis en los tres tiempos estudiados. Al mes de edad exhibieron algunas células germinales normales (Fig. 10a), sin embargo presentaron un gran número de células apoptóticas. La fig. 10b muestra tres células con distinto grado de apoptosis: la célula inferior (1), en eventos tempranos de la apoptosis, ya que presentó condensación de la cromatina y membrana nuclear irregular; la célula de la izquierda (2), en una etapa más avanzada de la apoptosis, con la cromatina marginada cerca de la envoltura nuclear y picnosis nuclear (pérdida del volumen citoplasmático) y la célula superior (3), ya se halló en la etapa final de la apoptosis porque desapareció la envoltura nuclear y la cromatina se observó muy degradada. La Fig. 10c, muestra una célula de Sertoli fagocitando un cuerpo apoptótico. A medida que transcurre el tiempo, se observaron espermatocitos en paquitene que llegan a la luz del túbulo seminífero junto con numerosas proyecciones de las células de Sertoli, sin presencia de otro tipo de célula germinal más madura (Fig. 10d). Se encontró una gran cantidad de cuerpos apoptóticos (Fig. 10e) y espermatocitos en paquitene con signos de degradación o muerte celular (membrana nuclear alterada y mitocondrias de mayor volumen alrededor del núcleo) (Fig. 10f). A los 3 meses, la mayoría de las células germinales mostraron características de apoptosis (Fig. 10g, h, i) y sólo se encontraron escasas espermátides con estructuras atípicas, como por ejemplo, espermátides con doble cabeza (flecha) (Fig. 10h).

#### Tesis Doctoral de: VALERIA ANDREA RODRÍGUEZ

Tanto en los ratones *G. centralis* como en los ratones *G. griseoflavus*, el porcentaje de túbulos seminíferos TUNEL (+) por sección testicular fue alto al mes de edad, el cual disminuyó significativamente con el tiempo (Tabla 5). En los híbridos se duplicó el porcentaje de túbulos TUNEL (+) a los 2 meses de edad comparado con los híbridos más jóvenes, retornando a los valores iniciales a los 3 meses. En los ratones híbridos, los valores fueron significativamente altos a los 2 y 3 meses en comparación con los de los parentales.

El porcentaje de túbulos Fas (+) por sección testicular en los ratones *G. centralis* de 1 mes fue alrededor del 10%, valor que disminuyó con el tiempo (Tabla 5). Se detectó una baja frecuencia de túbulos Fas (+) por sección testicular en *G. griseoflavus* a diferentes edades. El porcentaje de túbulos Fas (+) en los testículos de los híbridos incrementó cuatro veces a los 2 y 3 meses en comparación con los híbridos de 1 mes de edad.

Tabla 5. Frecuencia de túbulos seminíferos positivos por sección testicular para los marcadores apoptóticos en diferentes citotipos de *Graomys* 

Citotipo	Edad (m)	TUNE	Ľ	F	as	E	Bax	Cito	cro	mo c
<i>G. centralis G.griseoflavus</i> Híbridos	1	$\begin{array}{rrrr} 30,31 & \pm \\ 27,94 & \pm \\ 20,89 & \pm \end{array}$	2,32* 2,84* 0,30	10,42 3,96 2,69	+ 0,37* + 3,40 + 1,63*	6,43 1,54 2,94	± 0,19* <sup>‡</sup> ± 0,98 ± 1,17*	20,34 11,11 6,12	± ± ±	1,47* <sup>◆</sup> 4,02 1,42*
G. centralis G.griseoflavus Híbridos	2	$\begin{array}{rrrr} 4,02 & \pm \\ 11,96 & \pm \\ 42,62 & \pm \end{array}$	1,33 0,61 2,32 <sup>†§</sup>	0,00 0,00 12,46	$\begin{array}{rrrr} \pm & 0,00 \\ \pm & 0,00 \\ \pm & 1,13^{\$} \end{array}$	1,14 0,83 19,51	$\begin{array}{rrrr} \pm & 0,71 \\ \pm & 0,83 \\ \pm & 1,40^{\$} \end{array}$	0,59 3,12 20,99	± ± ±	0,29 0,44 0,49 <sup>§</sup>
G. centralis G.griseoflavus Híbridos	3	8,62 ± 11,81 ± 26,41 ±	1,00 2,14 1,81 <sup>§</sup>	0,00 1,61 11,64	$egin{array}{ccc} \pm & 0,00 \ \pm & 0,81 \ \pm & 0,40^{\$} \end{array}$	1,69 0,77 17,56	$egin{array}{ccc} \pm & 0,90 \ \pm & 0,55 \ \pm & 1,55^{\$} \end{array}$	0,69 2,46 19,90	± ± ±	0,18 0,90 0,79 <sup>§</sup>

#### Porcentaje de túbulos seminíferos (+) / sección testicular

Los datos son expresados como medias  $\pm$  ES. (m): meses. \* P< 0,001 *vs* animales de 2 y 3 meses con igual citotipo. <sup>†</sup> P< 0,001 *vs* híbridos de 1 y 3 meses. <sup>§</sup> P< 0,001 *vs* otros citotipos de la misma edad. <sup>‡</sup> P< 0,05 *vs G. griseoflavus* de la misma edad. <sup>•</sup> P< 0,001 *vs* híbrido de la misma edad.

El patrón de expresión de las proteínas Bax y citocromo c en los testículos de los diferentes citotipos fue similar al de Fas. Como se muestra en la Tabla 5, Bax y citocromo c se expresaron en el epitelio seminífero al mes de edad en *G. centralis*, disminuyendo marcadamente con el tiempo. El porcentaje de túbulos Bax (+) y citocromo c (+) fue más bajo en *G. griseoflavus*, y también disminuyó con la edad. En los híbridos, el porcentaje de túbulos Bax (+) y citocromo c por sección testicular aumentó seis y tres veces, respectivamente,

a los 2 meses de edad comparado con el de los híbridos más jóvenes. Estos valores se mantuvieron altos a los 3 meses de edad. La expresión de Bax y citocromo c en los híbridos fue significativamente más alta que la de los parentales a los 2 y 3 meses de edad.

Las células germinales de los ratones parentales e híbridos, que presentaron inmunorreactividad para todos los marcadores estudiados y para TUNEL, fueron los espermatocitos en paquitene (Tabla 6). El porcentaje de espermatocitos en paquitene TUNEL (+) fue muy elevado en *G. centralis* al mes de edad y disminuyó significativamente en los meses posteriores. *G. griseoflavus* presentó muy pocos espermatocitos TUNEL (+) en las tres edades. Los híbridos exhibieron un aumento abrupto a los 2 meses con el 78% de espermatocitos TUNEL (+) comparado con los híbridos de 1 mes. Si bien a los 3 meses este valor disminuyó al 44%, ambos valores fueron elevados con respecto a los parentales de la misma edad.

La tinción de Fas mostró que alrededor del 15% de los espermatocitos en paquitene fueron positivos en los ratones *G. centralis* de un mes de edad, disminuyendo notablemente a los 2 y 3 meses. Los ratones *G. griseoflavus* presentaron valores casi indetectables de esta proteína en las diferentes edades. El porcentaje de espermatocitos en paquitene Fas (+) incrementó cinco veces en los híbridos a los 2 meses comparado con los híbridos de 1 mes de edad, mostrando esta positividad alrededor del 40% del total de los espermatocitos en paquitene por túbulo (Tabla 6, Fig. 11a, b). Esta expresión disminuyó a los 3 meses (Tabla 6, Fig. 11c), pero se mantuvo muy alta en relación con la de los híbridos de 1 mes y los parentales de 2 y 3 meses de edad. Se observó señal positiva para Fas en las células de Leydig de los testículos en los tres citotipos, pero no para los otros marcadores apoptóticos estudiados.

El análisis inmunohistoquímico de Bax reveló que el porcentaje de espermatocitos en paquitene Bax (+) por túbulo en ratones *G. centralis* fue alrededor del 9% al mes y disminuyó a los 2 y 3 meses de edad. Los ratones *G. griseoflavus* presentaron valores de Bax más bajos al mes en comparación con los de los ratones *G. centralis*, siendo indetectables en los meses posteriores. En los híbridos de 2 meses de edad, la expresión de Bax en los espermatocitos en paquitene aumentó cinco veces con respecto a la de los híbridos de 1 mes (Tabla 6, Fig. 11d, e), y si bien disminuyó la expresión a los 3 meses de edad, siguió siendo significativamente alta comparada con la de los parentales de la misma edad (Tabla 6, Fig. 11f).

El porcentaje de espermatocitos citocromo c (+) fue elevado en ratones *G. centralis* de 1 mes de edad y disminuyó significativamente a los 2 y 3 meses. En *G. griseoflavus* también la expresión de citocromo c disminuyó con el tiempo. Los híbridos de 1 mes presentaron un elevado porcentaje de espermatocitos citocromo c (+) al mes de edad (Tabla 6, Fig. 11g), aumentando casi al doble a los 2 meses (Tabla 6, Fig. 11h) y alcanzando el porcentaje inicial a los 3 meses de edad (Fig. 11i). En los híbridos, los valores a los 2 y 3 meses fueron significativamente altos en comparación con los de los parentales de la misma edad (Tabla 6). Como se observa en la Fig. 11 (c, f, i), el citocromo c fue redistribuido, ya que se observó intensa tinción tanto en el núcleo como en el citoplasma.

# Tabla 6. Frecuencia de espermatocitos en paquitene positivos para los

marcadores apoptóticos en diferentes citotipos de Graomys

Citotipo	Edad (m)	TUNEL	Fas	Bax	Citocromo c
<i>G. centralis G.griseoflavus</i> Híbridos	1	$\begin{array}{rrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrr$	$\begin{array}{rrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrr$	$\begin{array}{rrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrr$	$\begin{array}{rrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrr$
G. centralis G.griseoflavus Híbridos	2	$\begin{array}{rrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrr$	$\begin{array}{rrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrr$	$\begin{array}{rrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrr$	$\begin{array}{rrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrr$
<i>G. centralis G.griseoflavus</i> Híbridos	3	$\begin{array}{rrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrr$	$\begin{array}{rrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrr$	$\begin{array}{rrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrr$	$\begin{array}{rrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrr$

# Porcentaje de espermatocitos en paquitene (+) / sección testicular

Los datos son expresados como medias  $\pm$  ES. (m): meses. \* P< 0,001 *vs* animales de 2 y 3 meses con igual citotipo. <sup>†</sup> P< 0,001 *vs* híbridos de 1 y 3 meses. <sup>§</sup> P< 0,001 *vs* otros citotipos de la misma edad.



**Fig. 11.** Túbulos seminíferos de ratones híbridos mostrando tinción de Fas (a, b, c), Bax (d, e, f) y citocromo c (g, h, i). (a, d, g): animales de 1 mes; (b, e, h): animales de 2 meses; (c, f, i): animales de 3 meses. Las células positivas para los marcadores apoptóticos (color marrón) son espermatocitos en paquitene (flechas e insertos). La barra de magnificación equivale a 20 µm.

El análisis de Western blots de la proteína proapoptótica Fas (Fig. 12a) involucrada en la vía extrínseca reveló en los parentales una alta expresión al mes de edad, disminuyendo significativamente con el tiempo. El híbrido presentó una elevada expresión de Fas, independientemente de la edad, pero a los 2 y 3 meses la expresión de esta proteína fue significativamente más alta que la de los parentales de la misma edad (Fig. 12a).

En los Western blots de Fas-L se observaron dos bandas, una de 26kDa correspondiente a la fracción soluble (Fig. 12b), y otra de 40kDa correspondiente al Fas-L unido a membrana (Fig. 12c). En ratones *G. centralis* y *G. griseoflavus*, las expresiones de ambas formas de esta proteína

disminuyeron en forma significativa con el tiempo. Contrariamente, en los ratones híbridos la expresión de Fas-L soluble y Fas-L de membrana, incrementó con la edad, siendo significativamente más alta la expresión de dicha proteína a los 3 meses de edad en comparación con la de los híbridos más jóvenes. La expresión de Fas-L (ambas formas) a los 2 y 3 meses en el híbrido fue significativamente más alta que la de los parentales de la misma edad.

Como ocurrió con Fas y Fas-L, la expresión de Bax y citocromo c parece regulada en una manera dependiente de la edad en los testículos de *G. centralis* y *G. griseoflavus* (Fig. 13a y b). En cambio, el híbrido presentó una pérdida de dicha regulación, ya que las expresiones de Bax y citocromo c se mantuvieron elevadas en los tres tiempos estudiados. También a los 2 y 3 meses, las expresiones de Bax y citocromo c en los híbridos fueron más altas comparadas con la de los parentales de la misma edad. Esta alta expresión de Bax y citocromo c ocurrió simultáneamente con el incremento de la apoptosis revelado por la tinción de TUNEL en las células germinales, sugiriendo que la vía intrínseca podría estar involucrada en el mecanismo de muerte de las células germinales.

La expresión de la proenzima de caspasa-3 (procaspasa-3) (Fig. 14a) y la forma activa de la caspasa-3 (Fig. 14b) fue similar al mes de edad en los tres grupos experimentales. Las expresiones de estas proteínas disminuyeron marcadamente a los 2 meses en *G. centralis* y *G. griseoflavus*, manteniéndose bajas a los 3 meses de edad. En contraste, en el híbrido, la procaspasa-3 fue más alta a los 3 meses en comparación con la expresión en los híbridos más jóvenes, y la caspasa-3 activa se mantuvo elevada a todas las edades.



🗳 G. centralis 🗖 G. griseoflavus 📕 Híbrido

**Fig. 12.** Representación de Western blots (paneles superiores) y análisis densitométrico cuantitativo (gráficos) de Fas (a), Fas-L (soluble) (b) y Fas-L (membrana) (c). Los datos representan medias  $\pm$  ES (n=3), presentados como porcentaje de la expresión de la proteína GAPDH. DO: densidad óptica. Líneas: 1, 2, 3: 1 mes; 4, 5, 6: 2 meses; 7, 8, 9: 3 meses; 1, 4, 7: *G. centralis*; 2, 5, 8: *G. griseoflavus*; 3, 6, 9: híbridos. <sup>†</sup>P< 0,001 *vs G. centralis* 2 y 3 meses. <sup>‡</sup>P< 0,001 *vs G. griseoflavus* de 2 y 3 meses. <sup>#</sup>P< 0,001 *vs G. griseoflavus* de 3 meses. <sup>§</sup>P< 0,05 *vs* híbrido de 1 y 2 meses. <sup>\*</sup>P< 0,001 *vs G. centralis* y *G. griseoflavus* de la misma edad. <sup>§</sup>P< 0,001 *vs G. centralis* de la misma edad. <sup>§</sup>P< 0,05 *vs G. centralis* e híbrido de la misma edad.

4


🖪 G. centralis 🗖 G. griseoflavus 📕 Híbrido

**Fig. 13.** Representación de Western blots (paneles superiores) y análisis densitométrico cuantitativo (gráficos) de Bax (a) y citocromo c (b). Los datos representan medias  $\pm$  ES (n=3), presentados como porcentaje de la expresión de la proteína GAPDH. DO: densidad óptica. Líneas: 1, 2, 3: 1 mes; 4, 5, 6: 2 meses; 7, 8, 9: 3 meses; 1, 4, 7: *G. centralis*; 2, 5, 8: *G. griseoflavus*; 3, 6, 9: híbridos. <sup>†</sup>P< 0,001 *vs G. centralis* de 2 y 3 meses. <sup>‡</sup>P< 0,001 *vs G. griseoflavus* de 2 y 3 meses. <sup>#</sup>P< 0,001 *vs G. centralis* y *G. griseoflavus* de la misma edad.

b)



**Fig. 14.** Representación de Western blots (paneles superiores) y análisis densitométrico cuantitativo (gráficos) de procaspasa-3 (a) y caspasa-3 activa (b). Los datos representan medias  $\pm$  ES (n=3), presentados como porcentaje de la expresión de la proteína GAPDH. DO: densidad óptica. Líneas: 1, 2, 3: 1 mes; 4, 5, 6: 2 meses; 7, 8, 9: 3 meses; 1, 4, 7: *G. centralis*; 2, 5, 8: *G. griseoflavus*; 3, 6, 9: híbridos. <sup>†</sup>P< 0,001 *vs G. centralis* de 2 y 3 meses. <sup>‡</sup>P< 0,001 *vs G. griseoflavus* de 2 y 3 meses. <sup>§</sup>P< 0,05 *vs* híbrido de 1 y 2 meses. \*P< 0,001 *vs G. centralis* y *G. griseoflavus* de la misma edad.

En cuanto a la expresión de CB, la inmunohistoquímica reveló que la proteína se expresó principalmente en espermatocitos en paquitene en los tres grupos estudiados.

Los ratones *G. centralis* al mes de edad presentaron el 13,58%  $\pm$  0,63 de túbulos CB (+) por sección testicular y el 24,78%  $\pm$  4,76 de espermatocitos en paquitene CB (+) por túbulo, valores que disminuyeron abruptamente a los 2 y 3 meses. Se observaron niveles muy bajos de CB en *G. griseoflavus* a todas las edades (datos no mostrados).

En los híbridos, el porcentaje de túbulos seminíferos CB (+) por sección testicular incrementó cuatro veces a los 2 ó 3 meses comparados con los híbridos de 1 mes, llegando casi al 62% de espermatocitos en paquitene CB (+) a los 2 meses de edad (Tabla7, Fig.15b).

Sin embargo, en los híbridos la colocalización de CB con los marcadores apoptóticos (CB/TUNEL, CB/Fas, CB/Bax y CB/Cit c) en los espermatocitos en paquitene fue baja en los tres tiempos estudiados, indicando que CB localizó en células no apoptóticas (Tabla 8, Fig. 15a, b).



**Fig. 15.** Túbulos seminíferos con tinción de TUNEL (a) y calbindina  $D_{28k}$  (b) de híbridos de 2 meses de edad. La mayoría de las células TUNEL y CB positivas son espermatocitos en paquitene (flechas e insertos). El asterisco indica colocalización de CB y TUNEL de un espermatocito. La barra de magnificación equivale a 20 µm.

Tabla 7. Frecuencia de túbulos y espermatocitos en paquitene calbindina

Citotipo	Edad (m)	Porcentaje de túbulos seminíferos CB (+)/sección testicular	Porcentaje de espermatocitos en paquitene CB (+)/sección testicular	
Híbrido	1 2 3	$\begin{array}{rrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrr$	$\begin{array}{rrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrr$	

positivos en híbridos *Graomys* a diferentes edades

Los datos son expresados como medias  $\pm$  ES. (m): meses. \* P< 0,001 *v*s animales de 2 y 3 meses de edad. \*\* P< 0,05 *vs* animales de 1 y 3 meses de edad.

## Tabla 8. Colocalización de calbindina con los marcadores apoptóticos

Citotipo	Edad _ (m)	Porcentaje de espermatocitos en paquitene CB (+) / sección testicular mostrando colocalización				
		CB/TUNEL	CB/Fas	CB/Bax	CB/Cit c	
Híbrido	1 2 3	$\begin{array}{rrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrr$	$\begin{array}{rrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrr$	$\begin{array}{rrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrr$	$\begin{array}{rrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrr$	

estudiados en los híbridos Graomys a diferentes edades

Los datos son expresados como medias  $\pm$  ES. (m): meses. \*\* P< 0,05 vs animales de 1 y 3 meses de edad.

El Western blots de CB reveló dos bandas como vimos previamente en los ratones *Mus musculus domesticus*. La expresión de ambos, monómero y dímero de CB (28 y 56 kDa), fue más alta en los híbridos en relación con la de los parentales, especialmente a los 2 meses de edad (Fig. 16a, b). En los parentales, la expresión de esta proteína disminuyó con el tiempo.



**Fig. 16.** Representación de Western blots (paneles superiores) y análisis densitométrico cuantitativo (gráficos) de calbindina  $D_{56k}$  (a) y calbindina  $D_{28k}$  (b). Los datos representan medias  $\pm$  ES (n=3), presentados como porcentaje de la expresión de la proteína GAPDH. DO: densidad óptica. Líneas: 1, 2, 3: 1 mes; 4, 5, 6: 2 meses; 7, 8, 9: 3 meses; 1, 4, 7: *G. centralis*; 2, 5, 8: *G. griseoflavus*; 3, 6, 9: híbridos. <sup>†</sup>P< 0,001 *vs G. centralis* de 2 y 3 meses. <sup>#</sup>P< 0,001 *vs G. griseoflavus* de 3 meses. <sup>§</sup>P< 0,05 *vs G. centralis* e híbrido de la misma edad. \*P< 0,001 *vs G. centralis* y *G. griseoflavus* de la misma edad. \*\*\*P< 0,001 *vs G. griseoflavus* de la misma edad.



En este trabajo se comienza a dilucidar los mecanismos moleculares apoptóticos involucrados que subyacen al arresto de la espermatogénesis en dos modelos experimentales de ratones con rearreglos cromosómicos Robertsonianos.

Los ratones CD1, Milano II y los híbridos subfértiles de la especie Mus musculus domesticus, no presentan diferencias fenotípicas ni tampoco en el tamaño testicular. Sin embargo, los ratones híbridos subfértiles exhiben una intensa apoptosis de células germinales, la cual es acompañada por redistribución de Bax y citocromo c. La expresión de estas proteínas es similar en los testículos de los ratones CD1, Milano II e híbridos, indicando que la síntesis de esas dos moléculas pro-apoptóticas es aproximadamente igual en los testículos de los ratones híbridos en comparación con la de los parentales. No obstante, la redistribución de Bax puede ser responsable de la liberación de citocromo c desde la mitocondria al citoplasma, la cual, a través de varias etapas, finalmente puede promover la fragmentación del ADN. Se ha observado que Bax está involucrado en la liberación de citocromo c desde el espacio intermembrana de la mitocondria al citosol en la muerte de células germinales inducida por el calor (130) y en procesos relacionados a la primera onda de la espermatogénesis en rata (75). Además, la relocalización de las mitocondrias alrededor del núcleo en los espermatocitos de los ratones híbridos subfértiles es otra indicación de que estas organelas están involucradas en la apoptosis de las células germinales, de manera similar a lo que ocurre con la muerte de células germinales inducidas por hipertermia testicular (130).

Tomados en conjunto, todos estos resultados constituyen una demostración de que la vía apoptótica intrínseca o mitocondrial está involucrada en la muerte de las células germinales de testículos de ratones híbridos subfértiles, que presentan rearreglos en su cariotipo. Otros mecanismos apoptóticos no fueron explorados en estos ratones. En trabajos previos se ha demostrado que el sistema Fas/FasL está involucrado en la muerte de células espermatogénicas durante el desarrollo, la adultez y después de una exposición tóxica (82). Las calpaínas y el p53 también están involucrados en la muerte de células germinales masculinas (29, 94). Es por ello, que no podemos descartar que otra vía apoptótica esté participando en la muerte de las células germinales de testículos en ratones Rb.

La mayor fragmentación del ADN en los ratones subfértiles se observó en los túbulos seminíferos del estadio XII, principalmente en los espermatocitos en metafase. Eaker y col. (33) han observado incremento en la apoptosis en espermatocitos en metafase en otros ratones híbridos Robertsonianos (2n=36) que presentan cromosomas desalineados, lo cual sugiere que el mecanismo de control del huso mitótico identifica la meiosis aberrante. Además, la apoptosis de espermatocitos del estadio XII se encontró en testículos de ratones Mlh1<sup>-/-</sup> (34). En el presente trabajo se sugiere que en los espermatocitos en metafase del estadio XII podrían estar activados los mecanismos de control ("checkpoint") en respuesta a los defectos meióticos.

Para mantener la homeostasis testicular, moléculas pro y antiapoptóticas trabajan juntas, regulando el grado de apoptosis para producir un suministro de gametas de alta calidad (82). Como se ha mencionado previamente, la calidad de las gametas masculinas es deficiente en los ratones heterocigotos Rb, razón por la cual son subfértiles. Por lo tanto, algunos mecanismos antiapoptóticos en las células germinales deben ser activados para limitar la apoptosis. Entre las diversas moléculas antiapoptóticas, se ha sugerido que CB podría proteger diferentes tipos de células contra la muerte celular por apoptosis, tanto por las vías independientes ó dependientes de calcio.

En este trabajo se demuestra que CB se sobreexpresa en los testículos de los ratones híbridos Rb, con una mayor expresión en los espermatocitos en metafase. La sobreexpresión de CB ocurre en el estadio XII, al mismo tiempo en que la fragmentación del ADN es también máxima. Sin embargo, la colocalización de CB y TUNEL es muy limitada. El 66% de los espermatocitos en metafase mueren por apoptosis y el 40% de ellos exhiben alta expresión de CB, sin señales de apoptosis. Solamente el 3% de los espermatocitos en metafase mostraron simultáneamente apoptosis y expresión de CB. Estos datos sugieren que la sobreexpresión de CB puede proteger contra la apoptosis espermatogénica. La presencia concomitante de células CB o TUNEL positivas del estadio XII en la misma sección tubular, sugiere un mecanismo inmediato de supervivencia para prevenir la muerte celular, que rápidamente dispara la expresión de CB.

Hasta el momento, la acción de CB en el arresto de la apoptosis mitocondrial, antes o durante el proceso apoptótico, permanece aún desconocida. La colocalización de CB con moléculas involucradas en etapas tempranas de la apoptosis, tales como Bax y citocromo c, podría indicar que la expresión de CB no es suficiente para bloquear la apoptosis ya iniciada. Se ha encontrado que CB es capaz de inhibir directamente a caspasa-3 en células osteoblásticas MC3T3-E1, después de un tratamiento con el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (8). En líneas de células pancreáticas  $\beta$ , CB protege a dichas células contra la muerte inducida por citoquinas, "bufferiza" calcio, previene el daño mitocondrial e inhibe la generación de radicales libres de oxígeno (97).

La sobreexpresión de CB no sólo se produce en los espermatocitos en metafase, sino también en otras células germinales y en células de Sertoli. Es bien conocido que las células de Sertoli proporcionan un soporte estructural, crean una barrera inmunológica y nutren a las células a través de sus productos de secreción (137). Las interacciones entre las células germinales y las células de Sertoli durante la espermatogénesis han sido descritas, pero todavía no se han identificado las moléculas que regulan estas interacciones (109). Se requieren estudios adicionales para determinar si CB se expresa en las células de Sertoli actuando como molécula antiapoptótica de ella misma o se trata de una secreción de productos para proteger a las células germinales de la apoptosis.

Con el propósito de comparar estos mecanismos con otro modelo animal que también presenta rearreglos Rb, pero que exhibe un fenotipo infértil, se evaluaron tanto el arresto de la espermatogénesis como las vías moleculares apoptóticas en híbridos *Graomys*. El fenotipo del híbrido infértil *Graomys* es similar al de los parentales, pero el tamaño y el peso del testículo es significativamente menor, lo cual indica una alteración de su capacidad reproductiva. Los adultos híbridos tienen bajos niveles de testosterona, contribuyendo al deterioro de la espermatogénesis.

El análisis histológico del epitelio seminífero de los ratones híbridos muestra que el proceso espermatogénico está arrestado al estadio meiótico, con la presencia de sólo espermátides raras en muy pocos túbulos. La interrupción de la espermatogénesis es a nivel de la meiosis I, que conduce a la ausencia de espermatozoides maduros, es decir, que no se llega a la espermatogénesis completa en ningún caso, siendo la causa principal de la esterilidad en los ratones híbridos *Graomys*.

Por medio de la microscopía electrónica, se analizó con más detalle las estructuras y células deterioradas de los túbulos seminíferos de los híbridos infértiles. Se observaron abundantes espermatocitos con mitocondrias localizadas cerca del núcleo, membrana nuclear alterada, picnosis citoplasmática y condensaciones de la cromatina compatibles con características apoptóticas. Sólo se encontraron muy pocas espermátides anormales, lo cual confirma la ausencia de los espermatozoides. En cambio, las especies parentales revelaron un ciclo espermático completo con características morfológicas y ultraestructurales normales, presentando doce estadios germinales compatibles con los descritos para otras especies de ratones.

La masiva muerte de espermatocitos en paquitene detectada en los túbulos seminíferos de los híbridos se produce a través de apoptosis, según lo revela la alta expresión de la caspasa-3, molécula ejecutora que participa en ambas vías apoptóticas. De hecho, la expresión de las proteínas de ambas vías (ej.: Fas, Fas-L, Bax y citocromo c), se mantiene alta en los testículos de los ratones híbridos, mientras que en los parentales disminuye con el tiempo. Esta falta de regulación en las moléculas pro-apoptóticas en los híbridos se refleja por una elevada frecuencia de espermatocitos Fas, Bax y citocromo c positivos, como lo indica el análisis inmunohistoquímico, en las secciones testiculares a partir del segundo y tercer mes de edad.

Una moderada apoptosis de células germinales se detectó en los espermatocitos de los ratones G. centralis de un mes de edad, pero no en los ratones G. griseoflavus e híbridos. Sin embargo, los marcadores de apoptosis se expresan en los espermatocitos en paquitene en los tres citotipos. La apoptosis en los espermatocitos en paquitene se ha descripto como un proceso fisiológico durante la primera onda de la espermatogénesis (60, 75). La presencia insignificante de espermatocitos TUNEL (+) en los túbulos seminíferos de ratones G. griseoflavus e híbridos, podría deberse a una diferencia en la aparición de la primera onda de la espermatogénesis entre los citotipos. Los ratones G. centralis, de un mes de edad, ya presentan células post-meióticas en el epitelio de algunos túbulos seminíferos; en cambio, los ratones G. griseoflavus tienen principalmente espermatocitos en leptotene y los híbridos espermatocitos en paquitene tempranos. Además, en G. centralis se detectaron niveles más altos de testosterona en comparación con los de los otros dos citotipos al mes de edad. En edades posteriores, los niveles de testosterona son muy similares en ambos parentales, cuyo epitelio seminífero presenta todas las etapas de diferenciación de las células germinales masculinas, sin presenciar signos de muerte celular. Los marcadores de apoptosis en los parentales fueron regulados, ya que disminuyeron a los 2 meses de edad, y las frecuencias de las células germinales que expresan Fas,

Bax, citocromo c o la tinción de TUNEL, fueron extremadamente bajas, probablemente como reflejo de la apoptosis fisiológica que se produce en los testículos normales de los roedores adultos (56, 3, 63, 15, 10).

Por el contrario, la apoptosis sigue siendo relevante en el epitelio seminífero de los ratones híbridos de 2 y 3 meses de edad, en los cuales el 78% y el 44% de los espermatocitos en paquitene fueron positivos para la tinción de TUNEL, respectivamente. En estos animales, la espermatogénesis se interrumpe en la fase meiótica de paquitene, lo que dificulta determinar la etapa del ciclo del epitelio seminífero en la que se produce la muerte celular meiótica. La interrupción de la espermatogénesis en los híbridos Graomys es muy grave, con una enorme depleción de células germinales. Los marcadores apoptóticos de las vías extrínseca e intrínseca se encuentran altamente expresados en los híbridos de 2 y 3 meses de edad, como se demuestra por Western blots y por el elevado porcentaje de espermatocitos Fas, Bax y citocromo c positivos. Los híbridos adultos tienen bajos niveles de testosterona, aunque no se encontraron células de Leydig TUNEL (+). Los niveles bajos de la hormona podrían contribuir a los efectos perjudiciales observados en la espermatogénesis de los híbridos, ya que se ha demostrado que la testosterona es un factor importante en la supervivencia de las células germinales (120). La reducción de testosterona intratesticular en un modelo animal de rata resultó en el arresto de la espermiogénesis y en la apoptosis de las células germinales (88, 119, 64). Por el contrario, se ha demostrado que la testosterona es capaz de inhibir la apoptosis inducida in vitro en espermatocitos y espermátides de humanos (37). El mecanismo por el cual la falta de testosterona induce la muerte de las células germinales aún no se ha dilucidado completamente. En ratas que tenían niveles disminuidos de testosterona intratesticular, se encontró expresión alterada de moléculas antiapoptóticas como Bcl-xl y Bcl-2 (114). En este trabajo no se estudió la expresión de la proteína antiapoptótica Bcl-2, pero se detectó en los híbridos *Graomys* a los 2 y 3 meses de edad elevada expresión de Bax, un miembro de la familia de Bcl-2 que bloquea la capacidad de Bcl-2 para inhibir la apoptosis (91, 26). Por el contrario, en los ratones *G. centralis* y *G. griseoflavus* la expresión de Bax a los 2 y 3 meses es muy baja.

Las proteínas propoptóticas Fas y Fas-L están altamente expresadas en los híbridos adultos. Cuando estas moléculas se activan, se promueve la transformación y estabilización de la caspasa iniciadora 8 (110, 108, 53). La caspasa-8 activa puede activar proteolíticamente a las caspasas-3,6 ó 7 y conducir a la muerte celular debida a la degradación de muchas proteínas celulares (102). En ratones, ratas y humanos, el sistema Fas ha sido implicado como un regulador clave de la apoptosis de las células germinales en testículos en condiciones fisiológicas o injurias (72, 93, 66, 24, 75). En particular, Fas juega un rol central en la determinación de la apoptosis de espermatocitos en paquitene durante la primera onda de la espermatogénesis en la rata (75). Nosotros encontramos expresión de Fas en los ratones *G. centralis* y, en menor medida, en los espermatocitos de ratones híbridos de 1 mes de edad, lo que confirma que la vía extrínseca está involucrada en el inicio de la apoptosis.

Ambas vías, intrínseca y extrínseca, convergen en caspasa-3, que está altamente expresada en los testículos de los tres citotipos de ratones de 1 mes de edad y en los híbridos adultos, que presentan una elevada frecuencia de espermatocitos TUNEL (+). En este trabajo, se describe por primera vez la participación de ambas vías, intrínseca y extrínseca, de la apoptosis en testículos animales híbridos adultos derivados del cruzamiento de dos citotipos diferentes del género *Graomys* y no inducida por lesión de los testículos, ni efectos químicos o físicos.

La proteína antiapoptótica CB, se sobreexpresa en los espermatocitos en paquitene de los híbridos, lo que confirma que CB está presente en el mismo tipo de célula que se somete a la fragmentación del ADN. Sin embargo, no todos los espermatocitos en paquitene expresan CB, sólo un subgrupo de éstas células son CB (+). Resultados similares observamos en los ratones híbridos subfértiles Mus musculus domesticus, en los cuales, como se mencionó previamente, se expresa CB en espermatocitos en metafase, tipo celular en que la apoptosis es elevada. De esta manera, la sobreexpresión de CB no parece depender del tipo celular. Sin embargo, tanto en los híbridos Mus musculus domesticus como en los híbridos Graomys, la frecuencia de las células que muestran apoptosis y la expresión simultánea de CB es muy baja. En los híbridos Graomys, el 62% ó el 34% de las células fueron CB (+), mientras que solamente el 14% y el 6% manifestaron colocalización con TUNEL, a los 2 y 3 meses, respectivamente. Así, la expresión de CB y la de los marcadores apoptóticos parecen ser inversamente regulados. El mismo patrón de expresión ha sido observado por Lema Tomé y col. (73), en un modelo de apoptosis neuronal inducida en ratas. Estos autores describen inmunorreactividad para activar caspasa-3 en las capas IV/V, entre las áreas de alta expresión de CB o calrretinina. Sin embargo, queda por dilucidar si la

expresión de CB representa una respuesta a un mecanismo de vigilancia para el control de la muerte celular antes del inicio o durante el proceso apoptótico.

La sobreexpresión de CB en los testículos de los ratones híbridos *Graomys* sugiere que esta proteína actuaría como un mecanismo de defensa contra la apoptosis, sin embargo no logra prevenir totalmente la muerte celular desencadenada por las alteraciones cromosómicas.

Los ratones híbridos *Mus musculus domesticus* y *Graomys* representan modelos experimentales adecuados para el estudio de las alteraciones moleculares desencadenadas por las fusiones cromosómicas que causan infertilidad.



- La presencia de fusiones Robertsonianas en los híbridos alteraría la expresión de ciertos genes provocando arresto de la espermatogénesis e induciendo subfertilidad o infertilidad.
- La diferencia de fertilidad entre los ratones híbridos del género Graomys en comparación con la del género Mus es debida a que la apoptosis de las gametas se realiza en células con distinto grado de maduración. La infertilidad en el género Graomys es el resultado del arresto de la espermatogénesis que se produce por la apoptosis de espermatocitos en paquitene, sin llegar en ningún caso a la maduración completa de las gametas. En cambio, la subfertilidad en los ratones híbridos Mus musculus se genera por apoptosis de los espermatocitos en metafase del estadio XII, aunque algunas gametas llegan a la espermatogénesis completa.
- La vía apoptótica intrínseca está involucrada en la muerte de los espermatocitos en los ratones híbridos subfértiles e infértiles. En los ratones híbridos *Graomys* la vía apoptótica extrínseca también está involucrada en la muerte celular.
- El porcentaje de células apoptóticas por sección tubular en los híbridos subfértiles de 5 meses de edad es del 27% en contraste con el 78% y 44% en los híbridos infértiles, a los 2 y 3 meses, respectivamente.

- La relocalización de las mitocondrias alrededor del núcleo en los espermatocitos de los ratones híbridos de las dos especies es otra indicación que esas organelas están involucradas en la apoptosis de las células germinales.
- El fenotipo del híbrido Graomys es similar al de los parentales, pero el tamaño y el peso del testículo es significativamente menor, lo cual es indicador de una disminución de su capacidad reproductiva.
- Los adultos híbridos infértiles tienen bajos niveles de testosterona, con lo que se contribuye al deterioro de la espermatogénesis.
- La expresión de CB en testículos de ratones híbridos Robertsonianos es muy alta en comparación con la de los ratones parentales. La sobreexpresión de CB sugeriría que esta proteína actuaría como un mecanismo de defensa ante la intensa apoptosis pero que aparentemente no logra prevenir la muerte celular desencadenada por las alteraciones cromosómicas, en aquellas gametas que iniciaron la apoptosis.
- El papel protector de CB debería estudiarse en detalle, ya que podría constituirse en un futuro blanco terapéutico para impedir o morigerar la apoptosis testicular producida por diversos agentes químicos ó físicos.



- Adams JM y Cory S. 1998. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. Science. 281: 1322-1326.
- Adolph S y Klein J. 1981. Robertsonian variation in *Mus musculus* from Central Europe, Spain, and Scotland. J. Hered. 72: 219-221.
- **3.** Allan DJ, Harmon BV y Roberts SA. 1992. Spermatogonial apoptosis has three morphologically recognizable phases and shows no circadian rhythm during normal spermatogenesis in the rat. Cell Prolif. 25: 241-250.
- Baccetti B, Capitani S, Collodel G, Estenoz M, Gambera L y Piomboni P. 2002. Infertile spematozoa in a human carrier of Robertsonian translocation 14;22. Fertil. Steril. 78: 1127-1130.
- Baker RJ y Bickham JW. 1986. Speciation by monobrachial centric fusions. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 83: 8245-8248.
- Bauchau V. 1990. Phylogenetic analysis of the distribution of chromosomal races of *Mus musculus domesticus* Rutty in Europe. Biol. J. Linn. Soc. Lond. 41: 171-192.
- Bauchau V, Smest S, Viroux M-C, Nootens D y de Caritat AK. 1990. Robertsonian translocations in free-living populations of the house mouse in Belgium. Biol. J. Linn. Soc. Lond. 41: 193-201.
- Bellido T, Huening M, Raval-Pandya M, Manolagas SC y Christakos S. 2000. Calbindin-D28k is expressed in osteoblastic cells and suppresses their apoptosis by inhibiting caspase-3 activity. J. Biol. Chem. 275: 26328-26332.
- Ben-Aharon I, Brown PR, Etkovitz N, Eddy EM y Shalgi R. 2005. The expression of calpain 1 and calpain 2 in spermatogenic cells and spermatozoa of the mouse. Reproduction. 129: 435-442.

- 10.Blanco-Rodríguez J y Martinez-Garcia C. 1996. Spontaneous germ cell death in the testis of the adult rat takes the form of apoptosis: reevaluation of cell types that exhibit the ability to die during spermatogenesis. Cell Prolif. 29: 13-31.
- 11.Blasco MA, Lee H, Hande MP, Samper E, Lansdorp PM, DePinho RA y Greider CW. 1997. Telomere shortening and tumor formation by house cells lacking telomerase RNA. Cell. 91: 25-34.
- 12. Böhme G y Pier C. 1986. Ordnungskriterien für den zyklus des epithels der tubuli seminiferi, nach untersuchungen bein kater (*Felis catus*). Berl Münch Tierärztl Wschr. 99: 232-236.
- 13. Bonnet-Garnier A, Lacaze S, Beckers JF, Berland HM, Pinton A, Yerle M y Ducos A. 2008. Meiotic segregation analysis in cows carrying the t (1;29) Robertsonian translocation. Cytogenet. Genome Res. 120:91-96.
- **14.**Boursot P, Auffray JC, Britton-Davidian J y Bonhomme F. 1993. The evolution of house mice. Annu. Rev. Ecol. Syst. 24: 119-152.
- 15.Brinkworth MH, Weinbauer GF, Schlatt S y Nieschlag E. 1995. Identification of male germ cells undergoing apoptosis in adult rats. J. Reprod. Fertil. 105: 25-33.
- 16. Briton-Davidian J, Catalan J, Ramalhinho M, Ganem G, Auffray JC, Capela R, Biscoito M, Searle JB y Mathias ML. 2000. Environmental genetics: Rapid chromosomal evolution in island mice. Nature. 403: 158.
- **17.**Capanna E, Gropp A, Winking H, Noack G. y Civitelli M-V. 1976. Robertsonian metacentrics in the mouse. Chromosoma. 58: 341-353.
- **18.**Castiglia R y Capanna E. 1999. Contact zone between chromosomal races of *Mus musculus domesticus*. 1. Temporal analysis of a hybrid zone

between the CD chromosomal race (2n=22) and populations with the standard karyotipe. Heredity. 83: 319-326.

- **19.**Castiglia R y Capanna E. 1999. Whole-arm reciprocal translocation (WART) in a feral population of mice. Chromosome Res. 7: 493-495.
- 20. Castiglia R y Capanna E. 2000. Contact zone between chromosomal races of *Mus musculus domesticus*. 2. Fertility and segregation in laboratoryreared and wild mice heterozygous for multiple Robertsonian rearragements. Heredity. 85: 147-156.
- 21.Catanesi CI, Vidal-Rioja L, Crisci JV y Zambelli A. 2002. Phylogenetic relationships among Robertsonian karyomorpha of *Graomys griseoflavus* (Rodentia, Muridae) by mitochondrial cytochrome *b* DNA sequencing. Hereditas. 136: 130-136.
- 22. Cattanach BM y Moseley H. 1973. Nondisjunction and reduced fertility caused by the tobacco mouse metacentric chromosomes. Cytogenet. Cell Genet. 12: 264-287.
- **23.**Cattanach BM y Kirk M. 1985. Differential activity of maternally and paternally derived chromosome regions in mice. Nature. 315: 496-498.
- 24. Celik-Ozenci C, Sahin Z, Ustunel I, Akkoyunlu G, Erdogru T, Korgun ET, Baykara M y Demir R. 2006. The Fas system may have a role in male reproduction. Fertil. Steril. 85: 1168-1178.
- 25. Chandley AC, Edmond P, Christie S, Gowans L, Fketcher J, Frackiewicz A y Newton M. 1975. Cytogenetics and fertility in man. I. Karyotype and seminal analysis: results of a five-year survey of men attending a subfertility clinic. Ann. Hum. Genet. 39: 231-254.

- 26. Chittenden T, Harrington EA, O'Connor R, Flemington C, Lutz RJ, Evan GI y Guild BC. 1995. Induction of apoptosis by the Bcl-2 homologue Bak. Nature 374: 733-736.
- 27. Christakos S y Liu Y. 2004. Biological actions and mechanism of action of calbindin in the process of apoptosis. J. Steroid. Biochem. Mol. Biol. 89-90: 401-404.
- 28. Corti M, Ciabatti CM y Capanna E. 1990. Parapatric hybridation in the chromosomal speciation of the house mouse. Biol. J. Linn. Soc. Lond. 41: 203-214.
- 29. Coureuil M, Fouchet P, Prat M, Letallec B, Barroca V, Dos Santos C, Racine C y Allemand I. 2006. Caspase-independent death of meiotic and postmeiotic cells overexpressing p53: calpain involvement. Cell Death Differ. 13: 1927-1937.
- 30. Cui Y, Zhu H, Zhu Y, Guo X, Huo R, Wang X, Tong J, Qian L, Zhou Z, Jia Y, Lue YH, Hikim AS, Wang C, Swerdloff RS y Sha J. 2008. Proteomic analysis of testis biopsies in men treated with injectable testosterone undecanoate alone or in combination with oral levonorgestrel as potential male contraceptive. J. Proteome Res. 7: 3984-3993.
- 31.Douet-Guilbert N, Bris MJ, Amice V, Marchetti C, Delobel B, Amice J, Braekeleer MD y Morel F. 2008. Interchromosomal effect in sperm of males with translocations: report of 6 cases and review of the literature. Int. J. Androl. 28: 372-379.
- **32.** Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X. 2000. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eleminating IAP inhibition. Cell. 102: 33-42.

- **33.** Eaker S, Pyle A, Cobb J y Handel MA. 2001. Evidence for meiotic spindle checkpoint from analysis of spermatocytes from Robertsonian-chromosome heterozygous mice. J. Cell Sci. 114: 2953-2965.
- 34. Eaker S, Cobb J, Pyle A y Handel MA. 2002. Meiotic prophase abnormalities and metaphase cell death in MLH1-deficient mouse spermatocytes: insights into regulation of spermatogenic progress. Dev. Biol. 249: 85-95.
- **35.**Eguchi J, Koji T, Nomata K, Yoshii A, Shin M y Kanetake H. 2002. Fas-Fas ligand system as a possible mediator of spermatogenic cell apoptosis in human maturation-arrested testes. Hum. Cell. 15: 61-68.
- 36. Engels H, Eggermann T, Caliebe A, Jelska A, Schubert R, Schüler HM, Panasiuk B, Zaremba J, Latos-Bielenska A, Jakubowski L, Zerres KP, Schwanitz G y Midro AR. 2008. Genetic counseling in Robertsonian translocations der (13;14): frequencies of reproductive outcomes and infertility in 101 pedigrees. Am. J. Med. Genet. A. 146: 2611-2616.
- 37. Erkkilä K, Henriksen K, Hirvonen V, Rannikko S, Salo J, Parvinen M y Dunkel L. 1997. Testosterone regulates apoptosis in adult human seminiferous tubule in vitro. J. Clin. Endocrinol. Metab. 82: 2314-2321.
- **38.**Evan G y Littlewood T. 1998. A matter of life and cell death. Science. 281: 1317-1322.
- **39.**Evans EP, Lyon MF y Daglish M. 1967. A mouse translocation giving a metacentric marker chromosome. Cytogenetics. 6: 105-119.
- **40.** Everett CA, Searle JB y Wallace BM. 1996. A study of meiotic pairing, nondisjunction and germ cell death in laboratory mice carrying Robertsonian translocations. Genet. Res. 67: 239-247.

- **41.**Ford CE y Hamerton JL. 1956. A colchicine, hypotonic citrate, squash sequence for mammalian chromosomes. Stain Technol. 31: 247-251.
- 42. Francavilla S, D'Abrizio P, Rucci N, Silvano G, Properzi G, Straface E, Cordeschi G, Necozione S, Gnessi L, Arizzi M y Ulisse S. 2000. Fas and Fas ligand expression in fetal and adult human testis with normal or deranged spermatogenesis. J. Clin. Endocrinol. Metab. 85: 2692-2700.
- 43. Francavilla S, D'Abrizio P, Cordeschi G, Pelliccione F, Necozione S, Ulisse S, Properzi G y Francavilla F. 2002. Fas expression correlates with human germ cell degeneration in meiotic and post-meiotic arrest of spermatogenesis. Mol. Hum. Reprod. 8: 213-20.
- 44. Garagna S, Broccoli D, Redi CA, Searle JB, Cooke HJ y Capanna E. 1995. Robertsonian metacentrics of the house mouse lose telomeric sequences but retain some minor satellite DNA in the pericentromeric area. Chromosoma. 103: 685-692.
- 45.Garagna S, Marziliano N, Zuccotti M, Searle JB, Capanna E y Redi CA. 2001. Pericentromeric organization at the fusion point of mouse Robertsonian translocation chromosomes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 98: 171-175.
- **46.**Gornall AG, Bardawill CJ y David MM. 1949. Determination of serum proteins by means of the Biuret reaction. J. Biol. Chem. 177: 751-766.
- 47.Gropp A, Tettenborn U y Lehmann EV. 1969. Chromosome nuntersuchungen bei der Tabackmaus (*M. poschiavinus*) und bei Tabakmaus-Hybriden. Experientia. 25: 875-876.
- **48.** Gropp A, Winking H, Zech L y Müller H. 1972. Robertsonian chromosomal variation and identification of metacentric chromosomes in feral mice. Chromosoma. 39: 265-288.

- **49.**Gropp A y Kolbus U. 1974. Exencephaly in the syndrome of trisomy no.12 of the foetal mouse. Nature. 249: 145-147.
- 50.Gropp A y Winking H. 1981. Robertsonian translocations: cytology, meiosis, segregation pattern and biological consequences of heterozygosity. En Berry, R. J. (ed.): Biology of the House Mouse. Academic Press, London. Pp. 141-181.
- **51.**Gündüz I, Tez C y Searle JB. 2000. House mice with metacentric chromosomes in the Middle East. Hereditas. 133: 175-177.
- 52. Hauffe HC y Searle JB. 1993. Extreme karyotypic variation in a *Mus musculus domesticus* hybrid zone: The Tobacco Mouse story revisited. Evolution. 45: 1374-1395.
- 53. Henkler F, Behrle E, Dennehy KM, Wicovsky A, Peters N, Warnke C, Pfizenmaier K y Wajant H. 2005. The extracellular domains of FasL and Fas are sufficient for the formation of supramolecular FasL-Fas clusters of high stability. J. Cell Biol. 168: 1087-1098.
- **54.**Herbst EW, Pluznik DH, Gropp A y Uthgennant H. 1981. Trisomic hemopoietic stem cells of fetal origin restore hemopoiesis in lethally irradiated mice. Science. 211: 1175-1177.
- **55.**Honda H, Miharu N, Samura O, He H y Ohama K. 2000. Meiotic segregation analysis of a 14:21 Robertsonian translocation carrier by fluorescence in situ hybridation. Hum. Genet. 106: 188-193.
- **56.** Huckins C. 1978. The morphology and kinetics of spermatogonial degeneration in normal adult rats: an analysis using a simplified classification of the germinal epithelium. Anat. Rec. 190: 905-926.
- **57.**Ibach B, Weissbach L y Hilscher B. 1976. Stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the dog. Andrologia. 8: 297-307.

- **58.** Inpanbutr N y Taylor AN. 1992. Expression of calbindin-D28k in developing and growing chick testes. Histochemistry. 97: 335-339.
- **59.** Inpanbutr N, Reiswig JD, Bacon WL, Slemons RD y Iacopino AM. 1996. Effect of vitamin D on testicular CaBP28K expression and serum testosterone in chickens. Biol. Reprod. 54: 242-248.
- 60. Jahnukainen K, Crysis D, Hou M, Parvinen M, Eksborg S y Soder O. 2004. Increased apoptosis occurring during the first wave of spermatogenesis is stage-specific and primarily affects midpachytene spermatocytes in the rat testis. Biol. Reprod. 70: 290-296.
- **61.** Johnson L, Hardy VB y Martin MT. 1990. Staging equine seminiferous tubules by nomarski optics in unstained histologic sections and in tubules mounted in toto to reveal the spermatogenic wave. Anat. Rec. 227: 67-174.
- 62. Kagi U, Chafouleas JG, Norman AW y Heizmann CW. 1988. Developmental appearance of the Ca<sup>2+</sup>-binding proteins parvalbumin, calbindin D-28K, S-100 proteins and calmodulin during testicular development in the rat. Cell Tissue Res. 252: 359-365.
- 63. Kerr JB. 1992. Spontaneous degeneration of germ cells in normal rat testis: assessment of cell types and frequency during the spermatogenic cycle. J. Reprod. Fertil. 95: 825-830.
- **64.** Kim JM, Ghosh SR, Weil AC y Zirkin BR. 2001. Caspase-3 and caspaseactivated deoxyribonuclease are associated with testicular germ cell apoptosis resulting from reduced intratesticular testosterone. Endocrinology 142: 3809-3816.
- **65.**King M. 1995. Chromosomal speciation. En King, M. (ed.): Species Evolution, the role of chromosome change. Cambridge University Press, Cambridge. Pp. 208-244.

- **66.** Koji T, Hishikawa Y, Ando H, NakanishiY y Kobayashi N. 2001. Expression of Fas and Fas ligand in normal and ischemia-reperfusion testes: involvement of the Fas system in the induction of germ cell apoptosis in the damaged mouse testis. Biol. Reprod. 64: 946-954.
- **67.**Komatsu T, Yamamoto Y, Tsubota T, Atoji Y y Suzuki Y. 1996. Spermatogenic cycle in the testis of the Japanese black bear (*Selenarctos thibetanus japonicus*). J. Vet. Med. Sci. 58: 329-335.
- **68.**Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227: 680-685.
- **69.**Lanzone C, Novillo A, Suarez NS, y Ojeda RA. 2007. Cytogenetics and redescription of *Graomys* (Rodentia, Sigmodontinae) from Chumbicha, Catamarca, Argentina. Mastozoologia Neotropical. 14: 249-255.
- 70.Larson A, Prager EM y Wilson AC. 1984. Chromosomal evolution, speciation and morphological change in vertebrates: The role of social behaviour. En: Bennett MD y Gropp A (ed.) Chromosomes Today. 8: 215-228.
- **71.**Leblond CP y Clermont Y. 1952. Definition of stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. Ann. N. Y. Acad. Sci. 55: 548-573.
- 72. Lee J, Richburg JH, Younkin SC y Boekelheide K. 1997. The Fas system is a key regulator of germ cell apoptosis in the testis. Endocrinology. 138: 2081-2088.
- 73. Lema Tomé CM, Bauer C, Nottingham C, Smith C, Blackstone K, Brown L, Hlavaty C, Nelson C, Daker R, Sola R, Miller R, Bryan R y Turner CP. 2006. Mk801-induced caspase-3 in the postnatal brain: inverse relationship with calcium binding proteins. Neuroscience. 141: 1351-1363.

- **74.**Léonard, A y Deknudt G. 1967. A new marker for chromosome studies in the mouse. Nature. 214: 504-505.
- **75.**Lizama C, Alfaro I, Reyes JC y Moreno RD. 2007. Up-regulation of CD95 (Apo-1/Fas) is associated with spermatocyte apoptosis during the first round of spermatogenesis in the rat. Apoptosis. 12: 449-512.
- 76.Luu KC, Nie GY, Hampton A, Fu GQ, Liu YX y Salamonsen LA. 2004. Endometrial expression of calbindin (CaBP)-d28k but not CaBP-d9k in primates implies evolutionary changes and functional redundancy of calbindins at implantation. Reproduction. 128: 433-441.
- **77.**Mahadevaiah SK, Setterfield LA y Mittwoch U. 1990. Pachytene pairing and sperm counts in mice with single Robertsonian translocations and monobranchial compounds. Cytogenet. Cell Genet. 53: 26-31.
- **78.** Mattson MP, Rychlik B, Chu C y Christakos S. 1991. Evidence for calciumreducing and excito-protective roles for the calcium-binding protein calbindin-D28k in cultured hippocampal neurons. Neuron. 6: 41-51.
- **79.** Merico V, Pigozzi MI, Esposito A, Merani MS y Garagna S. 2003. Meiotic recombination and spermatogenic impairment in *Mus musculus domesticus* carrying multiple simple Robertsonian translocations. Cytogenet. Genome Res. 103: 321-329.
- 80. Meyne J, Baker RJ, Hobart HH, Hsu TC, Ryder OA, Ward OG, Wiley JE, Wurster-Hill DH, Yates TL y Moyzis RK. 1990. Distribution of nontelomeric sites of (TTAGGG)n telomeric sequences in vertebrate chromosomes. Chromosoma. 99: 3-10.
- 81.Miller OJ, Miller DA, Kouri, RE, Allderdice, PW, Dev VG, Grewall, MS y Hutton JJ. 1971. Identification of the mouse karyotype by quinacrine fluorecence, and tentative assignment of seven linkage groups. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 68: 1530-1533.

- 82.Mishra DP, Pal R y Shaha C. 2006. Changes in cytosolic Ca<sup>2+</sup> levels regulate Bcl2-xS and Bcl2-xL expression in spermatogenetic cells during apoptotic death. J. Biol. Chem. 281: 2133-2143.
- 83. Mizuno K, Hayashi Y, Kojima Y, Nakane A, Tozawa K y Kohri K. 2009. Activation of NF-kappa B associated with germ cell apoptosis in testes of experimentally inducer cryptorchid rat model. Urology. 73: 389-393.
- 84. Musser GG y Carleton MD. 2005. Superfamily Muroidea. En: Mammal species of the world. A taxonomic and geographic reference. (Eds Wilson DE y Reeder DM) eds 2 (Washington DC and London: Smithsonian Institution Press). Pp. 687-752.
- **85.**Nachman MW, Boyer SN, Searle JB y Aquadro CF. 1994. Mitochondrial DNA variation and the evolution of Robertsonian chromosomal races of house mice, *Mus domesticus*. Genetics. 136: 1105-1120.
- **86.**Nachman MW y Searle JB. 1995. Why is the house mouse karyotype so variable?. Trends Ecol. Evol. 10: 397-402.
- 87.Nanda I, Schneider-Rasp S, Winking H y Schmid M. 1995. Loss of telomeric sites in the chromosomes of *Mus musculus domesticus* (Rodentia: Muridae) during Robertsonian rearrangements. Chromosoma Res. 3: 399-409.
- 88. O'Donnell L, McLachlan RI, Wreford NG, de Kretser DM y Robertson DM.
  1996. Testosterone withdrawal promotes stage-specific detachment of round spermatids from the rat seminiferous epithelium. Biol. Reprod. 55: 895-901.
- **89.**Oakberg EF. 1956. A description of spermiogenesis in the mouse and its use in analysis of the cycle of the seminiferous epithelium and germ cell renewal. Am. J. Anat. 99: 391-409.

- 90. Ogur G, Van Assche E, Vegetti W, Verheyen G, Tournaye H, Bonduelle M, Van Steirteghem A y Liebaers I. 2006. Chromosomal segregation in spermatozoa of 14 Robertsonian translocation carriers. Mol. Hum. Reprod. 12: 209-215.
- 91.Oltval ZN, Milliman CL y Korsmeyer SJ. 1993. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. Cell. 74: 609-619.
- 92. Pearson OP y Patton JL. 1976. Relationships among South American phyllotine rodents based on chromosome analysis. J. Mammal. 57: 339-350.
- **93.**Pentikäinen V, Erkkilä K y Dunkel L. 1999. Fas regulates germ cell apoptosis in the human testis in vitro. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 276: 310-316.
- 94. Petre-Lazar B, Livera G, Moreno SG, Trautmann E, Duquenne C, Hanoux V, Habert R y Coffigny H. 2007. The role of p63 in germ cell apoptosis in the developing testis. J. Cell Physiol. 210: 87-98.
- **95.**Poirot C y Cherruau B. 2005. Infertilidad masculina aspectos clínicos e investigaciones biológicas. Acta Bioquím. Clin. Lationoam. 39: 225-241.
- 96. Prendergast M, Harria B, Mayer S, Holley R, Hauser K y Littleton J. 2001. Chronic nicotine exposure reduces N-methyl-D-aspartate receptormediated damage in the hippocampus without altering calcium accumulation or extrusion: evidence of calbindin-D 28K overexpression. Neuroscience. 102: 75-85.
- 97. Rabinovitch A, Suarez-Pinzon WL, Sooy K, Strynadka K y Christakos S. 2001. Expression of calbindin-D<sub>28k</sub> in a pancreatic islet beta-cell line protects against cytokine-induced apoptosis and necrosis. Endocrinology. 142: 3649-3655.

- **98.**Rasmusen CD y Means AR. 1990. Effects of changes in calmodulin levels on cell proliferation. Environ. Health Perpect. 84:31-34.
- **99.**Redi CA, Garagna S, Hilscher B y Winking H. 1985. The effects of some Robertsonian chromosome combinations on the seminiferous epithelium of the mouse. J. Embryol. Exp. Morphol. 85: 1-19.
- 100. Redi CA y Capanna E. 1988. Robertsonian heterozygotes in the house mouse and the fate of their germ cells. En Daniel, A. (ed.). The Cytogenetics of Mammalian Autosomal Rearrangements. Alan R. Liss, New York. Pp. 315-359.
- **101.** Reed JC. 2000. Mechanisms of apoptosis. Am. J. Pathol. 157: 1415-1430.
- **102.** Riedl SJ y Shi Y. 2004. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 5: 897-907.
- **103.** Robertson WRB. 1916. Chromosome studies. I. Taxonomic relationships shown in the chromosomes, of Tettigidae and Acrididae: V-shaped chromosomes and their significance in Acrididae, Locustidae, and Gryllidae; chromosomes and variation. J. Morphol. 27: 179-331.
- 104. Rosi MI. 1983. Notas sobre la ecología, distribución y sistemática de Graomys griseoflavus (Waterhouse, 1837) (Rodentia, Cricetidae) en la provincia de Mendoza. Historia Natural. 3: 161-167.
- 105. Russell LD, Ettlin RA, Sinha-Hikim, AP y Clegg ED. 1990. The classification and timing of spermatogenesis. En: Russell LD, Ettlin RA, Sinha-Hikim, AP y Clegg ED (ed.). Histological and histopathological evaluation of the testis. Cache River Press, Clearwater, Florida. Pp. 41-58.
- **106.** Sage RD, Atchley WR y Capanna E. 1993. House mice as models in systematic biology. Syst. Biol. 42: 523-561.

- **107.** Saïd K y Britton-Davidian J. 1991. Genetic differentiation and habitat partition of Robertsonian house mouse populations (*Mus musculus domesticus*) of Tunisia. J. Evol. Biol. 4: 409-427.
- **108.** Sánchez-Gómez MV, Alberdi E, Ibarretxe G, Torre I y Matute C. 2003. Caspase-dependent and caspase-independent oligodendrocyte death mediated by AMPA and kainate receptors. J. Neurosci. 23: 9519-9528.
- **109.** Saunders PTK. 2003. Germ cell–somatic cell interactions during spermatogenesis. Reproduction. 61: 91-101.
- 110. Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A, Friesen C, Li F, Tomaselli KJ, Debatin KM, Krammer PH y Peter ME. 1998. Two CD95 (APO-1/Fas) signalling pathways. EMBO J. 17: 1675-1687.
- 111. Searle JB. 1991. A hybrid zone comprising staggered chromosomal clines in the house mouse (*Mus musculus domesticus*). Proc. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci. 246: 47-52.
- 112. Searle JB. 1993. Chromosomal hybrid zones in eutherian mammals. En Harrison, R. G. (ed.): Hybrid zones and the evolutionary process. Oxford University Press, Oxford. Pp. 305-353.
- **113.** Searle JB, Navarro YN y Ganem G. 1993. Further studies of a staggered hybrid zone in *Mus musculus domesticus* (the house mouse). Heredity. 71: 523-531.
- **114.** Show MD, Folmer JS, Anway MD y Zirkin BR. 2004. Testicular expression and distribution of the rat bcl2 modifying factor in response to reduced intratesticular testosterone. Biol. Reprod. 70: 1153-1161.
- **115.** Sinha Hikim AP y Swerdloff RS. 1993. Temporal and stage-specific changes in spermatogenesis of rat after gonadotropin deprivation by a

potent gonadotropin-releasing hormone antagonist treatment. Endocrinology. 133: 2161-2170.

- 116. Sinha Hikim AP, Lue Y, Diaz-Romero M, Yen PH, Wang C y Swerdloff RS. 2003. Deciphering the pathways of germ cell apoptosis in the testis. J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 85: 175-182.
- 117. Slaughter GR y Means AR. 1989. Analysis of expression of multiple genes encoding calmodulin during spermatogenesis. Mol. Endocrinol. 3:1569-1578.
- **118.** Slijepcevic P. 1998. Telomeres and mechanisms of Robertsonian fusion. Chromosoma. 107: 136-140.
- 119. Sofikitis N, Ono K, Yamamoto Y, Papadopoulos H y Miyagawa I. 1999. Influence of the male reproductive tract on the reproductive potential of round spermatids abnormally released from the seminiferous epithelium. Hum. Reprod. 14: 1998-2006.
- 120. Sofikitis N, Giotitsas N, Tsounapi P, Baltoqiannis D, Giannakis D y Pardalidis N. 2008. Hormonal regulation of spermatogenesis and spermiogenesis. J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 109: 323-330.
- 121. Spirito F, Modesti A, Perticone P, Cristaldi M, Federici R y Rizzoni M. 1980. Mechanisms of fixation and accumulation of centric fusions in natural populations of *Mus musculus* L. I. Karyological analysis of a hybrid zone between two populations in the central Apennines. Evolution. 34: 453-466.
- **122.** Swierstra EE y Foote RH. 1963. Cytology and kinetics of spermatogenesis in the rabbit. J. Reprod. Fertil. 5: 309-322.
- **123.** Theiler GR y Blanco A. 1996. Patterns of evolution in *Graomys griseoflavus* (Rodentia, Muridae): II. Reproductive isolation between cytotypes. J. Mammal. 77: 776-784.

- 124. Theiler GR y Blanco A. 1996. Patterns of evolution in *Graomys griseoflavus* (Rodentia, Muridae): III. Olfactory discrimination as a premating isolation mechanism between cytotypes. J. Exp. Zool. 274: 246-250.
- 125. Theiler GR, Gardenal CN y Blanco A. 1999. Patterns of evolution in *Graomys griseoflavus* (Rodentia, Muridae). IV. A case of rapid speciation. J. Evol. Biol. 12: 970-979.
- 126. Theiler GR, Ponce RH, Fretes RE y Blanco A. 1999. Reproductive barriers between the 2n=42 and 2=36-38 cytotype of *Graomys* (Rodentia, Muridae). Mastozoologia Neotropical. 6: 129-133.
- **127.** Tiranti SI. 1998. Cytogenetics of *Graomys griseoflavus* (Rodentia: Sigmodontinae) in central Argentina. Z. Saugetierd. 63: 32-36.
- 128. Toury R, Belqasmi F, Hauchecorne M, Leguellec D, Heizman CW y Balmain N. 1995. Localization of the Ca<sup>2+</sup>-binding α-parvalbumin and its mRNA in epiphyseal plate cartilage and bone of growing rats. Bone.17:121-130.
- **129.** Towbin H, Staehelin T y Gordon J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 76: 4350-4354.
- 130. Vera Y, Diaz-Romero M, Rodriguez S, Lue Y, Wang C, Swerdloff R y Sinha Hikim AP. 2004. Mitochondria-dependent pathway is involved in heat induced male germ cell death: lessons from mutant mice. Biol. Reprod. 70: 1534-1540.
- 131. Verhagen AM, Ekert PG, Pakusch M, Silke J, Connolly LM, Reid GE, Moritz RL, Simpson RJ y Vax DL. 2000. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. Cell. 102: 43-53.
- 132. Wallace BM, Searle JB y Everett CA. 2002. The effect of multiple simple Robertsonian heterozygosity on chromosome pairing and fertility of wildstock house mice (*Mus musculus domesticus*). Cytogenet. Genome Res. 96: 276-286.
- **133.** Watanabe N, Vande-Woude GF, Ikawa Y y Sagata N. 1989. Specific proteolysis of the c-mos proto-oncogene product by calpain on fertilization of *Xenopus* eggs. Nature. 342: 505-511.
- 134. Wernyj RP, Mattsonn MP y Christakos S. 1999. Expression of calbindin-D28K in C6 glial cells stabilizes intracellular calcium levels and protects against apoptosis induced by calcium ionophore and amyloid beta-peptide. Brain Res. Mol. Brain Res. 64: 69-79.
- **135.** Winking H, Reuter C y Bostelmann H. 2000. Unequal nondisjunction frequencies of trivalent chromosomes in male mice heterozygous for two Robertsonian translocations. Cytogenet. Cell Genet. 91: 303-306.
- 136. Yamamoto CM, Hikim AP, Lue Y, Portugal AM, Guo TB, Hsu SY, Salameh WA, Wang C, Hsueh AJ y Swerdloff RS. 2001. Impairment of spermatogenesis in transgenic mice with selective overexpression of Bcl-2 in the somatic cells of the testis. J. Androl. 22: 981-991.
- 137. Yuan W, Leisner TM, McFadden AW, Clark S, Hiller S, Maeda N, O'Brien DA y Parise LV. 2006. CIB1 is essential for mouse spermatogenesis. Mol. Cell. Biol. 26: 8507-8514.
- **138.** Zakian VA. 1997. Life and cancer without telomerase. Cell. 91:1-3.
- 139. Zambelli A, Vidal-Rioja L y Wainberg R. 1994. Cytogenetic analysis of autosomal polymorphism in *Graomys griseoflavus* (Rodentia, Cricetidae).
  Z. Saugetierd. 59: 14-20.

- 140. Zamzami N, Brenner C, Marzo I, Susin SA y Kroemer G. 1998.Subcellular and submitochondrial mode of action of Bcl-2-like oncoproteins. Oncogene. 16: 2265-2282.
- **141.** Zima J y Macholán M. 1989. Robertsonian fusion 5.12 in a population of *Mus musculus musculus*. Folia Zool. 38: 233-238.
- 142. Zimmermann KC y Green DR. 2001. How cells die: apoptosis pathways.J. Allergy Clin. Immunol. 108: 99-103.