

Tesis Doctoral

**Distribución de las proteínas acrosómicas GCNF y sp56
en ratones infértiles *Gopc*^{-/-} y en un modelo de
globozoospermia inducida mediante bloqueo de GOPC**

Maidar Bizkarguenaga Uribiarte

Dirección

Dra. Edurne Alonso Arana

Dr. Francisco José Sáez Crespo

Departamento de Biología Celular e Histología

Facultad de Medicina y Enfermería

Universidad del País Vasco/ Euskal Herriko Unibertsitatea

Leioa, 2018

Después de cuatro años, ya puedo decir ¡está terminada!

Cuando comencé esta etapa de mi vida me lo tomé como un reto personal, tengo que confesar que no sabía si podía realizarlo. He tenido momentos con altibajos emocionales, tras los cuales quería dejarlo. Pero me daba cuenta que entrar a un laboratorio y conocer sus entresijos es lo que he querido hacer desde que escogí la rama científica en Bachiller.

En este laboratorio he tenido oportunidad de conocer la profesión de investigación y aprender muchísimo sobre el funcionamiento de este mundo paralelo. Pero especialmente, conocer a las personas que me han acompañado durante este viaje me ha ayudado a madurar personalmente, lo que me valdrá para afrontar mi futuro profesional con una perspectiva más completa. Así que, puedo decir convencida que ha merecido la pena recorrer este camino.

En primer lugar, quiero agradecer a Francisco la oportunidad que me dio de incorporarme a su grupo de investigación hace seis años. Gracias por permitirme conocer el mundo de la investigación biomédica, adquirir experiencia dentro de un laboratorio y así comenzar mi andadura en este área.

A mi extraordinaria directora Edurne. Me faltarían páginas en este libro para describir lo excelente persona e increíble investigadora que eres. Gracias por tu confianza en mi trabajo y en mis decisiones, por tu apoyo y tu ayuda en los momentos difíciles, y por ser tan paciente conmigo. Después de estos cuatro años trabajando juntas, y compartiendo buenos momentos durante los congresos, te considero una buena amiga. Benetan eskertzen dizut.

A las técnicas del departamento de Biología Celular e Histología, Txus y Cristina, así como a nuestra secretaria M^a Jose. Gracias por vuestra eficacia y amabilidad a la hora de resolver todas mis consultas y peticiones.

A los trabajadores del Servicio General de Investigación (SGIker) de la UPV/EHU en la Unidad de Biomedicina y Biotecnología. En primer lugar, a los encargados del Servicio de Microscopía Analítica y de Alta Resolución en Biomedicina, Ricardo y Alex, por su ayuda, atención y paciencia durante el uso de los microscopios, especialmente el Microscopio Electrónico de Transmisión. Igualmente, a Arantza Alejo, del Animalario del Campus de Bizkaia,

por su asistencia, amabilidad y disponibilidad en los momentos de utilizar los servicios e instalaciones del animalario. También gracias al Profesor Tetsuo Noda del RIKEN BioResource Center (RIKEN BRC) por facilitarnos las muestras de los animales $Gopc^{-/-}$.

A mis compañeros de batalla, a los antiguos y a los que han ido llegando, tanto del departamento de Biología Celular e Histología como del departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina y Enfermería: María, Patri, Yero, Irene, Miguel, Iraia, Itziar, Marta, Aitor, Aldara, Andrea, Arantza, Carlos, Cris, Maddalen, Igor, Jon, Patri, Yero, Noelia y Xandra. Agradeceros, en primer lugar, toda la ayuda técnica y metodológica durante estos cuatro años. Gracias también por las terapias grupales durante la hora de la comida, las mini conversaciones entre incubaciones y los grandes momentos fuera del laboratorio. Imposible olvidar los *Coffee breaks!* Gracias chicas por esos momentos de desconexión y locura, sin los cuales hubiese sido imposible llegar al final del día.

A la Familia de Biología, ¡cómo olvidarme! Agradeceros todo vuestro apoyo y comprensión, ya sea por teléfono o tomando un café, en los muchos y variados momentos de desahogo, porque ¡parece que no se hablar de otra cosa! Aunque no nos veamos tanto como nos gustaría, sé que puedo contar con vosotr@s. Sois los mejores.

A mis padres. Siempre me habéis respaldado en todas mis decisiones y ayudado a conseguir los objetivos que quería. Durante esta etapa, me habéis escuchado en los buenos momentos, apoyado en los malos y animado cuando más lo necesitaba. Vuestro apoyo significa todo para mí, gracias por estar siempre ahí. Esto va por vosotros.

RESUMEN

La infertilidad es un importante problema médico cuyo estudio es de gran interés científico y social. La infertilidad masculina se debe a una espermatogénesis defectuosa, causada por uno o varios fallos durante la biogénesis del espermatozoide.

La espermatogénesis puede dividirse en tres fases: proliferación, meiosis y diferenciación o espermiogénesis. Durante la última fase, las espermátidas redondas se transforman en espermátidas alargadas mediante varias modificaciones estructurales: la biogénesis del acrosoma, la compactación nuclear, la formación del flagelo, la reorganización mitocondrial y la eliminación de casi todo el citoplasma. La elongación celular se produce por la acción del complejo acrosoma-acroplaxoma-manchette, estructuras únicas de las células germinales masculinas.

En este trabajo se han analizado la distribución y expresión de dos proteínas acrosómicas, GCNF y sp56, en un modelo murino infértil globozoospermico *Gopc*^{-/-}. La delección de *Gopc* causa fallos durante la espermiogénesis, como la incorrecta biogénesis del acrosoma, núcleos redondos, desorganización del acroplaxoma y *manchette* e incluso morfología espiral de los flagelos, lo que caracteriza a sus individuos machos adultos cuyos espermatozoides presentan cabezas con forma globular.

Se ha observado que la proteína GCNF, factor de transcripción que reprime la expresión de los genes *Oct4*, *Protamina 1* y *Protamina 2*, se localiza en el núcleo, acrosoma y *manchette* de las células germinales, por lo que su transporte entre estas tres estructuras parece estar conectado. Por su parte, se ha caracterizado la proteína acrosómica sp56 tanto en el acrosoma como en el citoplasma de todas las células haploides. Su localización en el citoplasma parece indicar que su transporte hacia el acrosoma se produce, además de en vesículas desde el aparato de Golgi, también desde otra vía de transporte intracelular de vesículas. Las dos proteínas estudiadas se encuentran en mayor concentración en las células germinales de ratones *Gopc*^{-/-} que en las de genotipo silvestre. Estos resultados sugieren que la ausencia de la proteína GOPC provoca una desorganización del complejo acrosoma-acroplaxoma-manchette, lo que induce un desajuste en el transporte de las proteínas espermáticas hacia su lugar de actuación.

Los estudios sobre la infertilidad masculina se suelen realizar utilizando ratones *knockout*, modelos de estudio cuyas mutaciones genéticas en todas las células del organismo pueden provocar letalidad

del embrión, baja tasa de supervivencia de las crías o un fallo sistémico en el adulto, por lo que sería interesante utilizar un modelo de estudio *in vivo* en el que la proteína que se analiza esté bloqueada en el órgano de estudio exclusivamente. De esta manera se puede aprovechar la anatomía del testículo que permite introducir en los túbulos seminíferos, a través de los conductos eferentes, anticuerpos que bloquean proteínas implicadas en la formación del espermatozoide. En este trabajo se ha bloqueado la acción de la proteína GOPC directamente en las células germinales para conseguir un fenotipo globozoospermico. Así, el arresto de la proteína GOPC *in vivo* mediante microinyección intratesticular provoca una espermiogénesis defectuosa en muchas de las células germinales, similar a lo observado en las células haploides de ratones *Gopc*^{-/-}. El bloqueo de una proteína diana sólo en las células germinales podría ser la base para desarrollar un método anticonceptivo para el hombre duradero, no hormonal y reversible.

ABSTRACT

Infertility is a medical problem of great importance, whose study is of great scientific and social interest. Male infertility is due to defective spermatogenesis, caused by one or several failures during sperm biogenesis.

Spermatogenesis can be divided into three phases: proliferation, meiosis and differentiation or spermiogenesis. During the last phase, the round spermatids develop into elongated spermatids through several structural modifications: acrosome biogenesis, nuclear compaction, flagella formation, mitochondrial reorganization and the removal of almost all the cytoplasm. Cellular elongation is produced by the action of the acrosome-acroplaxoma-manchette complex, unique structures of the male germ cells.

In this work, we have analyzed the distribution and expression of two acrosomal proteins, GCNF and sp56, in an *Gopc*^{-/-} infertile globozoospermic murine model, whose spermatozoa have globular heads because *Gopc* deletion causes failures during spermiogenesis, such as the incorrect biogenesis of the acrosome, round nuclei, disorganization of the acroplaxome and *manchette* and spiral flagella.

We have observed that the GCNF protein, a transcription factor that represses *Oct4*, *Protamine 1* and *Protamine 2* genes, was located in the nucleus, acrosome and *manchette* of the germ cells, so its transport between these three structures seems to be connected. On the other hand, the acrosome protein sp56 has been characterized both in the acrosome and the cytoplasm of all haploid cells. Its location in the cytoplasm suggests that its transport to the acrosome occurs by means of vesicles from the Golgi apparatus and from another intracellular vesicle transport pathway. The two proteins studied are more highly concentrated in *Gopc*^{-/-} mice germ cells than in the wild type. So, the absence of the GPC protein may disorganize the acrosome-acroplaxoma-manchette complex, which induces a mismatch in the transport of the sperm proteins to their target.

Studies on male infertility are usually done using knockout mice, whose genetic mutations in the whole organism can cause embryo lethality, offspring low survival rate or a systemic failure in the adult. It would be interesting to use an *in vivo* study model in which the protein to be analyzed is exclusively blocked in the organ of study. In this way, it is possible to take advantage of the anatomy of the testicle that allows to introduce in the seminiferous tubules, through the efferent tubules, antibodies that block proteins involved in the formation of the

spermatozoon. In this work, the action of the GOPC protein has been blocked directly in the germ cells to achieve a globozoospermic phenotype. Thus, the arrest of the GOPC protein *in vivo* by intratesticular microinjection caused a defective spermiogenesis in many of the germ cells, similar to the haploid cells of *Gopc*^{-/-} mice. Blocking a target protein only in germ cells could be the basis for developing a long-lasting, non-hormonal and reversible contraceptive method for men.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
1. El testículo	5
1.1. Organización estructural.....	5
1.1.1. Anatomía.....	5
1.1.2. Tipos de células	6
1.1.3. La Barrera Hemato-Testicular	13
1.2. Regulación hormonal	14
1.3. El ciclo del túbulo seminífero	14
2. La biogénesis del espermatozoide	17
2.1. Fase de proliferación	17
2.2. Fase de meiosis.....	17
2.3. Fase de diferenciación.....	17
2.3.1. Formación de acrosoma	18
2.3.2. Elongación celular	19
2.3.3. Formación del flagelo	22
2.3.4. Fases de espermiogénesis	23
2.4. Espermiación.....	25
2.5. El espermatozoide.....	27
3. El complejo acrosoma-acroplaxoma-manchette	30
3.1. El acrosoma.....	31
3.1.1. Estructura del acrosoma.....	33
3.1.2. Proteínas del acrosoma	33
3.2. El acroplaxoma	35
3.2.1. Estructura del acroplaxoma	35
3.3. La <i>manchette</i>	36
3.3.1. Transporte <i>Intramanchette</i>	36
4. El estudio de la infertilidad masculina	39
4.1. La globozoospermia.....	40
4.2. La proteína GOPC	41
4.2.1. GOPC en la espermiogénesis	43
4.2.2. Ratones <i>Gopc</i> ^{-/-}	43
5. La microinyección intratesticular	45
5.1. Anticuerpos para bloquear la acción de proteínas.....	46
5.1.1. Uso de anticuerpos en la investigación de la fertilidad	47
5.2. Contracepción masculina.....	48

II. OBJETIVOS	51
III. MATERIALES Y MÉTODOS	55
1. Animales de estudio	57
2. Microscopía óptica	58
2.1. Fijación, inclusión y cortes	58
2.2. Tinción del Ácido Peryódico-Schiff.....	58
2.3. Inmunohistoquímica para Microscopía óptica.....	58
2.4. Obtención de las imágenes.....	60
3. Microscopía electrónica de transmisión	61
3.1. Fijación	61
3.2. Inclusión en resina y cortes ultrafinos.....	61
3.3. Inmunohistoquímica para TEM	62
3.4. Contraste del tejido.....	62
3.5. Obtención de las imágenes.....	63
4. Biología molecular	64
4.1. Western Blot.....	64
4.1.1. Extracción y cuantificación de proteína	64
4.1.2. Electroforesis	65
4.1.3. Transferencia.....	65
4.1.4. Obtención de las imágenes.....	66
4.2. Reacción en Cadena de la Polimerasa Cuantitativa con Transcripción Inversa	66
4.2.1. Extracción del RNA	67
4.2.2. Obtención del cDNA.....	67
4.2.3. Preamplificación del cDNA	67
4.2.4. Reacción en Cadena de la Polimerasa Cuantitativa.....	68
4.2.5. Análisis de la amplificación	69
5. Determinación de los estadios del ciclo del túbulo seminífero de ratón	70
6. Análisis estadístico	74
6.1. Inmunohistoquímica para TEM	74
6.2. Reacción en Cadena de la Polimerasa Cuantitativa con Transcripción Inversa	75
7. Microinyección intratesticular del anticuerpo anti-GOPC	76

7.1. Anestesia.....	76
7.2. Procedimiento quirúrgico	76
IV. RESULTADOS	79
1. Estudio histológico del epitelio seminífero de ratones	
<i>Gopc</i>^{-/-}	81
1.1. Tinción del Ácido Peryódico-Schiff.....	81
1.2. Localización inmunohistoquímica de Acrosina.....	83
2. Análisis de la distribución de proteínas acrosómicas en la	
espermatogénesis de <i>Gopc</i>^{-/-}	86
2.1. GCNF	86
2.1.1. Localización inmunohistoquímica de GCNF.....	86
2.1.2. Análisis de la variación de la expresión de GCNF.....	90
2.2. sp56.....	94
2.2.1. Localización inmunohistoquímica de sp56.....	95
2.2.2. Análisis de la variación de la expresión de sp56.....	98
3. Análisis histológico del epitelio seminífero de ratones con	
microinyección intratesticular de anti-GOPC	102
3.1. Tinción del Ácido Peryódico-Schiff.....	103
3.2. Distribución de GCNF y sp56.....	104
3.3. Descripción de la ultraestructura en la espermiogénesis.....	108
V. DISCUSIÓN	118
1. La espermatogénesis en ratones <i>Gopc</i>^{-/-}	117
2. Distribución y expresión de GCNF en la espermatogénesis	121
3. Distribución y expresión de sp56 en la espermatogénesis	124
4. La espermatogénesis en ratones tras microinyección	
intratesticular de anti-GOPC	128
VI. CONCLUSIONES	133
VII. BIBLIOGRAFÍA	137
VIII. ANEXO	155

1. Abreviaturas	157
2. Reactivos	159
2.1. Inmunohistoquímica para microscopía óptica.....	159
2.2. Inmunohistoquímica para TEM	159
2.3. Western Blot.....	159
2.4. RT-qPCR.....	160
3. Equipos	161
3.1. Inmunohistoquímica para microscopía óptica.....	161
3.2. Inmunohistoquímica para TEM	161
3.3. Western Blot.....	161
3.4. RT-qPCR.....	161
4. Material de microinyección intratesticular	162

Índice de Figuras

Figura 1. Mapa mundial que muestra una estimación de la tasa de infertilidad masculina por regiones	3
Figura 2. Esquema de un testículo humano.....	5
Figura 3. Organización de las células espermatozógenas en el epitelio seminífero.....	7
Figura 4. Foto de microscopía electrónica de transmisión del núcleo de una espermatozoia del tipo B de ratón	8
Figura 5. Foto de microscopía electrónica de transmisión de núcleo de espermatozoio en fase de paquiteno de ratón	10
Figura 6. Fotos de microscopía electrónica de transmisión de espermátidas de ratón	11
Figura 7. Esquema de los distintos tipos de uniones celulares entre las células de Sertoli en el epitelio del túbulo seminífero	12
Figura 8. Ciclo del túbulo seminífero en ratones.....	15
Figura 9. Estructura de la teca perinuclear	19
Figura 10. Esquema de la localización del acroplaxoma y la <i>manchette</i> en las espermátidas	21
Figura 11. Estructura del flagelo del espermatozoide	23
Figura 12. Esquema de las fases de la espermiogénesis.....	24
Figura 13. Proceso de espermiación en el ratón.....	26
Figura 14. Esquema de la organización estructural del espermatozoide	28
Figura 15. Acción del complejo acrosoma-acroplaxoma- <i>manchette</i> en la elongación de la cabeza de una espermátida	31
Figura 16. Estructuras que componen el acroplaxoma y la <i>manchette</i>	35
Figura 17. Representación de las vías de transporte a través de la <i>manchette</i> durante la elongación de las espermátidas	37
Figura 18. Estructura simplificada de GOPC	42
Figura 19. Fotos de microscopía electrónica de transmisión de espermátidas de ratón <i>Gopc</i> ^{-/-}	44
Figura 20. Guía para la identificación de los estadios del túbulo seminífero de ratón en función de las características morfológicas de cada tipo celular	70
Figura 21. Representación de un túbulo seminífero de ratón con todos los estadios del ciclo con una tinción PAS	71
Figura 22. Comparación de los tipos de espermátidas en cada estadio de la espermiogénesis entre ratones de genotipo silvestre y <i>Gopc</i> ^{-/-}	73
Figura 23. Microinyector <i>CellTram</i> [®] <i>Air</i> (Eppendorf)	76
Figura 24. Proceso de microinyección a través de los conductos eferentes	77
Figura 25. Tinción PAS de estadios del epitelio del túbulo seminífero de ratón silvestre C57BL/6.....	82
Figura 26. Tinción PAS de estadios del epitelio del túbulo seminífero de ratón <i>Gopc</i> ^{-/-}	83
Figura 27. Localización inmunohistoquímica de Proacrosina en ratones C57BL/6 y <i>Gopc</i> ^{-/-}	84

Figura 28. Inmunohistoquímica para microscopía óptica de GCNF en ratones C57BL/6 y <i>Gopc</i> ^{-/-}	87
Figura 29. Inmunohistoquímica para TEM de GCNF en espermátocitos en fase de paquiteno de ratones C57BL/6 y <i>Gopc</i> ^{-/-}	88
Figura 30. Inmunohistoquímica para TEM de GCNF en espermátidas redondas y alargadas de ratones C57BL/6	89
Figura 31. Inmunohistoquímica para TEM de GCNF en espermátidas redondas y en elongación de ratones <i>Gopc</i> ^{-/-}	90
Figura 32. Western Blot de GCNF en muestra de testículos de ratones C57BL/6 y <i>Gopc</i> ^{-/-}	91
Figura 33. Inmunohistoquímica para microscopía óptica de sp56 en ratones C57BL/6 y <i>Gopc</i> ^{-/-}	96
Figura 34. Inmunohistoquímica para TEM de sp56 en espermátidas redondas y alargadas de ratones C57BL/6	97
Figura 35. Inmunohistoquímica para TEM de sp56 en espermátidas redondas y alargadas de ratones <i>Gopc</i> ^{-/-}	98
Figura 36. Western Blot de sp56 en muestra de testículos de ratones C57BL/6 y <i>Gopc</i> ^{-/-}	99
Figura 37. T Tinción PAS de la espermiogénesis de ratones <i>Gopc</i> ^{-/-} y ratones tras microinyección intratesticular de anti-GOPC	103
Figura 38. Inmunohistoquímicas para microscopía óptica de proteínas acrosómicas en ratones tras microinyección intratesticular de anti-GOPC.....	105
Figura 39. Inmunohistoquímica para microscopía óptica de GCNF de la espermiogénesis de ratones <i>Gopc</i> ^{-/-} y tras microinyección intratesticular de anti-GOPC	106
Figura 40. Inmunohistoquímica para microscopía óptica de sp56 en la espermiogénesis de ratones <i>Gopc</i> ^{-/-} y con microinyección intratesticular de anti-GOPC	107
Figura 41. Secciones semifinas de testículos de ratones tras microinyección intratesticular de anti-GOPC teñidas con Azul de Toludina.....	108
Figura 42. Secciones semifinas de testículos de ratones tras microinyección intratesticular de anti-GOPC teñidas con Azul de Toludina.....	109
Figura 43. Ultraestructura de espermátidas de ratones tras microinyección intratesticular de anti-GOPC	110
Figura 44. Ultraestructura de espermátidas del tipo S9 de ratones con microinyección intratesticular de anti-GOPC	111
Figura 45. Ultraestructura de la <i>manchette</i> y acroplaxoma en espermátidas en espermiogénesis de ratones tras microinyección intratesticular de anti-GOPC	111

Índice de Tablas

Tabla 1. Tipos de anomalías en los espermatozoides	39
Tabla 2. Anticuerpos primarios y secundarios para inmunohistoquímica en microscopía óptica.....	59
Tabla 3. Anticuerpos primarios y secundarios para inmunohistoquímica en TEM...	62
Tabla 4. Anticuerpos primarios y secundarios para Western Blot	66
Tabla 5. Protocolo de reacción de retrotranscripción	67
Tabla 6. Protocolo de la <i>Multiplex</i>	68
Tabla 7. Secuencias de los cebadores (<i>Forward y Reverse</i>) de cada gen	68
Tabla 8. Protocolo de la qPCR	69
Tabla 9. Criterios para distinguir los tipos celulares en cada estadio del ciclo del túbulo seminífero en ratones.....	72
Tabla 10. Tipos celulares analizados en inmunohistoquímica para TEM	74

Índice de Gráficas

Gráfica 1. Recuento de partículas de oro por área nuclear en células de la línea espermatogénica para GCNF	92
Gráfica 2. Comparación del recuento de partículas de oro por área nuclear en células de la línea espermatogénica de ratones C57BL/6 y <i>Gopc</i> ^{-/-} para GCNF	92
Gráfica 3. Comparación del recuento de partículas de oro por área de acrosoma en células de la línea espermatogénica de ratones C57BL/6 y <i>Gopc</i> ^{-/-} para GCNF ..	93
Gráfica 4. Comparación del recuento de partículas de oro por área de <i>manchette</i> en células de la línea espermatogénica de ratones C57BL/6 y <i>Gopc</i> ^{-/-} para GCNF ..	94
Gráfica 5. Variación de la expresión relativa (mRNA) de <i>Gcnf</i> entre muestras de ratones C57BL/6 y <i>Gopc</i> ^{-/-}	94
Gráfica 6. Comparación del recuento de partículas de oro por área de acrosoma en células de la línea espermatogénica de ratones C57BL/6 y <i>Gopc</i> ^{-/-} para sp56 ..	99
Gráfica 7. Recuento de partículas de oro por área de citoplasma en células de la línea espermiogénica para sp56	100
Gráfica 8. Comparación del recuento de partículas de oro por área de citoplasma en células de la línea espermatogénica de ratones C57BL/6 y <i>Gopc</i> ^{-/-} para sp56 ..	100
Gráfica 9. Variación de la expresión relativa (mRNA) de <i>Sp56</i> entre muestras de ratones C57BL/6 y <i>Gopc</i> ^{-/-}	101

I. INTRODUCCIÓN

Hoy en día, la infertilidad es un tema que suscita mucho interés ya que es un problema que afecta al 10-15% de las parejas (Sharlip *et al.*, 2002, Matzuk y Lamb, 2002). En cifras se estima que mundialmente hay alrededor de 48,5 millones de parejas con problemas de fertilidad (Mascarenhas *et al.*, 2012). Es un problema tan extendido que ha sido definido por la Organización Mundial de la Salud (WHO) como una enfermedad del sistema reproductor (Zegers-Hochschild *et al.*, 2009).

Más de la mitad de los problemas de fertilidad de las parejas se atribuyen al varón (Feng, 2003; Massart *et al.*, 2012). Se estima que en el mundo la tasa de infertilidad masculina se encuentra entre el 2,5% u el 12% de toda la población mundial, dependiendo de cada región (Fig. 1) (Agarwal *et al.*, 2015).

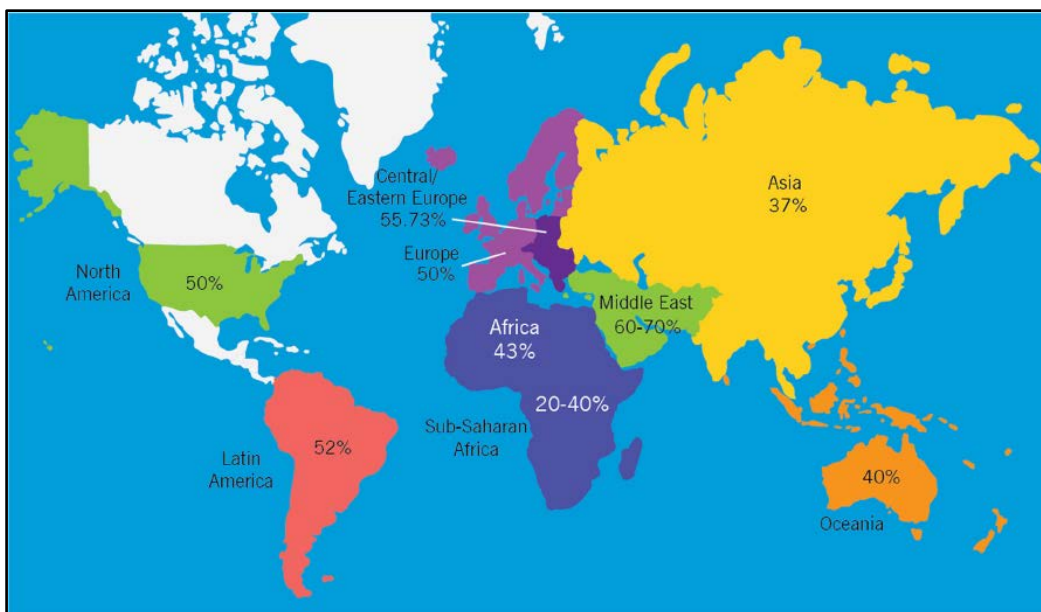


Figura 1. Mapa mundial que muestra una estimación de la tasa de infertilidad masculina por regiones. Los porcentajes están calculados en base al estudio realizado por Cates *et al.* (1985), con datos actuales (Extraído de Agarwal *et al.*, 2015).

Gran proporción de los hombres no conciben debido a la falta de producción de espermatozoides (azoospermia) o producen espermatozoides con morfología anormal (teratozoospermia), entre otras anomalías (Liska, 2003). Los fallos en el desarrollo de espermatozoides maduros fértiles pueden darse por mutaciones de genes esenciales para la correcta espermatogénesis. También la fertilidad masculina está influenciada por una gran variedad de factores psicológicos, ambientales y genotóxicos que generan problemas de infertilidad masculina en distintos niveles (Toshimori *et al.*, 2004).

Los mecanismos genéticos que regulan la gametogénesis y la reproducción se han estudiado por medio del uso de ratones *knockout*, modificados genéticamente para que sean infértiles (Roy y Matzuk, 2006). De esta manera, se han podido realizar estudios *in vivo* de mutaciones que provocan infertilidad, los cuales no se podrían llevar a cabo en el hombre. Los estudios con ratones *knockout* no solo revelan las funciones esenciales de estos genes en el desarrollo de las células germinales masculinas, sino también apuntan a la noción interesante de que estos genes y sus productos proteicos pueden ser dianas para el desarrollo de anticonceptivos masculinos (Yan, 2009; Jamsai y O'Bryan, 2010; O'Donnell *et al.*, 2011).

Debido al gran impacto social y médico que tiene la infertilidad actualmente, la mayoría de los estudios se centran en el conocimiento de sus causas para obtener un tratamiento eficaz. También, es muy interesante conocer las bases metabólicas de la infertilidad masculina para, incluso, desarrollar un método contraceptivo masculino sencillo, eficaz, duradero y reversible.

1. EL TESTÍCULO

El testículo es el órgano donde se forma el gameto masculino, el espermatozoide. Los testículos, que se encuentran por pares en el organismo, forman parte del aparato reproductor masculino, junto con el epidídimo, el conducto deferente, el conducto eyaculador, las vesículas seminales, la próstata y el órgano de cópula (Kierszenbaum y Tres, 2016).

1.1. Organización estructural

1.1.1. Anatomía

El testículo está formado por dos compartimentos: el intersticio, donde se encuentran las células de Leydig y los vasos sanguíneos, y los túbulos seminíferos, en donde están los distintos tipos de células espermatogénicas y las células de Sertoli, formando un epitelio estratificado. Las células del epitelio seminífero se posan sobre una lámina propia, compuesta por una capa de células mioides peritubulares y una red de fibrillas de colágeno tipo I (Wong *et al.*, 2008; Ross y Pawlina, 2012). Cada túbulo seminífero comienza y termina en la *rete testis*. Estructuralmente se encuentran muy contorneados y empaquetados, plegándose sobre sí mismos. Recubriendo estos compartimentos se encuentra la túnica albugínea, una cápsula de tejido conjuntivo denso que mantiene la forma ovalada (Fig. 2).

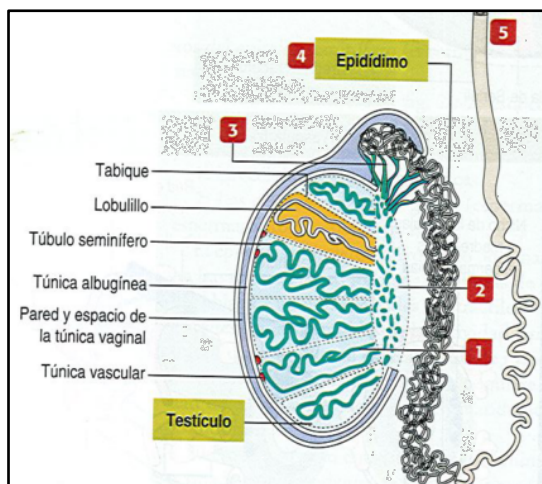


Figura 2. Esquema de un testículo humano. El testículo está rodeado por la túnica albugínea, de la que salen numerosos tabiques que dividen al testículo en lobulillos. Dentro de cada lobulillo se encuentran los túbulos seminíferos (1) que se unen en la *rete testis* (2), de la que nacen los conductos eferentes (3), que convergen en el epidídimo (4) hasta el conducto deferente (5) (Extraído de Kierszenbaum y Tres, 2016).

Esta organización estructural no tiene grandes variaciones entre ratones y humanos. Aun así, en humanos el testículo está dividido en lobulillos que separan los túbulos seminíferos mediante tabiques incompletos de tejido conjuntivo. Esta subdivisión del testículo no se da

en ratones. Por otro lado, el epitelio de cada túbulo seminífero se asienta sobre una membrana basal, constituida por la lámina basal y la lámina reticular. Finalmente, rodeando la membrana basal se sitúa la lámina propia, que en el ser humano está formada por tejido conjuntivo con 3 a 5 capas de células mioides peritubulares, mientras que en el ratón las células mioides están en monocapa (Ross y Pawlina, 2012).

1.1.2. Tipos de células

➤ Células del intersticio

- Células de Leydig

Estas células somáticas se encuentran en el intersticio, la zona entre los túbulos seminíferos, junto a los vasos sanguíneos. Su función principal es la de producir testosterona, necesaria para formación de los espermatozoides (Payne *et al.*, 1980).

- Células mioides peritubulares

Las células mioides peritubulares son un componente estructural importante en el testículo ya que están localizadas en la lámina propia donde se posa el epitelio seminífero (Ross y Pawlina, 2012). Poseen cierta capacidad contráctil, gracias a la cual las espermátidas alargadas, sin capacidad de movimiento, son propulsadas hacia la *rete testis* y hacia el epidídimo para su maduración. Se trata de un tipo celular que comparte características con los fibroblastos y las células del músculo liso (Davidoff *et al.*, 1990). A parte de tener esta función contráctil, también regulan la espermatogénesis, ayudando a establecer el nicho para las espermatogonias (Frenkenthaler *et al.*, 2014).

➤ Células del epitelio seminífero

La característica principal de este epitelio es que está compuesto por células haploides y diploides, en una organización muy especial (Kierszenbaum y Tres, 2016). Así, es un epitelio estratificado complejo, formado por las células espermatogénicas y las células de Sertoli.

Las células espermatogénicas son las células germinales. Llevan a cabo el proceso de espermatogénesis, o de formación del gameto masculino, en el cual mediante las meiosis I y II, se convierten en células haploides, y sufrirán una serie de modificaciones estructurales dando como resultado el espermatozoide (Fig. 3).

Las células espermatogénicas son las espermatogonias, espermatoцитos primarios, espermatoцитos secundarios, espermátidas redondas y espermátidas alargadas. Se desarrollan y diferencian de

manera radial centripeta, es decir, desde la base del epitelio hasta el lumen (Fig. 3). El epitelio se puede dividir en dos compartimentos: el compartimento basal, donde están situadas las espermatogonias y los espermatocitos primarios, y el compartimento adluminal, donde se localizan los espermatocitos secundarios, las espermátidas redondas y las espermátidas alargadas.

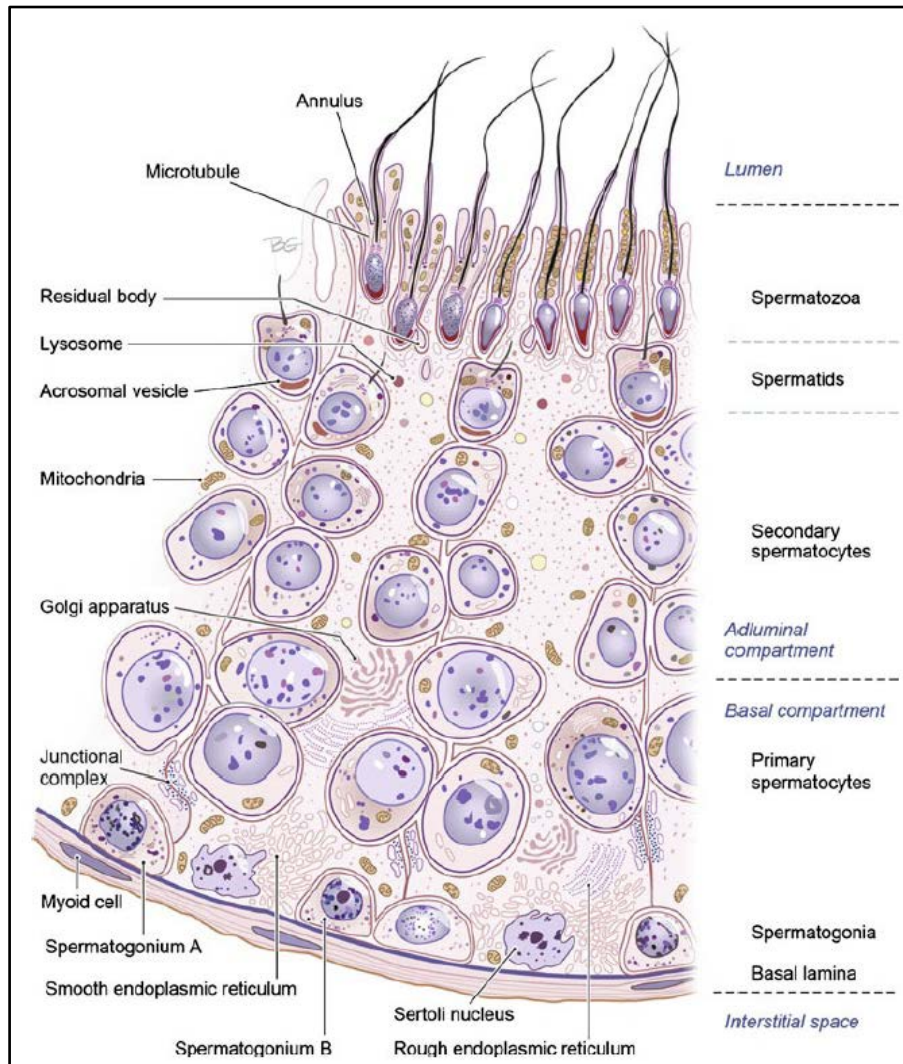


Figura 3. Organización de las células espermatogénicas en el epitelio seminífero. El epitelio seminífero se puede separar en dos compartimentos: el compartimento basal, con las espermatogonias y los espermatocitos primarios, y el compartimento adluminal, con los espermatocitos secundarios, las espermátidas redondas y las espermátidas alargadas. Las células de Sertoli se extienden desde la base, donde se encuentra el núcleo, hasta el lumen. La lámina propia está formada por las células mioideas (*Extraído de Sharma y Agarwal, 2014*).

Todas las células espermatogénicas están conectadas entre sí por puentes citoplasmáticos debido a citocinesis incompletas. Se cree que

estos puentes sirven para sincronizar la maduración entre las gonias y el resto de tipos celulares del epitelio (Fawcett *et al.*, 1959; Huckins, 1978; Russell *et al.*, 1990; Sharma y Agarwal, 2014). Cuando se habla de ellas se incluyen todas en el mismo conjunto celular. Pero hay que destacar que, aunque todas provienen de la misma célula primordial, son distintos tipos celulares debido a que cada una tiene sus características estructurales.

- Espermatogonias

Hay tres tipos de gonias.

1. Espermatogonias células madre: Estas células actúan como las células madre de este epitelio ya que sufren divisiones mitóticas para renovar su número. Reciben el nombre de espermatogonias del tipo A y, en algunos trabajos, también se refieren a ellas como espermatogonias del tipo A oscuro.

2. Espermatogonias proliferativas: Se las denomina proliferativas porque sufren una gran cantidad de divisiones mitóticas para aumentar su número y seguir el proceso de diferenciación. Se engloban dentro de la categoría de espermatogonias del tipo A aunque se las puede diferenciar llamándolas espermatogonias del tipo A claro.

3. Espermatogonias diferenciativas: Dentro de esta categoría están las espermatogonias intermedias y las espermatogonias del tipo B (Fig. 4). Se denominan diferenciativas ya que las espermatogonias del tipo A se dividen mediante mitosis para dar las espermatogonias intermedias y éstas, igualmente, mediante mitosis se dividen en espermatogonias del tipo B. Las espermatogonias del tipo B son las que entrarán en la profase I de la meiosis I, y producirán los espermatoцитos primarios.

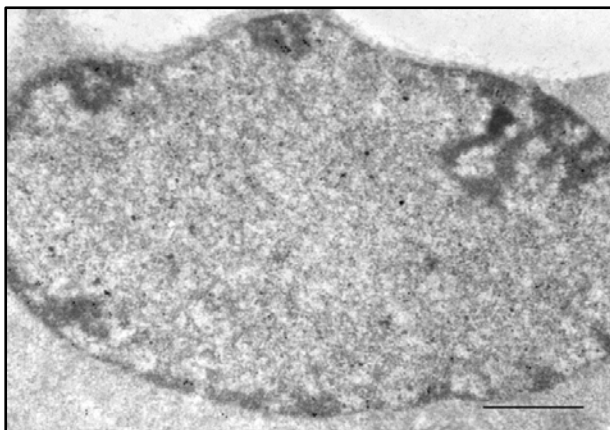


Figura 4. Foto de microscopía electrónica de transmisión del núcleo de una espermatogonia del tipo B de ratón. Se observa que la heterocromatina está localizada cerca de la membrana nuclear interna. Barra 1µm.

Las espermatogonias se encuentran en la base del epitelio. Presentan un núcleo de forma ovoide y están en contacto con las células de Sertoli adyacentes. Las espermatogonias del tipo A y las espermatogonias intermedias tienen poca heterocromatina, localizada cerca de la membrana nuclear interna; mientras que la heterocromatina de las espermatogonias del tipo B forma grumos grandes también cerca de la membrana nuclear interna y cerca del nucleolo (Russell *et al.*, 1990; Ross y Pawlina, 2012; Sharma y Agarwal, 2014).

- Espermatocitos primarios

La característica principal de estas células es que se pueden encontrar en todos los estadios del ciclo del túbulo seminífero, el cual se explicará en el punto 2.3. Estas células se encuentran en la profase I de la meiosis I. A medida que la profase meiótica avanza, las células van sufriendo cambios estructurales:

1. Espermatocitos en preleptoteno-leptoteno-zigoteno: la forma del núcleo se va haciendo más circular debido a que comienzan a moverse desde la base del epitelio hacia el lumen. La heterocromatina pasa de estar cerca de la envoltura nuclear a estar por todo el núcleo. Ya en zigoteno el núcleo es algo más grande y comienzan a formarse los complejos sinaptonémicos, el emparejamiento de los cromosomas homólogos.

2. Espermatocitos en paquiteno: Esta fase está presente en casi todos los estadios del ciclo. El núcleo es de forma redonda y se va agrandando en cada paso del desarrollo (Russell *et al.*, 1990). Los complejos sinaptonémicos están ya formados y se produce la recombinación entre cromosomas homólogos. También se forma el Cuerpo XY o vesícula sexual formada por la condensación de los cromosomas sexuales. Esta heterocromatina suele estar localizada en un área específica, cerca de la envoltura nuclear. La formación de este cuerpo heterocromático previene que el DNA sufra daños y que se produzca una recombinación no homóloga (Bauer *et al.* 1998) (Fig. 5).

3. Espermatocitos en diploteno: en esta fase el núcleo alcanza su mayor tamaño y los complejos sinaptonémicos se han desmontado, pero las cromátidas quedan unidas por los quiasmas. Después de esta fase se da la primera división meiótica.

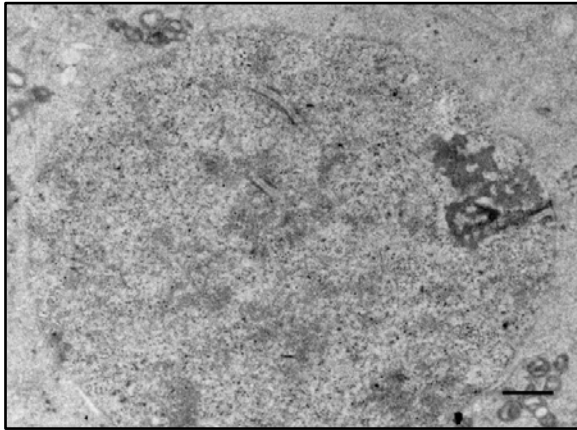


Figura 5. Foto de microscopía electrónica de transmisión de núcleo de espermatocito en fase de paquiteno de ratón. Barra 1µm.

- Espermatocitos secundarios

Las células que se forman después de la primera división meiótica son los espermatocitos secundarios. Los espermatocitos secundarios se dividen por meiosis, produciendo las espermatidas redondas.

- Espermatidas

Se suelen distinguir dos grupos de espermatidas debido a su morfología, espermatidas redondas y espermatidas alargadas. No obstante, hay que tener en cuenta que se hace referencia a una sola célula que deriva de un espermatocito secundario y que sufre cambios morfológicos drásticos.

1. Espermatidas redondas: su característica principal es el núcleo redondo. El acrosoma, orgánulo que contiene todas las enzimas hidrolíticas necesarias para la fecundación del ovocito, comienza a desarrollarse en esta fase. Se observa cómo va creciendo desde una vesícula hasta ocupar toda la parte anterior de la célula (Fig. 6A).

2. Espermatidas alargadas: se caracterizan por tener el núcleo alargado. La cromatina comienza a condensarse a medida que se va alargando el núcleo. En esta fase el acrosoma ocupa toda la parte anterior del núcleo. Este está unido al acroplaxoma, una estructura de unión entre el acrosoma y el núcleo, y a la *manchette*, estructura de elongación de las espermatidas redondas situada en los laterales del núcleo (Fig. 6B). Estas dos estructuras citoesqueléticas se describirán más adelante.

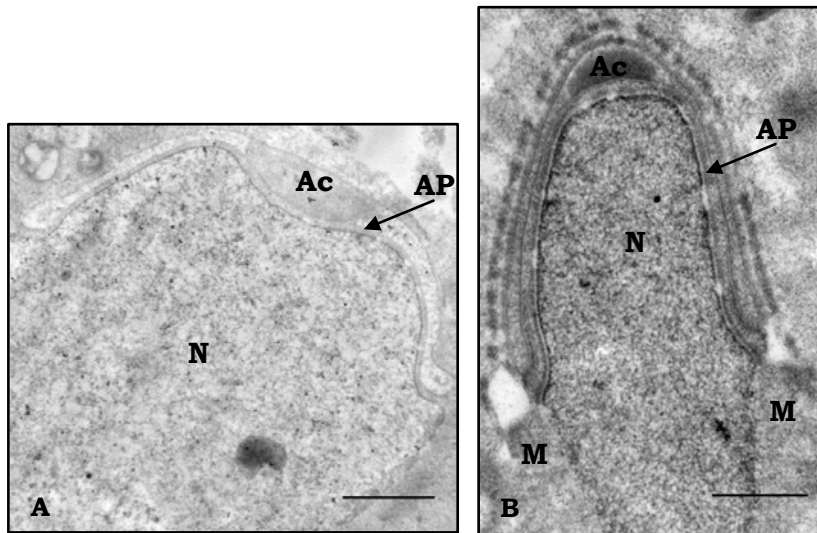


Figura 6. Fotos de microscopía electrónica de transmisión de espermátidas de ratón. A) espermátida redonda (Barra: 1 μ m); B) espermátida alargada (Barra: 500nm). Se observa cada núcleo con su acrosoma y acroplaxoma situados en la parte anterior de la célula. La *manchette* en la espermátida alargada se sitúa a ambos lados del núcleo. N: núcleo, Ac: acrosoma, AP: acroplaxoma, M: *manchette*.

- Células de Sertoli

Las células de Sertoli son células somáticas localizadas entre las células espermatogénicas en el epitelio del túbulo seminífero. Estas células son un factor clave para la correcta biogénesis del espermatozoide. Tienen forma cilíndrica y su núcleo suele presentar una forma triangular. Están siempre en contacto con todos los tipos de células espermatogénicas mediante prolongaciones apicales y laterales (Russell *et al.*, 1990; Cheng y Mruk, 2002; Ross y Pawlina, 2012).

En el ratón comienzan a observarse desde el desarrollo del embrión y después del nacimiento su número sigue incrementándose hasta la pubertad.

Tienen varias funciones. En primer lugar, son las responsables de la estructura del epitelio, y le confieren polaridad, permitiendo la movilidad de las células espermatogénicas desde la base del epitelio hacia el lumen. También tienen la función de regulación hormonal, necesaria para el comienzo de la espermatogénesis. Igualmente, estas células presentan uniones celulares específicas entre ellas lo que origina la Barrera Hemato-Testicular (*The Blood-Testis Barrier*) que divide el epitelio del túbulo en un compartimento basal y un compartimento adluminal. Además, degradan los restos citoplasmáticos producidos por las espermátidas alargadas y participan en la espermiación, el proceso de liberación de las espermátidas maduras al

lumen (Russell *et al.*, 1990; Cheng y Mruk, 2002). Por otro lado, actúan durante la formación de las espermátidas alargadas ya que los filamentos de actina que recubren a las espermátidas ejercen fuerzas constrictoras en la zona del núcleo (Kierszenbaum *et al.*, 2003; Kierszenbaum *et al.*, 2007).

Las diferentes uniones estructurales que existen entre las células de Sertoli y las células espermatogénicas, y entre las propias células de Sertoli, son uniones específicas que sólo se producen en este tejido (Fig. 7). Tienen la capacidad de formarse y remodelarse a medida que las células espermatogénicas se diferencian y migran desde la base del epitelio hacia el lumen (Cheng y Mruk, 2002; Mruk y Cheng, 2004; Wong *et al.*, 2008).

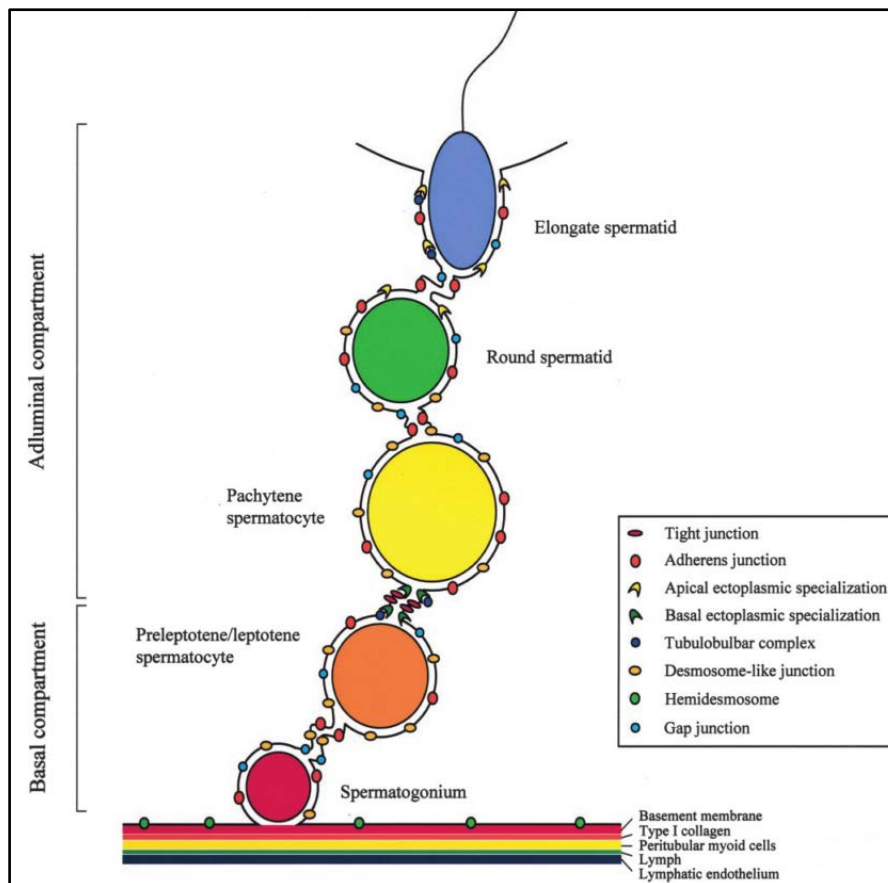


Figura 7. Esquema de los distintos tipos de uniones celulares entre las células de Sertoli en el epitelio del túbulo seminífero. Se encuentran señalizadas las uniones entre células de Sertoli-células germinales: *zonula adherens* (unión de anclaje), *Apical Ectoplasmic Specializations* (especializaciones ectoplasmáticas apicales), uniones de tipo desmosómico y uniones *Gap* (uniones comunicantes). También están representadas las uniones que forman la barrera Hemato-Testicular: *zonula occludens* (unión estrecha), *Basal Ectoplasmic Specialization* (especializaciones ectoplasmáticas basales) y *Tubulobulbar Complex* (complejos tubulobulbares). Finalmente, aparecen las uniones

con la membrana basal: hemidesmosomas (*Modificado de Mruk y Cheng, 2004*).

Uniones célula de Sertoli-célula espermatogénica (Mruk y Cheng, 2004):

- *Zonula adherens*: uniones de anclaje que están localizadas en todas las células espermatogénicas y dan integridad al tejido. Las especializaciones ectoplasmáticas apicales son un tipo especial de unión de anclaje que están localizadas entre las células de Sertoli y las espermátidas alargadas situadas en la parte del epitelio más cercana al lumen (Vogl *et al.*, 2000; Wong *et al.*, 2008).
- Uniones de tipo desmosómico: proporcionan la estructura al epitelio. Estas uniones no se encuentran en las espermátidas alargadas, permitiendo su liberación al lumen.
- Uniones *Gap*: uniones comunicantes desde las células de Sertoli a las células espermatogénicas.

Uniones entre células de Sertoli (Mruk y Cheng, 2004):

- Complejos tubulobulbares: se encuentran en la Barrera Hemato-Testicular y en la zona de la curvatura interna de la cabeza de la espermátida alargada (O'Donnell *et al.*, 2011).
- *Zonula ocludens*: uniones estrechas que forman la Barrera Hemato-Testicular, impidiendo la difusión de solutos del tracto circulatorio, y responsables también de dar polaridad al epitelio.
- Las especializaciones ectoplasmáticas basales unen las células de Sertoli entre sí (Vogl *et al.*, 2000; Wong *et al.*, 2008).

Uniones célula de Sertoli-lámina propia (Mruk y Cheng, 2004):

- Hemidesmosomas: anclan la célula de Sertoli a la membrana basal.

1.1.3. La Barrera Hemato-Testicular

Como ya se ha mencionado, una de las funciones de las células de Sertoli es la de crear la Barrera Hemato-Testicular que separa inmunológicamente las células espermatogénicas del resto del organismo. Esta separación es muy importante puesto que las células espermatogénicas son reconocidas como extrañas por el sistema inmunitario y puede producir anticuerpos contra ellas. Por otro lado, actúa de barrera de protección de las espermatogonias contra agentes externos; en definitiva, crea un microambiente específico para la correcta formación del gameto masculino (Cheng y Mruk, 2002; Mruk y Cheng, 2004; Wong *et al.*, 2008). Las uniones entre las células de Sertoli, explicadas anteriormente, *zonula ocludens*, especializaciones

ectoplasmáticas basales y los complejos tubulobulbares, permiten construir esta barrera (Fig. 7).

1.2. Regulación hormonal

En el testículo postnatal la regulación hormonal comienza con la producción por parte del hipotálamo de la hormona liberadora de Gonadotropinas (GnRH). Esta hormona estimula la secreción de la Hormona Luteinizante (LH) y la Hormona Foliculoestimulante (FSH) por la hipófisis.

La función de síntesis hormonal de las células de Leydig está regulada por la LH, que desencadena la síntesis de testosterona. La testosterona actúa como regulación negativa sobre la hipófisis en la síntesis de LH, y a su vez, actúa sobre las células de Sertoli, donde se une al receptor de andrógenos.

La testosterona es la hormona responsable de la iniciación y mantenimiento de la espermatogénesis, la diferenciación de los órganos genitales masculinos y la adquisición de los caracteres sexuales secundarios masculinos.

Por otro lado, la FSH se une a receptores encontrados en la célula de Sertoli, lo que induce la secreción de *Androgen Binding Protein* (ABP). La ABP permite la unión entre la testosterona y la dihidrotestosterona para que la espermatogénesis se lleve a cabo en los túbulos seminíferos. La producción de FSH está regulada por la inhibina, que actúa sobre el hipotálamo haciendo que éste deje de sintetizar la GnRH (Kierszenbaum y Tres, 2016).

1.3. El ciclo del túbulo seminífero

Como ya se ha comentado, las células espermatogénicas se desarrollan y diferencian de manera radial centripeta, esto es, van migrando desde la base del epitelio hacia el compartimento adluminal, pasando la Barrera Hemato-Testicular sin romper la integridad de la misma (Smith y Braun; 2012). Así, se crea un patrón de asociación de determinados tipos de células germinales por todo el túbulo seminífero. Este patrón de asociación celular va cambiando a lo largo del túbulo seminífero, produciéndose el ciclo. El ciclo se divide en diferentes estadios y dentro de cada estadio se encuentran los tipos celulares en un momento de diferenciación concreto.

La primera clasificación de la asociación de los tipos celulares en los túbulos seminíferos de ratones fue propuesta por Oakberg (1956), que determinó el tiempo de duración de cada estadio y designó los 12 estadios en los que se divide el ciclo. Actualmente esta descripción es la más aceptada y utilizada para el análisis del ciclo del túbulo seminífero en ratones. Siguiendo esta primera descripción, Russell *et al.* (1990) realizaron un esquema de los 12 estadios del ciclo del túbulo seminífero en ratones: los estadios se denominan con números romanos, las espermatogonias se denominan por el tipo de gonia, los espermatoцитos dependiendo de la fase de la meiosis en la que se encuentren y los tipos de espermátidas redondas y alargadas mediante números árabes (Fig. 8).

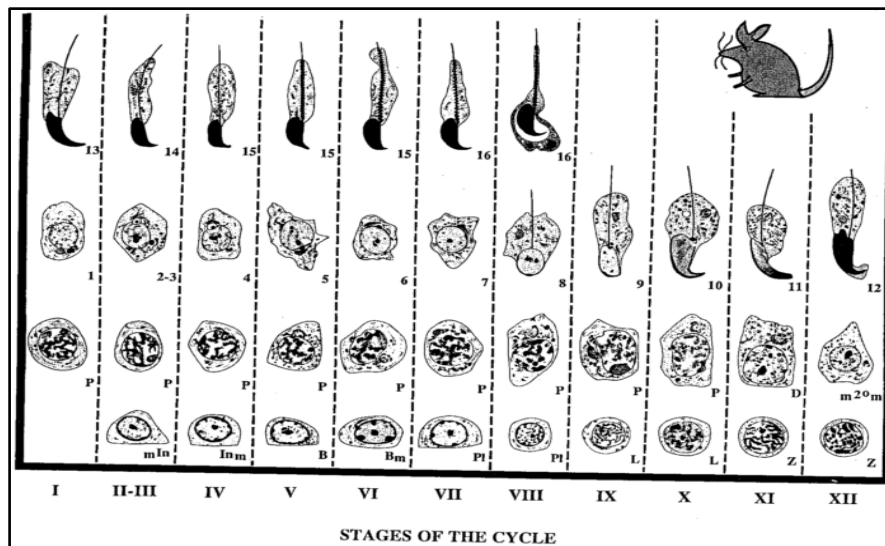


Figura 8. Ciclo del túbulo seminífero en ratones. Los estadios del ciclo están señalizados con números romanos en la base de la tabla. La asociación de tipos celulares de cada estadio está compartimentalizada por líneas discontinuas. *In*: espermatogonia intermedia, *m*: división celular, *B*: espermatogonia del tipo B, *Pl*: espermatoцитo en preleptoteno, *L*: espermatoцитo en leptoteno, *Z*: espermatoцитo en zigoteno, *P*: espermatoцитo en paquiteno, *D*: diacinesis, *m2ºm*: espermatoцитos secundarios, 1-8 espermátidas redondas, 9-12: espermátidas en elongación, 13-15: espermátidas alargadas, 16: espermátidas tardías (Extraído de Russell *et al.*, 1990).

Entre ratones y humanos este ciclo muestra algunas variaciones. En ratones los estadios son secuenciales durante todo el túbulo y cada estadio ocupa una longitud significativa. Por ello, en una sección transversal de un túbulo seminífero se observa un único estadio. En humanos, por otro lado, la distribución de los estadios es en parcelas, es decir, no están secuencialmente distribuidos y en cada zona de un túbulo se pueden encontrar varios estadios juntos (Ross y Pawlina, 2012).

En el ratón una espermatogonia tarda aproximadamente 35 días en diferenciarse a espermatida alargada (Russell *et al.*, 1990). Por su parte, en el hombre el tiempo necesario para la espermatogénesis es de 74 días y alrededor de 12 días para la maduración de la espermatida en el epidídimo (Ross y Pawlina, 2012).

2. LA BIOGÉNESIS DEL ESPERMATOZOIDE

La espermatogénesis es el proceso por el cual las células de la línea germinal masculina se desarrollan y diferencian en una célula tan especializada como es el espermatozoide (Clermont, 1972). La biogénesis del gameto masculino consta de tres fases: proliferación, meiosis y diferenciación celular. Finalmente se produce la espermiación, proceso por el cual las espermátidas alargadas recién formadas son liberadas al lumen del túbulo seminífero (Ross y Pawlina, 2012).

2.1. Fase de proliferación

En primer lugar, las espermatogonias proliferativas sufren un gran número de divisiones mitóticas para obtener un número óptimo de células germinales. Después, las espermatogonias diferenciativas se dividen mediante mitosis para formar los espermatocitos primarios, y entrar en meiosis.

2.2. Fase de meiosis

En segundo lugar, tiene lugar la meiosis mediante dos divisiones consecutivas, denominadas meiosis I y meiosis II, mediante las cuales se reduce a la mitad la cantidad del material genético, formando células haploides.

La meiosis I comienza con la entrada de los espermatocitos en la fase de pre-leptoteno, donde comienzan a formarse los complejos sinaptonémicos (Grell *et al.*, 1980). A continuación, transcurre la fase de paquiteno, donde comienza la recombinación de los cromosomas homólogos y se forma el cuerpo XY. En la fase de diploteno, los complejos sinaptonémicos ya se han desmontado y los cromosomas homólogos se encuentran unidos por los quiasmas (Russell *et al.*, 1990; Jan *et al.*, 2012). En este momento ocurre la primera división meiótica, cuando cada espermatocito primario forma dos espermatocitos secundarios, seguida de la meiosis II, dando como resultado cuatro espermátidas redondas haploides. A medida que las meiosis I y II se van dando, los espermatocitos se van moviendo hacia la luz del túbulo.

2.3. Fase de diferenciación

Durante la fase de diferenciación, denominada espermiogénesis, se produce la transformación de las espermátidas redondas en

espermátidas alargadas y, finalmente, en espermatozoides. En este proceso tienen lugar las siguientes modificaciones estructurales: la biogénesis del acrosoma, la compactación nuclear y elongación celular, la formación del flagelo, la reorganización mitocondrial y la eliminación de casi todo el citoplasma (Clermont, 1972; Ross y Pawlina, 2012; Kierszenbaum y Tres, 2004).

2.3.1. Formación del acrosoma

El acrosoma es un orgánulo que rodea la parte anterior del núcleo y que contiene enzimas hidrolíticas que permiten al espermatozoide romper las barreras protectoras del ovocito, las células de la granulosa y la zona pelúcida, mediante la reacción acrosómica en el momento de la fecundación (Berruti y Paiardi, 2011). Entre estas proteínas se encuentran inhibidores de proteasas y proteínas de unión a la zona pelúcida del ovocito, entre otras (Williams *et al.*, 1993; Baba *et al.*, 1994; Kohno *et al.*, 1998).

Su biogénesis es un proceso progresivo que, en el ratón, comienza en la fase de paquiteno de la meiosis y acaba en la espermátida alargada de tipo 12. El aparato de Golgi comienza a formar las vesículas pre-acrosómicas que, cuando acaba la meiosis II, son transportadas hacia la parte anterior del núcleo donde se fusionarán entre sí y se unirán a la envoltura nuclear (Anakwe *et al.*, 1991; Ramalho-Santos *et al.*, 2002). Cabe destacar que ya en los espermátocitos en paquiteno se ha observado la síntesis de proacrosina, precursor de la acrosina, una de las enzimas hidrolíticas localizada en el acrosoma maduro y clave en el proceso de fecundación del ovocito (Escalier *et al.*, 1991; Bermudez *et al.*, 1994). El transporte de las vesículas pre-acrosómicas desde el aparato de Golgi hasta la parte anterior del núcleo se produce mediante proteínas motoras, como la kinesina y dineina asociadas a los microtúbulos y la miosina-Va asociada a los filamentos de actina (Kierszenbaum y Tres, 2004). La vesícula acrosómica es redonda hasta que hace contacto con el núcleo y se va alargando, a la vez que lo va haciendo la espermátida, desde la espermátida tipo 5 a la tipo 12 (Russell *et al.*, 1990; Yoshinaga y Toshimori, 2003; Jan *et al.*, 2012; Ross y Pawlina, 2012; Nakamura, 2013; Kierszenbaum y Tres, 2016).

En el ratón la formación del acrosoma dura aproximadamente dos semanas mientras que en el hombre dura un mes (Lin *et al.*, 2007).

2.3.2. Elongación celular

Durante la elongación celular, las espermátidas redondas sufren modificaciones estructurales hasta acabar con la forma alargada característica de los espermatozoides. En este paso de la espermiogénesis se producen simultáneamente la compactación del material genético, la elongación del núcleo y del acrosoma por la actuación conjunta del citoesqueleto.

A continuación se describirán las estructuras del citoesqueleto implicadas en la elongación de las espermátidas: la teca perinuclear, el acroplaxoma y la *manchette*.

➤ La teca perinuclear

La teca perinuclear recubre todo el núcleo de la espermátida en elongación, menos la zona de la pieza de conexión del flagelo (Courstens *et al.*, 1976; Longo *et al.*, 1987; Oko y Morales, 1994). Se encuentra dividida en dos regiones (Fig. 9) (Fawcett, 1970; Oko y Sutovsky, 2009; Toshimori y Eddy, 2015):

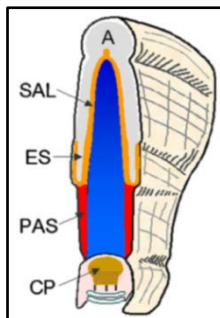


Figura 9. Estructura de la teca perinuclear. La teca perinuclear está señalizada en naranja, región sub-acrosómica y segmento ecuatorial, y en rojo, vaina post-acrosómica. En azul está el núcleo condensado de la espermátida. En marrón se localiza la pieza de conexión del flagelo (Modificado de Oko y Sutovsky, 2009).

- Región sub-acrosómica localizada, en la zona apical entre la membrana acrosómica interna y la envoltura nuclear (esta región también recibe el nombre de acroplaxoma) (Kierszenbaum *et al.*, 2003), y en la zona basal en el segmento ecuatorial de la cabeza de la espermátida, donde recubre el final del acrosoma hasta situarse entre la membrana plasmática y la membrana acrosómica externa.
- Vaina post-acrosómica entre el final del acrosoma y la pieza de conexión.

En su biogénesis, parte de las proteínas que forman la región sub-acrosómica se transportan hacia la zona de la región acrosómica unidas a las vesículas pre-acrosómicas, y cuando alcanzan la envoltura nuclear, participan en la unión de estas vesículas al núcleo. Por otro lado, durante la formación de la vaina post-acrosómica, las proteínas estructurales se traducen en el citosol y son transportadas a través de

la *manchette* hacia la región post-acrosómica (este proceso se explicará en el punto 3.3.1.) (Okó y Morales, 1994; Wu *et al.*, 2007; Okó y Sutovsky, 2009). La vaina post-acrosómica tiene las funciones de activación de la anti-poliespermia y del oocito mediante su solubilización en la fecundación (Sutovsky *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2007; Okó y Sutovsky, 2009; Ito *et al.*, 2009).

➤ El acroplaxoma

El acroplaxoma, también denominado región sub-acrosómica, es una estructura de citoesqueleto formada por la placa del acroplaxoma y el anillo marginal. Está constituida por filamentos de actina y queratina 5 (Sak57/K5) (Kierszenbaum *et al.*, 2003) (Fig. 10). La placa del acroplaxoma está localizada entre la región anterior del núcleo y el acrosoma y tiene la función de soporte y unión del acrosoma al núcleo durante la elongación de la cabeza de la espermátida. El anillo marginal une la membrana acrosómica interna a la envoltura nuclear en la zona del segmento ecuatorial (Kierszenbaum *et al.*, 2003; Kierszenbaum y Tres, 2004; Göb *et al.*, 2010).

➤ La manchette

La *manchette* comienza a ensamblarse cuando la formación del acrosoma ya ha comenzado. Es una estructura de citoesqueleto formada por microtúbulos y filamentos de actina. Unos microtúbulos forman un anillo perinuclear, y otros se encuentran anclados a este anillo y orientados hacia el centrosoma (Fig. 10) (Kierszenbaum *et al.*, 2003; Kierszenbaum y Tres, 2004). La correcta formación y localización de la *manchette* es crucial para la elongación del núcleo. Sin esta estructura la cabeza de la espermátida no se alargará (Russell *et al.*, 1991).

Cabe destacar que existe bastante controversia sobre el centro de organización de microtúbulos (MTOC) de la *manchette*. Por un lado, se considera que el centrosoma es el MTOC dado que está formado por unidades de γ -tubulina. No obstante, Wolosewick y Bryan (1977) postularon que el anillo perinuclear podría actuar como MTOC, aún sin tener unidades de γ -tubulina (Moreno y Schatten, 2000). Incluso Petry *et al.* (2013) sugirieron que los microtúbulos pueden formarse desde otros sitios donde hay más microtúbulos. Otro ejemplo es la proteína Centrobina, necesaria para la formación y estabilización de los microtúbulos (Gudi *et al.*, 2011), que ha sido localizada en el acroplaxoma, el anillo marginal, la *manchette*, y el centrosoma durante la espermiogénesis (Liska *et al.*, 2009) y en el citoplasma (Shin *et al.*, 2015), lo que sugiere que todas estas estructuras celulares podrían

actuar como MTOC. Hoy en día esta parte de la espermiogénesis está aún por dilucidar (revisiones en O'Donnell y O'Bryan, 2014; Lehti y Sironen, 2016).

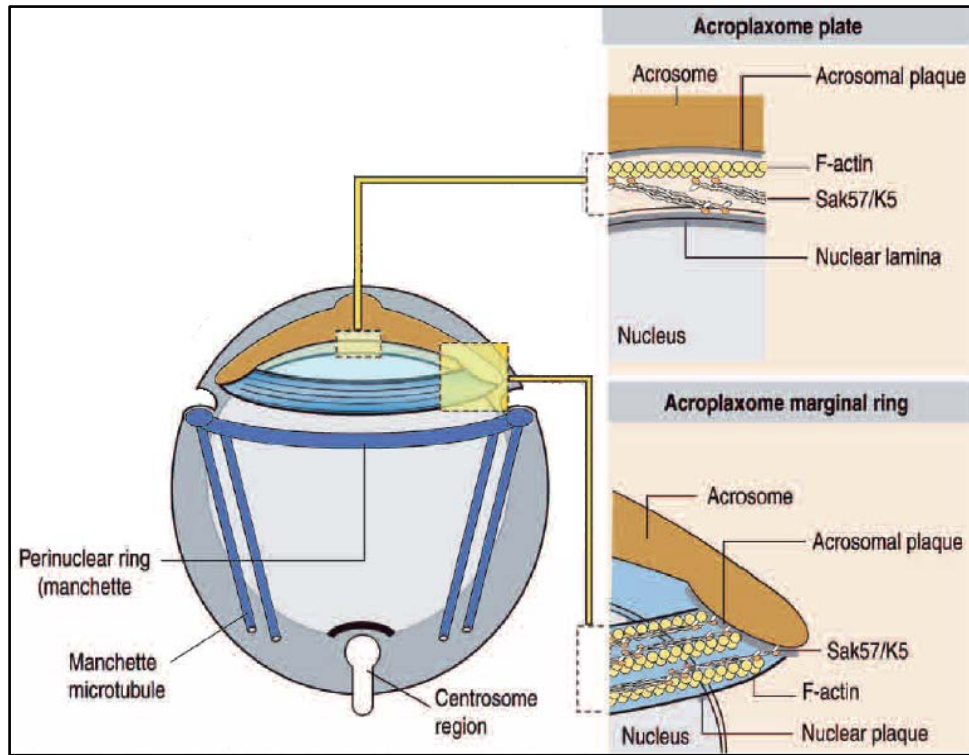


Figura 10. Esquema de la localización del acroplaxoma y la manchette en las espermatidas. El acroplaxoma se encuentra entre el acrosoma y la envoltura nuclear. Está formado por la placa del acroplaxoma y el anillo marginal, ambos compuestos por filamentos de actina y queratina 5 (Sak57/K5). Los microtúbulos del anillo perinuclear de la *manchette* están situados alrededor del núcleo y el resto de los microtúbulos están orientados hacia el centrosoma (*Modificado de Kierszenbaum y Tres, 2004*).

En el ratón, la *manchette* es observable desde la espermatida de tipo 8 hasta el tipo 13-14 (O'Donnell y O'Bryan, 2014). En esta fase celular el anillo marginal del acroplaxoma junto con el anillo perinuclear de la *manchette*, se desplazan hacia la parte opuesta del acrosoma, reduciendo su diámetro, lo que provoca la elongación nuclear y acrosómica (Russell *et al.*, 1991; Lehti y Sironen, 2016).

➤ La compactación del material genético

La compactación del material genético durante la espermiogénesis es un proceso diferente a la compactación genómica de una célula somática. Las histonas que están unidas al material genético de las espermatidas redondas son reemplazadas por histonas específicas del testículo, después por proteínas de transición y finalmente por las protaminas (Braun, 2001; Kierszenbaum, 2001). El nivel de compactación

que se logra es mayor que con las histonas, debido a su estructura rica en arginina y la gran cantidad de residuos de cisteína que les confieren a estas proteínas la capacidad de unirse fuertemente al DNA y de formar puentes disulfuro para aumentar el orden de empaquetamiento, respectivamente (Balhorn *et al.*, 2000). La forma de solenoide que adquiere el DNA con las histonas es reemplazada por una forma toroidal (Allen *et al.*, 1993). Este nivel de compactación protege el material genético durante el transporte del espermatozoide por el tracto reproductor masculino y femenino.

2.3.3. Formación del flagelo

El flagelo del espermatozoide, empezando desde la cabeza se divide en: la pieza de conexión, la pieza intermedia (también denominada media), la pieza principal y la pieza terminal (Fig. 11).

En primer lugar, el centrosoma migra hacia la parte opuesta del acrosoma en formación, donde el centriolo proximal se posiciona cerca de la membrana nuclear haciendo que ésta se invagine. El centriolo distal formará el axonema compuesto por nueve dobletes de microtúbulos y dos microtúbulos centrales (estructura 9+2). Por encima del axonema se extienden nueve fibras densas, compuestas por las proteínas *Outer dense fiber proteins* (ODFs), específicas de esta estructura (Petersen *et al.*, 1999). Estas dos estructuras forman la pieza de conexión entre el núcleo y el flagelo. A continuación, se produce el reclutamiento de las mitocondrias hacia la pieza de conexión, donde se redistribuirán helicoidalmente y rodearán las fibras densas, formando la pieza intermedia de la cola. Las fibras densas junto con la vaina fibrosa, formada por más de 20 proteínas unidas entre ellas por puentes disulfuro (revisión en Toshimori y Eddy, 2015), se extenderán por el flagelo formando la pieza principal y la pieza terminal de la cola del espermatozoide (Inaba, 2011; Ross y Pawlina, 2012; Toshimori y Eddy, 2015).

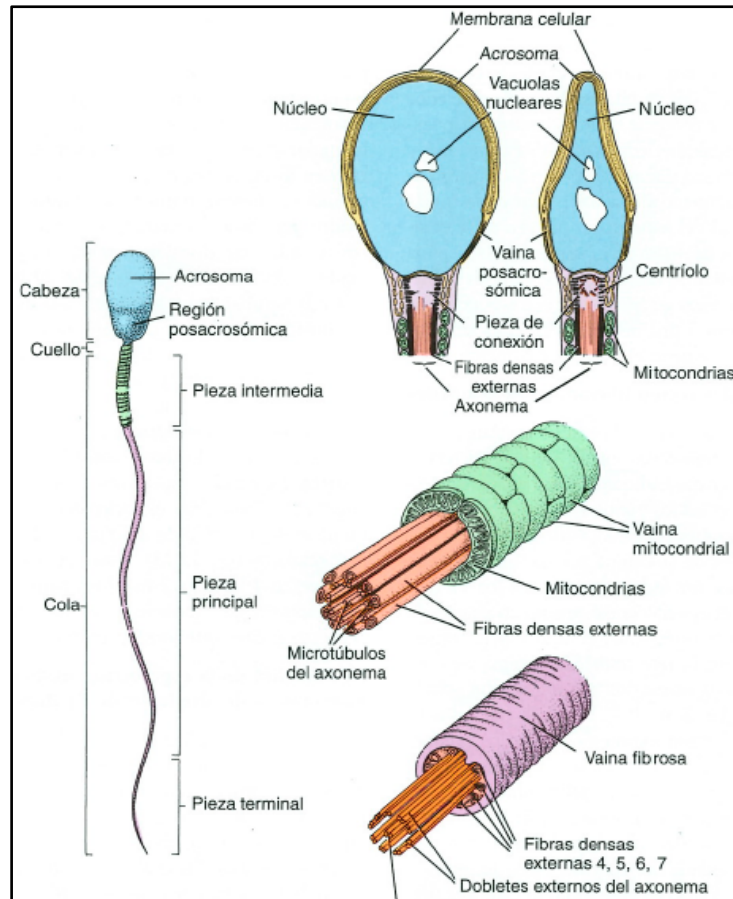


Figura 11. Estructura del flagelo del espermatozoide. Arriba se muestran las estructuras de la cabeza del espermatozoide humano, seguido de una ilustración de la pieza intermedia y de la pieza principal (Extraído de Ross y Pawlina, 2012).

2.3.4. Fases de la espermiogénesis

Las modificaciones estructurales de la espermiogénesis se producen de forma simultánea y se pueden dividir en cuatro fases: fase de Golgi, fase de casquete, fase de acrosoma, y fase de maduración (Fig. 12) (Abou-Haila y Tulsiani, 2000; Hermo *et al.*, 2010; Jan *et al.*, 2012; Ross y Pawlina, 2012; Nakamura, 2013; Kierszenbaum y Tres, 2016).

1. En la fase de Golgi, el aparato de Golgi forma la vesícula acrosómica que se sitúa en la parte anterior del núcleo. Los centriolos migran al extremo opuesto de la célula, donde el centriolo distal se alinea perpendicularmente al núcleo y se comienza a formar el axonema.
2. Durante la fase de casquete, el acrosoma se extiende sobre la parte anterior del núcleo.
3. La fase de acrosoma comienza cuando las espermátidas redondas se reorientan de forma que el acrosoma queda mirando hacia la

membrana basal del túbulo seminífero. También se forma la *manchette*. Los centriolos se unen al núcleo para formar la futura pieza de conexión que unirá la cabeza del espermatozoide con el flagelo, y las mitocondrias comienzan su migración hacia la parte posterior de la célula.

4. Finalmente, durante la fase de maduración, el exceso de citoplasma es eliminado y fagocitado por las células de Sertoli.

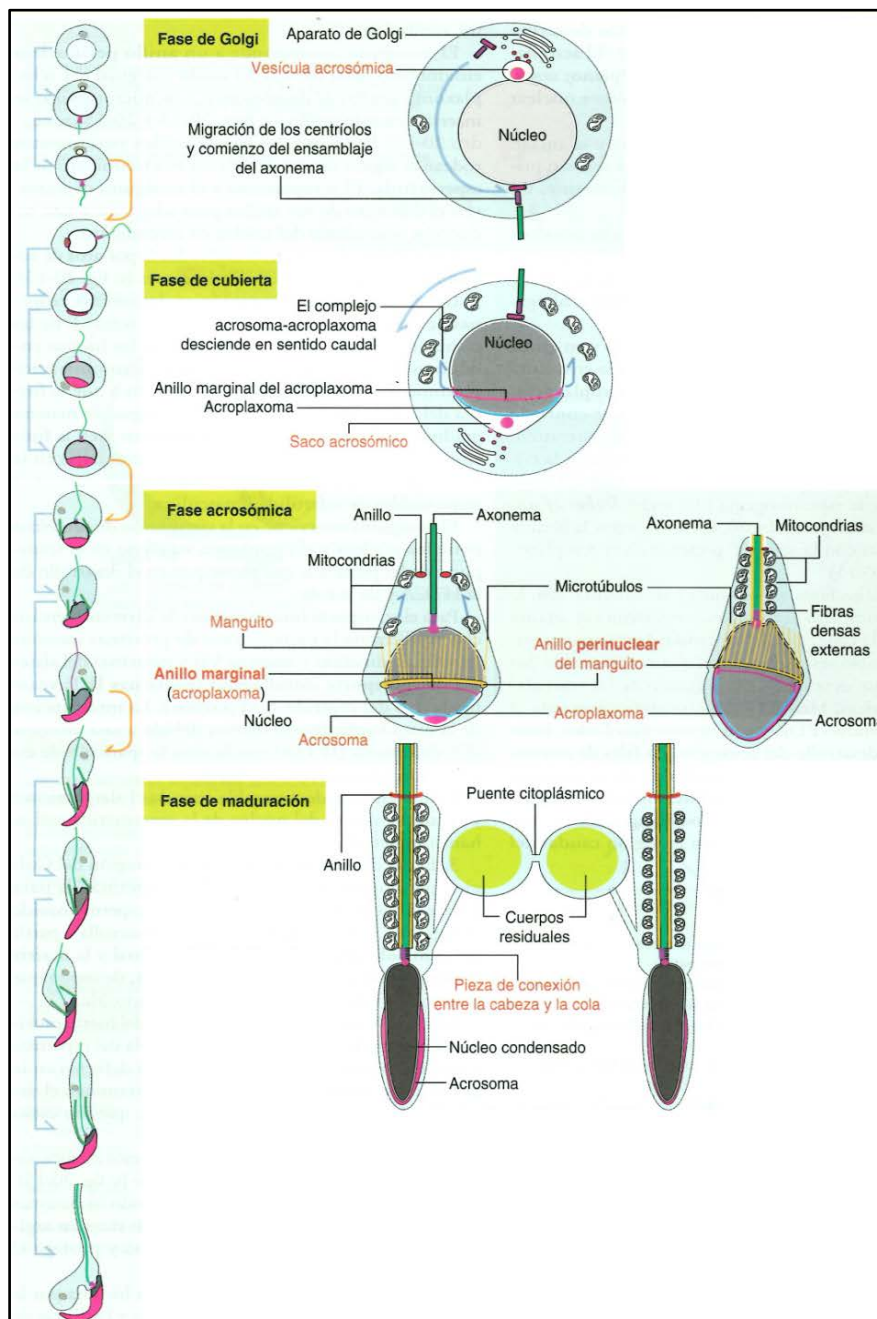


Figura 12. Esquema de las fases de la espermiogénesis. Las cuatro fases de la espermiogénesis son: la fase de Golgi, la fase de cubierta (o casquete), la fase de acrosoma y la fase de maduración. Se observan las modificaciones estructurales que acontecen en cada fase (*Modificado de Kierszenbaum y Tres, 2016*).

En el ratón, el proceso de espermatogénesis abarca un período de 35 días, aproximadamente 5 semanas (Russell *et al.*, 1990). Al comienzo de la pubertad, las espermatogonias comienzan a proliferar y, alrededor del día 9°-10° comienza la fase de meiosis, que resultará en los primeros espermatoцитos primarios. Durante los siguientes 12 días, éstos pasan por las etapas sucesivas de la primera onda de meiosis y las primeras células en diploteno aparecen alrededor del día 19°. En la primera división meiótica se forman los espermatoцитos secundarios que casi inmediatamente se someten a la siguiente división meiótica para convertirse en espermátidas haploides sobre el día 20°-22°, hasta el día 35° que alcanzarán la forma alargada (Russell *et al.*, 1990).

2.4. Espermiación

La espermiación es el proceso por el que las espermátidas alargadas se liberan del epitelio del túbulo seminífero y son transportados al epidídimo para su maduración. Durante este proceso se producen cambios tanto en la célula de Sertoli como en la espermátida alargada: la eliminación de estructuras especializadas de unión de la célula de Sertoli, la remodelación del citoplasma de la espermátida, la retractación del citoplasma de la célula de Sertoli y la separación del espermatozoide del epitelio al lumen. Estos cambios morfológicos están conservados en roedores, monos y humanos. En el hombre la espermiación comienza en el estadio II, que se corresponde con el estadio VII del ratón (Russell *et al.*, 1993; O'Donnell *et al.*, 2011).

Las uniones intercelulares entre la célula de Sertoli y la espermátida alargada, que se eliminan de manera progresiva, son las especializaciones ectoplasmáticas y complejos tubulobulbares. Al comienzo de la espermiación el citoplasma de las espermátidas alargadas está totalmente envuelto por el citoplasma de la célula de Sertoli, unidos por las especializaciones ectoplasmáticas. Los complejos tubulobulbares en primer lugar se encuentran en la parte curvada de la cabeza y cuando el citoplasma de la célula de Sertoli comienza a retraerse, las especializaciones ectoplasmáticas son progresivamente reemplazadas por los complejos tubulobulbares, ya que se ha observado que los dos están formadas por los mismos componentes estructurales. Así, los complejos tubulobulbares internalizan las especializaciones ectoplasmáticas para su eliminación (Fig. 13) (Russell *et al.*, 1993; Guttman *et al.*, 2004).

A medida que la espermiación progresa, la espermatida se va situando más cerca del lumen y el citoplasma de la célula de Sertoli queda en contacto sólo con la parte dorsal de la espermatida. Igualmente, el citoplasma de la espermatida comienza a separarse del núcleo para su eliminación (Russell *et al.*, 1993). La espermiación termina cuando la espermatida alargada es liberada al lumen del túbulo seminífero. El exceso de citoplasma es retenido por la célula de Sertoli y finalmente fagocitado y transformado en fagosomas (De Kretser *et al.*, 1988), aunque algo de citoplasma queda adherido a la espermatida en forma de gota (*cytoplasm droplet*), localizada en la pieza intermedia (Toshimori, 2003).

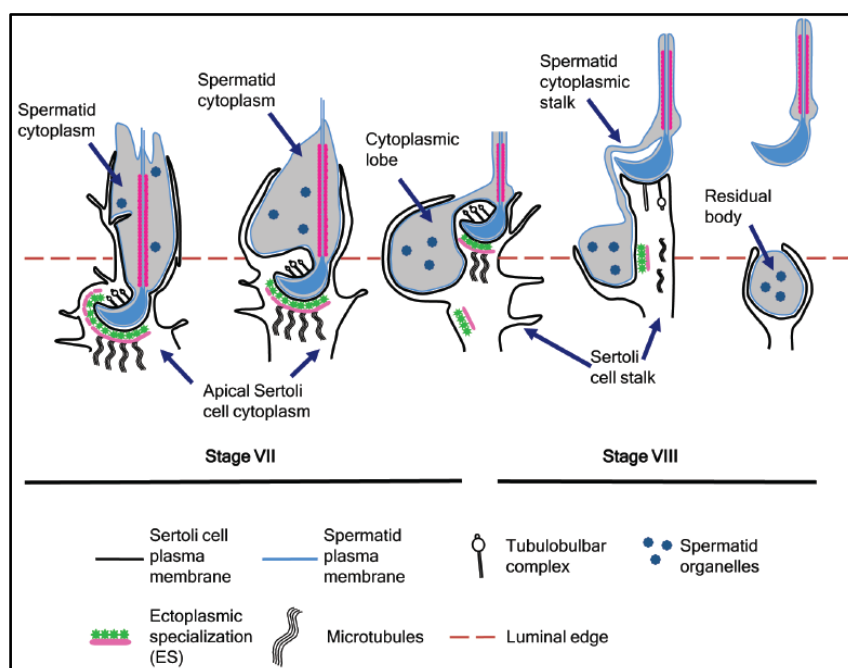


Figura 13. Proceso de espermiación en el ratón. Se produce la eliminación de las uniones celulares especializadas entre la célula de Sertoli y la espermatida alargada, así como la eliminación de los restos citoplasmáticos de la espermatida alargada (*Modificado de O'Donnell et al., 2011*).

Las espermatidas alargadas recién liberadas son inmóviles y son transportadas en el líquido secretado por las células de Sertoli hacia el epidídimo para su maduración gracias a las contracciones peristálticas de las células mioides peritubulares. No obstante, todavía no tienen la capacidad de fecundar el oocito, tienen que sufrir el proceso de capacitación en el tracto genital femenino. Estos sucesos se explicarán más adelante.

2.5. El espermatozoide

El espermatozoide es el gameto masculino, una célula haploide con una morfología muy característica, esencial para llegar al oocito y fecundarlo (Young y Heath, 2000; Kierszenbaum y Tres, 2016). Morfológica y funcionalmente se puede dividir en dos partes (Fig. 14):

➤ La cabeza del espermatozoide

La cabeza alberga el núcleo con la cromatina, con el nivel máximo de empaquetamiento, y el acrosoma, anclado a la envoltura nuclear por el acroplaxoma en la región anterior de la cabeza. Como ya se ha comentado, el nivel tan alto de condensación protege el material genético durante el paso del espermatozoide por el tracto masculino y femenino (Braun, 2001; Allen *et al.*, 1993; Kierszenbaum, 2001).

Igualmente, la correcta morfología del acrosoma es primordial para que la capacidad de fecundación del espermatozoide no se vea afectada (Lin *et al.*, 2007; Buffone *et al.*, 2008). También la presencia de la vaina post-acrosómica de la teca perinuclear es fundamental en la activación del oocito tras la fecundación del espermatozoide (Sutovsky *et al.*, 2003; Ito *et al.*, 2009).

➤ El flagelo del espermatozoide

El flagelo está dividido en tres segmentos: las piezas media, principal y terminal. Cada parte tiene una composición y función determinada para su buen funcionamiento.

En la pieza media se encuentran dispuestas helicoidalmente las mitocondrias. Son las encargadas de proporcionar la energía para el movimiento del espermatozoide en el tracto genital femenino. El *annulus* (anillo de Jansen) está localizado entre la pieza media y la principal de la cola. Es esencial para la integridad mecánica y estructural ya que parece que es el encargado de coordinar la disposición de las mitocondrias (Toure *et al.*, 2011). Las fibras densas, localizadas en las tres piezas, tienen las funciones de protección del flagelo durante la maduración del espermatozoide en el epidídimo y la eyaculación. También confieren estabilidad, elasticidad y un aumento en la capacidad de rotación del flagelo (Toshimori y Eddy, 2015). La vaina fibrosa está involucrada en la regulación de la motilidad (Fawcett, 1975).

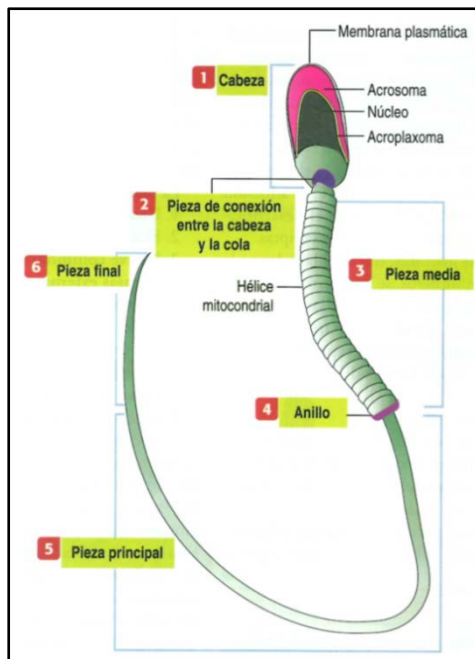


Figura 14. Esquema de la organización estructural del espermatozoide. Se pueden observar las estructuras de la cabeza, donde se encuentran el acrosoma, el núcleo y el acroplaxoma, la pieza de conexión y la cola, formada por la pieza media, anillo, pieza principal y pieza final (Extraído de Kierszenbaum y Tres, 2016).

Para que el espermatozoide sea totalmente funcional aún necesita sufrir procesos de maduración en el epidídimo. También es importante la capacitación del espermatozoide en el tracto genital femenino para que se produzca la reacción acrosómica, la principal función del acrosoma.

Mediante la maduración, las espermátidas alargadas obtienen la capacidad de fertilizar el ovocito y la movilidad del flagelo. Estos procesos se dan mediante cambios bioquímicos y morfológicos por la acción de diferentes proteínas secretadas por el epitelio del epidídimo (Robaire *et al.*, 2006). Algunas proteínas se quedan en el lumen del epidídimo, otras se unen a la membrana de la espermátida (Von Horsten *et al.*, 2007), y algunas llegan hasta el acrosoma (Dacheux *et al.*, 2005). Las proteínas intra-acrosómicas cambian su localización y tamaño durante la maduración, como por ejemplo sp10 que sufre cambios de glicosilación/desglicosilación (Yoshinaga y Toshimori, 2003). Guyonnet *et al.* (2012) observaron en espermatozoides tras su paso por el epidídimo 362 nuevas proteínas en la matriz del acrosoma que no estaban en los espermatozoides analizados sin madurar.

La capacitación de los espermatozoides maduros se produce durante su paso por el tracto genital femenino, para que sean capaces de fecundar el oocito. De esta manera, se desenmascaran receptores de superficie celular para el reconocimiento y unión del espermatozoide al oocito en el momento de la fecundación (Yanagimachi, 1994) y también el espermatozoide responde a estímulos procedentes de la zona pelúcida del oocito, desencadenando la reacción acrosómica (Chang, 1951).

Finalmente, durante la reacción acrosómica se produce una exocitosis gradual del acrosoma. En primer lugar se da la unión de la Membrana Acrosómica Externa (OAM) con la membrana plasmática del espermatozoide, proceso irreversible, lo que provoca la liberación de parte de las enzimas hidrolíticas del acrosoma para atravesar las células de la granulosa del oocito. A continuación, se produce el reconocimiento de la proteína ZP3 del oocito y como consecuencia, se expone la totalidad del acrosoma para que el espermatozoide pueda atravesar la zona pelúcida (Yoshida *et al.*, 2008).

En los mamíferos, la morfología del espermatozoide está conservada, con algunas diferencias importantes. Por ejemplo, la cabeza del espermatozoide de rata y ratón es falciforme, mientras que los de hombre y perro son de forma ovalada (Russell *et al.*, 1990). Igualmente, el espermatozoide humano tiene 60 μ m de longitud, el de conejo 46 μ m, el de ratón 120 μ m y el de rata 190 μ m (Eddy, 2006).

3. EL COMPLEJO ACROSOMA-ACROPLAXOMA-MANCHETTE

El complejo acrosoma-acroplaxoma-manchette está formado, como su propio nombre indica, por estas tres estructuras, únicas en las células espermatozógenas. El acroplaxoma y la *manchette* se encuentran unidos al núcleo mediante el anillo marginal y el anillo perinuclear, respectivamente. También se introduce al acrosoma en este complejo puesto que estas dos estructuras citoplasmáticas tienen un papel fundamental tanto en la formación como en la elongación de este orgánulo (Kierszenbaum *et al.*, 2003; Kierszenbaum y Tres, 2004).

La descripción del acrosoma, el acroplaxoma y la *manchette* como un complejo de modelación de la cabeza de las espermátidas en elongación fue propuesto por Kierszenbaum y Tres (2004). En esta revisión se describe el mecanismo de elongación de las células espermáticas por la acción conjunta del acroplaxoma y la *manchette*, junto con fuerzas contráctiles exógenas, generadas por los filamentos de actina presentes en las células de Sertoli.

Así, durante la espermiogénesis, el anillo marginal del acroplaxoma desciende hacia el axonema, lo que provoca la elongación del núcleo y del acrosoma, ya que está unido a ambos (Kierszenbaum *et al.*, 2003; Kierszenbaum y Tres, 2004). Por su parte, el anillo perinuclear de la *manchette* va disminuyendo su diámetro a la vez que desciende, junto al anillo marginal del acroplaxoma, hacia el axonema (Kierszenbaum y Tres, 2004) (Fig. 15). Otra función que se le atribuye a este complejo es la de transporte a través de los microtúbulos de la *manchette* de elementos nucleares (Kierszenbaum *et al.*, 2002; Göb *et al.*, 2010) y citoplasmáticos para la formación del flagelo por los microtúbulos de la *manchette* (Kierszenbaum, 2002; Kierszenbaum *et al.*, 2002; Kierszenbaum *et al.*, 2011; Lehti y Sironen, 2016) (Fig. 15).

De esta manera, el complejo acrosoma-acroplaxoma-manchette tiene la importante función de elongar el núcleo de las espermátidas en formación, al igual que la formación de la pieza de conexión y del flagelo.

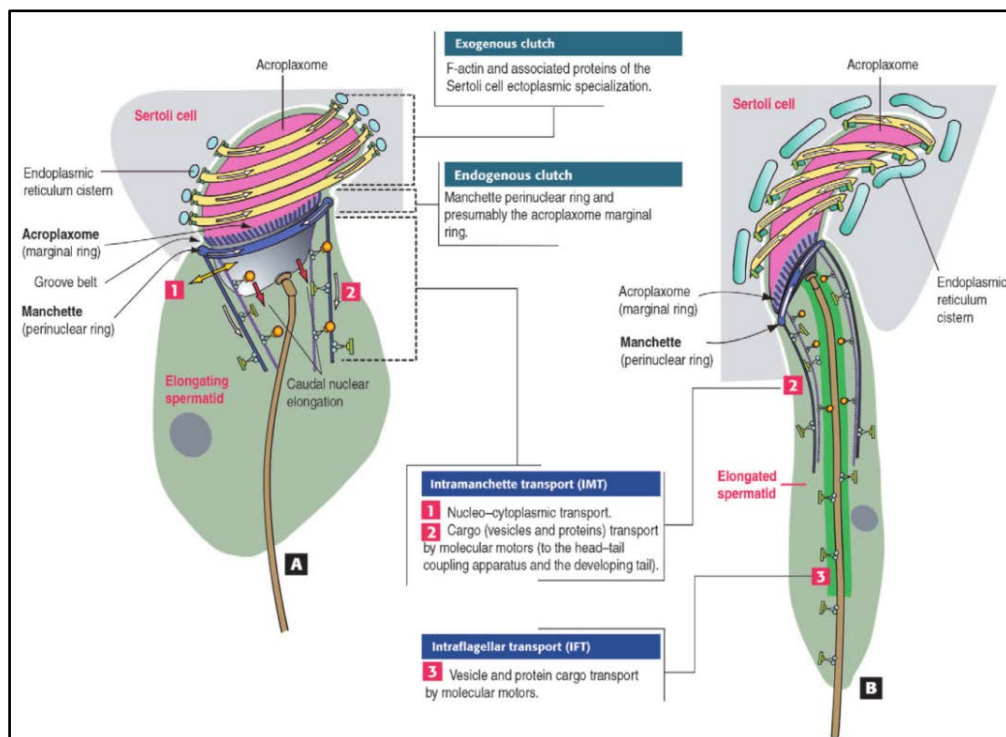


Figura 15. Acción del complejo acrosoma-acroplaxoma-manchette en la elongación de la cabeza de una espermátida. A) El anillo marginal del acroplaxoma junto con el anillo perinuclear de la *manchette* actúan de forma conjunta en la elongación del acrosoma y el núcleo. Se señala la fuerza que hacen los filamentos de actina de la célula de Sertoli situados alrededor de la cabeza de la espermátida para la elongación de su núcleo. También se observa el transporte núcleo-citoplasma y de elementos citoplasmáticos por la *manchette* (1 y 2); B) Espermátida con la cabeza alargada y transporte intraflagelar (3) (Extraído de Kierszenbaum y Tres, 2004).

3.1. El acrosoma

Se puede decir que el acrosoma es el orgánulo más importante del espermatozoide ya que en su interior se encuentran las enzimas hidrolíticas y proteínas clave que permitirán al espermatozoide romper las barreras protectoras del oocito (hacerse paso entre las células de la granulosa y la zona pelúcida) mediante la reacción acrosómica para que se produzca la fecundación (Berruti y Paiardi, 2011).

Como ya se ha explicado en el apartado 2.3.1 de la Introducción, la biogénesis del acrosoma comienza en el aparato de Golgi, donde se forman las vesículas pre-acrosómicas y se transportan hacia la parte anterior del núcleo para fusionarse y formar este orgánulo (Escalier *et al.*, 1991; Ramalho-Santos *et al.*, 2002). Cuando la vesícula redonda del acrosoma hace contacto con el acroplaxoma se alarga (Kierszenbaum *et al.*, 2004).

Se ha sugerido que la proteína miosina-Va, localizada en las vesículas pre-acrosómicas, mediante la interacción con su receptor Rab27a/b, localizado en el acroplaxoma, actúa en el transporte de las vesículas pre-acrosómicas hacia el acroplaxoma a través de los filamentos de actina, al igual que durante su anclaje al acroplaxoma (Seabra *et al.*, 2002; Hayasaka *et al.*, 2008; Harris y Littleton, 2011). También se ha observado la proteína motora *Kinesin-like protein KIFC1* (KIFC1), involucrada en el transporte a través de los microtúbulos de las vesículas derivadas del aparato de Golgi hacia el acrosoma (Yang y Sperry, 2003). Estos estudios sugieren dos vías de transporte de las vesículas hasta el acroplaxoma.

Igualmente, se ha planteado otra hipótesis de formación del acrosoma, la cual se compagina con la biogénesis desde el aparato de Golgi. Entre los que apoyan esta nueva hipótesis están Berruti y Paiardi (2011), que señalan que mediante la vía lisosómica también se forman vesículas que acaban siendo parte del acrosoma. Esta hipótesis está sustentada en la localización de la proteína ubiquitinadora no proteolítica *Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 8* (mUBPy), junto con su receptor *Tyrosine-protein kinase Met* (MET), en la membrana de algunas vesículas pre-acrosómicas, y se continúa localizando en el acrosoma durante todas las fases de su formación (Berruti y Paiardi, 2015). La proteína mUBPy regula la formación de endosomas en la vía lisosómica, así como su transporte mediado por microtúbulos (Nakamura, 2013; Bose *et al.*, 2014). Curiosamente, se ha observado que las proteínas KIFC1 y Rab27a también están asociadas con la vía lisosómica (Raposo *et al.*, 2007; Mukhopadhyay *et al.*, 2011).

En alguna ocasión estos procesos de biogénesis no se producen correctamente, y este hecho es una de las principales causas de infertilidad en el varón. Entre las hipótesis para explicar su incorrecta formación se pueden encontrar:

- El acrosoma en las espermátidas tempranas se desarrolla en el citoplasma, sin anclarse al núcleo, de forma que el núcleo permanece redondeado (Schirren *et al.*, 1971).
- Las vesículas proacrosómicas se forman pero se degradan debido a un incorrecto transporte desde el aparato de Golgi (Bacetti *et al.*, 1997).
- El acrosoma se forma en las espermátidas redondas pero no se encuentra anclado al núcleo y se elimina como un cuerpo residual (Holstein *et al.*, 1973; Chemes y Álvarez-Sedo, 2012).
- Las vesículas proacrosómicas no se fusionan y no se anclan a la envoltura nuclear (Chemes y Álvarez-Sedo, 2012).

3.1.1. Estructura del acrosoma

El acrosoma se encuentra compartimentado, tanto bioquímica como morfológicamente. Tiene una matriz que contiene proteínas solubles y su membrana se divide en dos partes: la Membrana Acrosómica Externa (OAM) orientada hacia la membrana citoplasmática, y la Membrana Acrosómica Interna (IAM), la cual está adosada a la envoltura nuclear (Russell *et al.*, 1990; Yoshinaga y Toshimori, 2003; Oko y Sutovsky, 2009). La matriz del acrosoma ha sido descrita como una sustancia insoluble y electrodensa (Lin *et al.*, 2007) con la función de soporte estructural en la interacción del espermatozoide con el oocito durante la liberación secuencial de las enzimas en la reacción acrosómica (Buffone *et al.*, 2008).

3.1.2. Proteínas del acrosoma

Las proteínas acrosómicas se encuentran distribuidas entre la matriz y las membranas acrosómicas OAM e IAM. En cuanto a las proteínas de la matriz, Guyonnet *et al.* (2012) han caracterizado más de 1000 proteínas como proteasas, hidrolasas, transferasas, etc. (revisión en Toshimori y Eddy, 2015).

En este trabajo se han localizado siguientes las proteínas:

➤ Acrosina

La Acrosina es una proteasa del tipo de las serinas, cuya función es la de romper la zona pelúcida del oocito. Esta enzima, formada por dos cadenas (pesada y ligera) unidas por dos puentes disulfuro, es sintetizada como un zimógeno denominado Proacrosina. La Proacrosina es guardada de esta forma en el acrosoma hasta que se activa en la reacción acrosómica (Nayernia *et al.*, 1994). La Proacrosina es sintetizada desde la fase de paquiteno de la meiosis I, y se incrementa gradualmente su cantidad en el acrosoma durante toda la espermatogénesis (Escalier *et al.*, 1991).

Esta proteína, junto con la *Matrix metalloproteinase 2* (MMP2) involucrada en la ruptura del material extracelular, son las más abundantes en la IAM (Ferrer *et al.*, 2012). No obstante, en el estudio de Guyonnet *et al.* (2012) también se ha localizado Acrosina en la matriz del acrosoma.

➤ Germ cell nuclear factor (GCNF)

La proteína GCNF, también denominada *Nuclear receptor subfamily 6 group A member 1* (NR6A1) o *Retinoid receptor-related testis-specific*

receptor (RTR) pertenece a la subfamilia 6 de receptores nucleares. Entre sus funciones, se ha descrito que es necesaria para el desarrollo embrionario normal del ratón, se expresa en el sistema nervioso en desarrollo, placenta y gónadas embrionarias (Chen *et al.*, 1994, Chung *et al.*, 2001, Lan *et al.*, 2003). También regula la diferenciación de las células de la línea celular germinal en adultos, tanto masculina como femenina (Zechel, 2005).

Concretamente, en el testículo se ha localizado en la heterocromatina de espermátocitos en fase de paquiteno, en el núcleo de espermátidas redondas y en cromosomas condensados durante las divisiones meióticas, disminuyendo su expresión posteriormente (Bauer *et al.*, 1998). Estos perfiles de expresión de *Gcnf* en células germinales sugieren que puede desempeñar papeles críticos en la regulación de la expresión génica durante la gametogénesis de los testículos adultos, reprimiendo la transcripción de los genes *Protamina 1* y *Protamina 2* (Yan *et al.*, 1997; Hummelke y Cooney, 2001), *CREMtau* (Rajkovic *et al.*, 2010) y *Oct4* (Fuhrmann *et al.*, 2001; Gu *et al.*, 2011; Weikum *et al.*, 2016). También se ha observado GCNF en la membrana del acrosoma de espermatozoides maduros, y puesto que después de su capacitación la cantidad de esta proteína desciende, se ha sugerido que puede formar parte del proceso de capacitación (Xu *et al.*, 2004).

➤ *Sperm fertilization protein 56 (sp56)*

La proteína sp56, o *Zona pellucida sperm-binding protein 3 receptor* (ZP3R) fue primeramente descrita por Bleil y Wassarman (1990) como una proteína de reconocimiento de la zona pelúcida del oocito, concretamente de la proteína *Zona pellucida sperm-binding protein 3* (ZP3) durante la reacción acrosómica (Cheng *et al.*, 1994; Bookbinder *et al.*, 1995).

Es una proteína de la matriz del acrosoma, cuya expresión comienza en la fase de paquiteno y continúa durante toda la espermiogénesis, sufriendo modificaciones post-translacionales (Kim *et al.*, 2001).

3.2. El acroplaxoma

El acroplaxoma, siguiendo la explicación previa del punto 3.3.2. de la Introducción, está formado por filamentos de actina y queratina 5 así como por otras proteínas involucradas en la espermiogénesis (revisión en Toshimori y Eddy, 2015). Esta estructura está involucrada en la correcta formación y anclaje del acrosoma a la parte anterior del núcleo y en la

elongación de la cabeza de la espermátida (Kierszenbaum *et al.*, 2003; Kierszenbaum y Tres, 2004).

3.2.1. Estructura del acroplaxoma

El acroplaxoma se divide en dos regiones: la placa del acroplaxoma (también denominada SAL), localizada entre el acrosoma y la envoltura nuclear. Se encuentra unido al núcleo mediante los *Linker of Nucleoskeleton and Cytoskeleton Complex* (LINC), que conectan la envoltura nuclear con los filamentos de actina (Göb *et al.*, 2010; Kierszenbaum *et al.*, 2011), y el anillo marginal. Este último se subdivide en la placa del acrosoma, que une el acroplaxoma a la IAM mediante filamentos intermedios de queratina, y la placa nuclear, que une el acroplaxoma a la envoltura nuclear mediante contactos focales (Fig. 16).

En el anillo marginal también se han localizado las proteínas miosina-Va y Rab27a/b, por lo que se ha sugerido que pueda actuar en la unión entre el acrosoma y los filamentos de actina que forman parte del acroplaxoma (Kierszenbaum *et al.*, 2003; Kierszenbaum *et al.*, 2004). Igualmente, se ha observado que la calcina interactúa con los filamentos de actina, lo que le proporciona rigidez a la estructura (Lecuyer *et al.*, 2000).

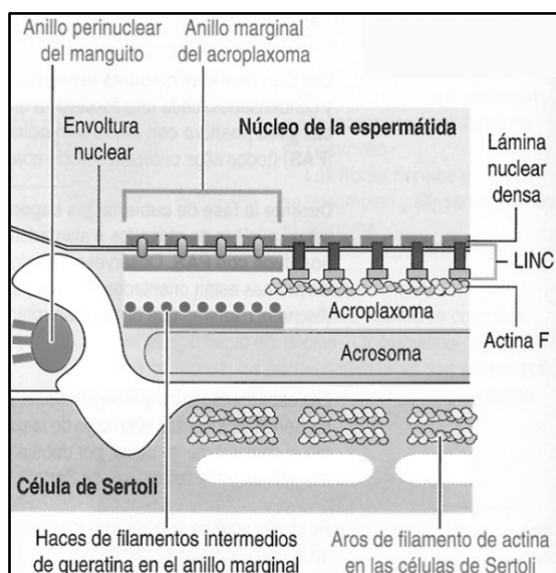


Figura 16. Estructuras que componen el acroplaxoma y la manchette. Se observa el anillo perinuclear de la *manchette*, y la composición del acroplaxoma: los filamentos de actina de la placa unidos a los complejos LINC y los filamentos intermedios de queratina del anillo marginal. Las células de Sertoli contienen filamentos de actina que ayudan a elongar el núcleo (Modificado de Kierszenbaum y Tres, 2016).

3.3. La manchette

La *manchette* es una estructura microtubular transitoria que ocupa una posición perinuclear y regula la elongación del núcleo de las espermátidas (Kierszenbaum y Tres, 2016). Como ya se ha comentado en

el apartado 2.3.2., está compuesto por dos grupos de microtúbulos, los que forman el anillo perinuclear y los que están orientados hacia el centrosoma. Junto a los microtúbulos también hay filamentos de actina.

La correlación que existe entre la correcta formación, la conexión con el núcleo y la localización de la *manchette* con la elongación del núcleo ha sido objeto de varios estudios. En ellos se determina que, en modelos murinos con mutaciones en proteínas relacionadas con los microtúbulos, el núcleo de las espermátidas tiene forma anormal (Kierszenbaum *et al.*, 2011; Lehti y Sironen, 2016), e incluso, cuando la *manchette* está ausente o mal localizado el núcleo tiene forma redondeada (Russell *et al.*, 1991; Lehti y Sironen, 2016).

3.3.1. Transporte intramanchette

Además de participar en la elongación nuclear, otra función de la *manchette* es la del transporte de vesículas no acrosómicas y proteínas necesarias para la correcta elongación nuclear y la formación del flagelo. Este transporte se denomina Transporte *intramanchette* (IMT) (Kierszenbaum *et al.*, 2002; Kierszenbaum, 2002; Kierszenbaum y Tres, 2004) y se produce entre las regiones núcleo-citoplasma y presenta un doble sentido apical-basal.

Al igual que el acroplaxoma, la *manchette* está conectado al núcleo mediante los complejos LINC. La existencia de estas conexiones es crucial para la correcta elongación del núcleo y para el correcto transporte de proteínas entre el núcleo y el citoplasma (Russell *et al.*, 1991; Göb *et al.*, 2010). Así, se ha localizado la proteína motora dineína cerca de la envoltura nuclear, por lo que se ha sugerido que pueda estar relacionada con los complejos LINC, tanto en el transporte núcleo-citoplasma, como en la elongación del núcleo (Göb *et al.*, 2010).

También se ha localizado en la *manchette* la maquinaria Ran-GTPasa (Kierszenbaum *et al.*, 2002; Kierszenbaum, 2002; Kierszenbaum *et al.*, 2011), que actúa durante el transporte núcleo-citoplasmático a través de los complejos del poro de la envoltura nuclear. Igualmente, la proteína motora KIFC1, regulada por la maquinaria Ran-GTPasa, se ha observado, además de asociada a las vesículas derivadas del aparato de Golgi hacia el acrosoma (Yang y Sperry, 2003), asociada también a la nucleoporina NUP62 (Yang *et al.*, 2006; Lehti y Sironen, 2016). De esta manera, se pueden relacionar los transportes de las vesículas pro-acrosómicas, con el transporte núcleo-citoplasma y con el IMT.

Por otro lado, el transporte proteico en el citoplasma se produce por los microtúbulos y los filamentos de actina. Así, el transporte de proteínas y vesículas no acrosómicas se lleva a cabo a través de los filamentos de actina asociado a las proteínas motoras miosina-Va y miosina-VIIa, y a través de los microtúbulos asociado a la proteína motora kinesina (transporte hacia el extremo+) y por la proteína dineína (transporte hacia el extremo-) (Kierszenbaum *et al.*, 2003; Hayasaka *et al.*, 2008) (Fig. 17).

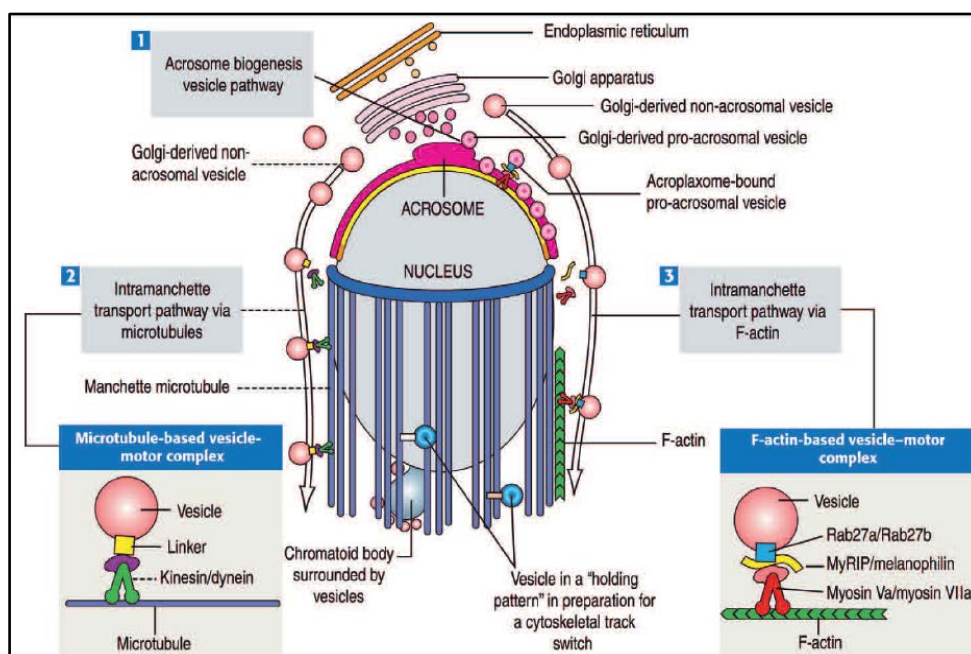


Figura 17. Representación de las vías de transporte a través de la manchette durante la elongación de las espermátidas. 1) transporte de las vesículas proacrosómicas; 2) transporte de vesículas no acrosómicas por los microtúbulos; 3) transporte de vesículas no acrosómicas por los filamentos de actina (*Extraído de Kierszenbaum y Tres, 2004*).

Incluso también se ha sugerido que en esta estructura se almacenan proteínas, entre las que se encuentran las ODFs, necesarias para la formación del flagelo (Hayasaka *et al.*, 2008).

El transporte de proteínas y vesículas a través de los microtúbulos de la manchette continúa por el flagelo ya que, como ya se ha explicado, es necesario para su formación. Se ha sugerido que el transporte intraflagelar (IFT) es similar al IMT, mediante las proteínas motoras kinesina y dineína (Kierszenbaum, 2002; Hayasaka *et al.*, 2008; Kierszenbaum *et al.*, 2011; O'Donnell y O'Bryan, 2014; Lehti y Sironen, 2016).

En resumen, la elongación de la cabeza de las espermátidas es un proceso complejo en el que están involucradas las estructuras

citoesqueléticas acroplaxoma, unido al acrosoma y al núcleo, y la *manchette*, también unido al núcleo. También durante este proceso se producen fuerzas de contracción exógenas en el núcleo por acción de los filamentos de actina de las células de Sertoli. Asimismo, los transportes IMT núcleo-citoplásmico y apical-basal son esenciales para la correcta formación del acroplaxoma, la *manchette* y el flagelo.

4. EL ESTUDIO DE LA INFERTILIDAD MASCULINA

La infertilidad masculina se debe a una espermatogénesis defectuosa (Zhang, 2013), causada, entre otros factores, por afecciones genéticas que pueden afectar al correcto desarrollo del espermatozoide en varios puntos: en la diferenciación de espermatogonia a espermatocito, durante las meiosis o en la espermiogénesis (Toshimori *et al.*, 2004; Marchev *et al.*, 2005; O'Bryan y de Kretser, 2006; Roy *et al.*, 2007; Massart *et al.*, 2012; Coutton *et al.*, 2015; De Braekeleer *et al.*, 2015). Esto puede provocar que los espermatozoides maduros presenten anomalías en su movimiento (astenozoospermia) o en su forma (teratozoospermia), e incluso que no haya producción alguna de espermatozoides (azoospermia) (Tabla 1).

Tabla 1. Tipos de anomalías en los espermatozoides (Modificado de Toshimori *et al.*, 2004).

Nombre	Fenotipo
Sólo células de Sertoli	Sin células germinales
Azoospermia	Sin espermatozoides en el eyaculado
Oligozoospermia	Menos de 20 millones de espermatozoides/ml en el eyaculado
Astenozoospermia	Menos del 50% de los espermatozoides tienen movilidad normal
Teratozoospermia	Menos del 30% de los espermatozoides tienen morfología normal

Hay más de 2300 genes implicados en la espermatogénesis (Massart *et al.*, 2012) y las afecciones genéticas que producen anomalías en los espermatozoides han sido objeto de diversos estudios debido a su importancia en la infertilidad del varón (Chalmel *et al.*, 2012). Estas afecciones son variadas y actúan en numerosos puntos clave de la espermatogénesis (revisión en Toshimori *et al.*, 2004; O'Bryan y de Kretser, 2006; Yan, 2009):

1. La azoospermia se produce por la no diferenciación de cualquiera de las células espermatogénicas.
2. Dentro de las teratozoospermias se encuentran los defectos morfológicos del núcleo y del acrosoma.
3. Los defectos en el flagelo de longitud o de morfología espiral provocan las astenozoospermias.

4. También se pueden producir los defectos de morfología de la cabeza y el flagelo a la vez.

En este trabajo se ha utilizado un modelo murino que presenta globozoospermia, un tipo de teratozoospermia caracterizada por la forma globular de las cabezas de los espermatozoides maduros (Yao *et al.*, 2002; Ito *et al.*, 2004; Yan, 2009; Berruti y Piardi, 2011).

4.1. La Globozoospermia

La globozoospermia fue descrita por primera vez por Schirren *et al.* (1971). Los autores de este estudio postularon que la morfología globular está causada por la ausencia del acrosoma, como consecuencia de su eliminación como un cuerpo residual. Estudios posteriores han determinado que la morfología de estas células está causada por un conjunto de defectos en la biogénesis de su citoesqueleto, lo que provoca núcleos redondos, desorganización de la *manchette* e incluso morfología espiral de los flagelos, además de la incorrecta biogénesis del acrosoma (Escalier, 1990; Yao *et al.*, 2002; Ito *et al.*, 2004; Dam *et al.*, 2007; Yan, 2009; Berruti y Piardi, 2011; Chemes y Álvarez-Sedo, 2012; Lehti y Sironen, 2016).

La globozoospermia total es bastante rara y es más común la globozoospermia parcial, denominada oligoastenoteratozoospermia. Se caracteriza por la presencia de cabezas de espermatozoides ovaladas, morfológicamente similares a las cabezas redondeadas de la globozoospermia total, con acrosomas parcialmente formados, denominados pseudoacrosomas (pAc), y proteínas acrosómicas en menor cantidad que en las células con genotipo silvestre (Dam *et al.*, 2011). También se utiliza como clasificación de los tipos de globozoospermia la “globozoospermia tipo I” y “globozoospermia tipo II” (Anton-Lamprecht *et al.*, 1976) para referirse a la globozoospermia total y a la globozoospermia parcial, respectivamente, pero la clasificación de total o parcial es más utilizada.

Se ha observado el fenotipo globozoospermico en humanos debido a mutaciones en algunos genes, entre los que se encuentran: *Hrb*, *Csnk2a2*, *Gopc* (Christensen *et al.*, 2006), *Spata16* (Dam *et al.*, 2007) y *Pick1* (Liu *et al.*, 2010). También se puede observar globozoospermia en modelos murinos que presentan mutaciones en estos genes:

- o Los espermatozoides de ratones con delección del gen *Csnk2a2* (*catalitic a' subunit of casein kinase II*) tienen cabezas redondeadas y

el acrosoma se puede encontrar separado del núcleo, presente en vesículas proacrosómicas o incluso eliminado (Xu *et al.*, 1999).

- El gen *Pick1* (*protein interacting with C kinase 1*) está involucrado en el transporte de vesículas del aparato de Golgi a la región del acrosoma en las primeras etapas de la espermiogénesis y su delección provoca un fenotipo globozoospermico y una fragmentación del acrosoma (Xiao *et al.*, 2009).

- Los genes *Spata16* (*spermatogenesis-associated 16*) y *Hrb* (*HIV-1 Rev-binding protein*) están asociados a las vesículas proacrosómicas del aparato de Golgi durante la espermiogénesis. Cuando están delecionados, las vesículas proacrosómicas no se fusionan, bloqueando el desarrollo del acrosoma (Kang-Decker *et al.*, 2001).

- El gen *Gopc*, cuya función se explicará en el siguiente apartado. Este gen está conservado en ratones (Cromosoma 10) y en humanos (Cromosoma 6) (Toshimori, 2011).

Debido a la gran homología genética entre ratones y humanos, es posible extrapolar los resultados obtenidos en el estudio de los modelos *knockout* murinos en la espermiogénesis al hombre (Yan, 2009). Los estudios sobre la infertilidad masculina tienen como objetivo conocer las bases metabólicas de estos procesos para poder dar alguna solución a este problema social, pero el estudio de la espermatogénesis en humanos es prácticamente imposible, y es muy difícil utilizar modelos *in vitro* ya que la correcta formación del espermatozoide *in vivo* está regulada hormonalmente (Massart *et al.*, 2012).

4.2. La proteína GOPC

La proteína GOPC (*Golgi-associated PDZ and coiled-coil motif-containing protein*) (Yao *et al.*, 2001) es denominada también con otros nombres en la bibliografía: PIST (*PDZ protein interacting specifically with TC10*) (Neudauer *et al.*, 2001), FIG (*Fused in glioblastoma*) (Chares *et al.*, 2001) y CAL (*CFTR-associated ligand*) (Cheng *et al.*, 2002). Aun así, en este trabajo se le va a llamar GOPC.

Estructuralmente, contiene dos motivos *coiled-coil* con una secuencia de leucina insertada en el segundo motivo, y un dominio PDZ cerca de la región C-terminal (Fig. 18). Los dominios PDZ, muy conservados entre especies, son denominados así ya que se describieron por primera vez en las proteínas PSD-95, *Drosophila* Disc Large y Zona Occludens-1 (Chares *et al.*, 2001; Neudauer *et al.*, 2001; Yao *et al.*, 2001; Cheng *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2006).

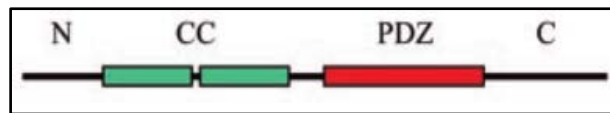


Figura 18. Estructura simplificada de GOPC. Se observan la posición de: el dominio N-terminal (N), los dos motivos *coiled-coil* (CC), el dominio PDZ (PDZ), y el dominio C-terminal (C) (Modificado de Cheng *et al.*, 2002).

Yao *et al.* (2001) le asignaron el nombre de GOPC debido a su localización en el aparato de Golgi en la línea celular COS-7 (células del riñón de mono, *Cercopithecus aethiops*, infectadas con el virus SV40). También observaron que interactúa con la familia proteica *Frizzled* (*frizzled 5* y *frizzled 8*), identificada en un primer momento en *Drosophila sp.* como proteína necesaria para dar polaridad al desarrollo del organismo (Vinson *et al.*, 1989).

No obstante, otros investigadores denominaron a esta proteína PIST, dado que una de las funciones que se le atribuyó es la de interactuar con la proteína TC10, la cual forma parte de la familia Rho-GTPasas. Esta familia proteica actúa en la reorganización del citoesqueleto, la activación de las quinasas y la regulación de la expresión génica. Así, observaron que GOPC regula el tráfico intracelular de TC10 mediante la unión de sus motivos *coiled-coil* a esta proteína. También detectaron la expresión de GOPC en la placenta, hígado, músculo esquelético, riñón, páncreas, pulmón, corazón y cerebro tanto de humano como de ratón (Neudauer *et al.*, 2001; Cheng *et al.*, 2005).

Por su parte, Chares *et al.* (2001) se centraron en el dominio PDZ de esta proteína, descrita como FIG debido a que también fue localizada en extractos de una línea de glioblastoma (Sharma *et al.*, 1989). En este trabajo localizaron GOPC en la red *trans*-Golgi y determinaron que interactúa con la proteína syntaxin-6, de la familia de proteínas SNARE, lo que sugiere que GOPC está involucrada en tráfico vesicular de las vías endocíticas y secretoras, así como en la fusión de membranas.

Siguiendo esta línea, Cheng *et al.* (2002), describieron una proteína homóloga a GOPC en humano que denominaron CAL, por su asociación mediante el dominio PDZ con la proteína *Cistic fibrosis transmembrane regulator* (CFTR). Según este estudio, GOPC regula la expresión de CFTR ya que la sobreexpresión de GOPC suprime tanto la expresión (Gentzsch *et al.*, 2004) como el tráfico de CFTR hacia la superficie de células de mamífero, lo que produce que se degrade en los lisosomas (Cheng *et al.*, 2005). Al igual que Chares *et al.* (2001), localizaron GOPC en la red *trans*-Golgi, pero en células de la tráquea de rata,

colocalizándolo con el marcador del aparato de Golgi TGN38. Y como Neudauer *et al.* (2001), observaron expresión de GOPC en corazón, cerebro, placenta, músculo esquelético, riñón, páncreas, testículo y ovario de humano.

En resumen, los motivos *coiled-coil* y el dominio PDZ le confieren a GOPC la capacidad de interactuar con otras proteínas (Neudauer *et al.*, 2001; Cheng *et al.*, 2002; Cheng *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2006). Asimismo, también parece ser capaz de unirse a proteínas de membrana ya que sus motivos *coiled-coil* y el dominio PDZ le proporcionan la capacidad de asociarse con los propios motivos *coiled-coil* y los dominios PDZ de las proteínas transmembrana del aparato de Golgi (Chares *et al.*, 2001; Cheng *et al.*, 2002; Cheng *et al.*, 2004, Mendes y Kodaek, 2011).

4.2.1. GOPC en la espermiogénesis

En las células espermátogénicas, GOPC actúa durante la biogénesis del acrosoma en el transporte de las vesículas proacrosómicas desde el aparato de Golgi hacia la región perinuclear y su fusión con la vesícula acrosómica en formación.

Durante la espermatogénesis se localiza en un primer momento en la red *trans*-Golgi de los espermátocitos de las espermátidas redondas, y por último, en las espermátidas alargadas es menos abundante en la región *trans*-Golgi que en el resto del citoplasma (Yao *et al.*, 2002).

4.2.2. Ratones *Gopc*^{-/-}

Los primeros defectos detectados en la espermatogénesis de ratones *knockout* para *Gopc* se localizan en las espermátidas redondas, entre los tipos 1-8, en las cuales no se observa la vesícula acrosómica redonda característica, sino fragmentos de ella en forma de vesículas pequeñas. En las espermátidas en elongación estas vesículas pequeñas son más numerosas y no se encuentran unidas al acroplaxoma (Yao *et al.*, 2002). Kierszenbaum *et al.* (2004) denominaron pseudoacrosoma (pAc) a estas vesículas sin fusionar del acrosoma en formación. También se observan fallos en la formación del anillo marginal del acroplaxoma, en la región post-acrosómica de la teca perinuclear y en la *manchette*.

En las espermátidas redondas a partir del tipo 9, el acroplaxoma, la región post-acrosómica y el anillo perinuclear de la *manchette* no se forman correctamente, con los microtúbulos organizados en varias direcciones. Por estas razones no se ancla el acrosoma a la zona

perinuclear y tampoco se produce la elongación de la cabeza del espermatozoide (Fig. 19B) (Kierszenbaum *et al.*, 2004; Ito *et al.*, 2004; Ito *et al.*, 2009).

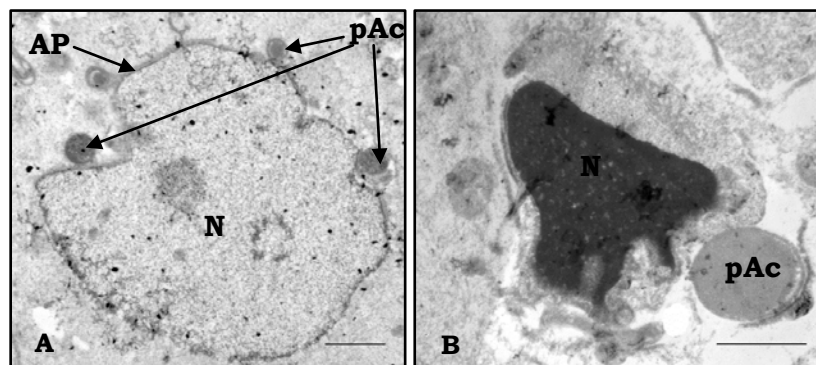


Figura 19. Fotos de microscopía electrónica de transmisión de espermátidas de ratón *Gopc*^{-/-}. A) espermátida redonda; B) espermátida en elongación. Se observa cada núcleo con su pseudoacrosoma situados en la parte anterior de la célula. *N*: núcleo, *pAc*: pseudoacrosoma. Barra 1μm.

También se observa que las especializaciones ectoplasmáticas de unión entre la célula de Sertoli y las espermátidas no están bien formadas (Ito *et al.*, 2004). No obstante, ni las espermatogonias ni los espermatocitos tienen fallos estructurales (Yao *et al.*, 2002). Por otro lado la morfología espiral del flagelo aparece durante la maduración de las espermátidas por su paso por el epidídimo (Suzuki-Toyota *et al.*, 2004; Toshimori, 2011).

Los espermatozoides resultantes de los ratones *Gopc*^{-/-} tienen una forma globular y el flagelo se encuentra rodeando el núcleo (Yao *et al.*, 2002; Ito *et al.*, 2004; Suzuki-Toyota *et al.*, 2004). No obstante, también se han observado en este modelo murino espermatozoides con morfología normal (<5% en semen) (Ito *et al.*, 2009).

Las células espermatogénicas de ratones *Gopc*^{-/-} presentan las siguientes diferencias respecto al fenotipo silvestre:

- Espermatogonias y espermatocitos: normales.
- Espermátidas redondas: pseudoacrosoma, defectos en el acroplaxoma, malformación de la *manchette*.
- Espermátidas en elongación: núcleos grandes, pseudoacrosoma, ausencia de la vaina post-acrosómica, localización errónea de la *manchette*, malformación de las especializaciones ectoplasmáticas.
- Espermatozoides: cabeza globular, desorganización de las mitocondrias en la pieza media, flagelo con forma espiral.

5. LA MICROINYECCIÓN INTRATESTICULAR

La microinyección intratesticular es un procedimiento quirúrgico utilizado en la investigación de la fertilidad masculina *in vivo*. Consiste en la introducción de agentes externos directamente en los túbulos seminíferos para poder estudiar el efecto en la espermatogénesis *in vivo*. Los animales de estudio deben pasar por un proceso quirúrgico, para el cual se necesita sedación, manipulación de los testículos para el procedimiento y finalmente sutura del animal.

Dentro de la técnica, se han descrito varias formas de microinyección intratesticular: directamente en cada túbulo seminífero, directamente en la *rete testis*, que conecta todos los túbulos seminíferos del testículo, y a través de los conductos eferentes que conectan el testículo con el epidídimo (Ogawa *et al.*, 1997).

En 1994, mediante esta técnica se trasplantaron espermatogonias en ratones infértiles. Se observó una recuperación de la espermatogénesis, e incluso de la capacidad de producir descendencia viable (Brinster y Avarbrok, 1994; Brinster y Zimmerman, 1994). Siguiendo esta línea, Hermann *et al.*, (2012) trasplantaron células germinales en monos (*Rhesus sp.*) previamente tratados para la eliminación de las espermatogonias, probando también la recuperación de la espermatogénesis.

Esta técnica quirúrgica también ha sido utilizada en el estudio de otros aspectos de la fertilidad masculina. Se ha llegado a introducir en los túbulos seminíferos complejos de transfección fluorescentes unidos al gen *Spata16*, cuya proteína *Spermatogenesis-associated protein 16* está involucrada en la formación del acrosoma. Se observó transfección positiva en todo el ciclo del túbulo seminífero (Lu *et al.*, 2006). Igualmente, se ha estudiado la Barrera Hemato-Testicular *in vivo*, mediante la microinyección intratesticular de péptido anti-occludina (Chung *et al.*, 2001), anticuerpo anti-integrina (Siu y Cheng, 2004) e incluso inhibidores de metaloproteinasas (MMPs) (Siu *et al.*, 2005), todas ellas proteínas que forman parte de las uniones entre las células de Sertoli y las células de la línea germinal.

Esta técnica, usada en el estudio del comportamiento *in vivo* de las células germinales, puede ser aplicable, por ejemplo, para la obtención de modelos animales sustitutorios de los *knockout*. El uso de animales *knockout* es una herramienta ampliamente utilizada para el estudio de numerosas afecciones. No obstante, no se suele tener en cuenta que la

producción de estos animales con una mutación o delección genética en todas las células del organismo, puede provocar desde letalidad del embrión o neonato, hasta baja tasa de supervivencia de las crías, o incluso un fallo sistémico en el adulto (O'Bryan y de Kretser, 2006). Con todos estos factores unidos al gran coste de tiempo y de dinero que supone para el investigador, es lógico que se busquen otras vías para conseguir modelos animales evitando estos inconvenientes.

También sería posible utilizar esta técnica en la práctica clínica en hombres con deficiencias de fertilidad o en aquellos que han pasado por tratamientos contra el cáncer de testículo (Hermann *et al.*, 2012).

5.1. Anticuerpos para bloquear la acción de proteínas

Como ya se ha comentado, el uso de anticuerpos anti-péptidos se ha utilizado para comprender las bases moleculares en la investigación de la fertilidad masculina, dirigido a proteínas específicas de la línea germinal masculina.

La localización intracelular de anticuerpos afecta a la función normal de la proteína diana de varias formas: impidiendo que la proteína se dirija en el compartimento subcelular en el que realiza su función, bloqueando el sitio activo de la proteína, o afectando indirectamente a cascadas de señalización, entre otros (Lo *et al.*, 2008).

Este método de estudio se ha utilizado en la investigación de diversas patologías como el virus de la Inmunodeficiencia Humana (HIV), sobre el cual se han generado anticuerpos para bloquear la producción de proteínas de su envoltura en las células huésped (Marasco *et al.*, 1993; Lo *et al.*, 2008; Strebe y Schüngel, 2010). En el estudio de enfermedades degenerativas, se ha prevenido y reducido la generación de las acumulaciones tóxicas de los péptidos β -amiloides de la enfermedad de Alzheimer (Panganetti *et al.*, 2005; Strebe y Schüngel, 2010). También se han utilizado en estudios sobre la hiperplasia del músculo esquelético (Whittermore *et al.*, 2003), sobre la osteoclastogénesis (Zhu *et al.*, 2012), o en la investigación de la enfermedad de Behçet (Sugita *et al.*, 2012). Entre los estudios sobre la investigación del cáncer, se ha bloqueado el receptor del factor de crecimiento EGFR en ratones con cáncer, observándose un efecto apoptótico en las células tumorales (Garrido *et al.*, 2011). Igualmente, se ha postulado el uso de anticuerpo anti-caveolin-1 en cáncer de próstata como posible terapia para neutralizar y eliminar la proteína caveolin-1 del nicho tumoral, correlacionada con la progresión del tumor y la metástasis (Kuo *et al.*, 2012). Finalmente, el

uso de anticuerpo para el bloqueo de la proteína *Sphingosine 1-phosphate receptor 3* (S1P3), ha resultado ser un inhibidor del desarrollo del tumor en cáncer de mama (Harris *et al.*, 2012).

5.1.1. Uso de anticuerpos en la investigación de la fertilidad

Los modelos de estudio *in vitro* sobre las bases metabólicas de la espermatogénesis suelen estar centrados en la capacidad de los espermatozoides maduros de fecundar los ovocitos en experimentos de fecundación *in vitro* (FIV). Sin embargo, en los estudios *in vivo* se suele observar el comportamiento de todas las células germinales en conjunto durante el proceso de espermatogénesis.

En estudios de FIV se ha aprovechado la capacidad inhibitoria de los anticuerpos para observar la función de varias proteínas espermáticas en el momento de la fecundación, como el bloqueo con anticuerpos específicos de la proteína acrosómica SP-10, lo que reduce la habilidad de los espermatozoides capacitados de completar la reacción acrosómica (Coonrod *et al.*, 1996).

En los estudios *in vivo* se han introducido anticuerpos directamente en el epitelio seminífero para el bloqueo de proteínas específicas de la espermatogénesis (Chung *et al.*, 2001; Siu y Cheng, 2004). Mancini *et al.* (1974) realizaron uno de los primeros estudios de inyección en los testículos de cobayas, a través de la piel, de suero anti-testicular, obtenido de cobayas inmunizadas contra homogenados de testículo entero. Observaron que este tipo de inyección provocaba infiltración de monocitos en el epitelio seminífero, además del bloqueo de la espermatogénesis.

Igualmente, se ha estudiado mediante esta técnica la acción de las proteínas nectina-2 y 3, laminina γ -3 y N-cadherina en el epitelio seminífero de ratas y ratones. En ambos tipos de animales, cuatro horas tras la microinyección intratesticular de los anticuerpos, se observaron con TEM estructuras únicas con forma de cisternas finas sólo en el citoplasma de los espermatocitos, cuya aparición se ha propuesto que pudiese ser por la fusión de la membrana plasmática (Toyama *et al.*, 2013). Por otro lado, para determinar la función de la proteína *DPY30 domain-containing protein 1* (DYDC1) en la biogénesis del acrosoma, se administró anti-DYDC1 en los túbulos seminíferos de ratón, lo que bloqueó la formación del acrosoma (Li *et al.*, 2009).

Incluso se ha aprovechado la función de los anticuerpos en la inhibición de la fertilidad, con la inyección de un anticuerpo anti-equatorin (proteína localizada en el espermatozoide maduro) en la ampolla del oviducto de ratones hembras, que inhibió la unión de los espermatozoides al óvulo durante la fecundación (Yoshinaga *et al.*, 2001).

Estas dos técnicas juntas, la microinyección intratesticular y la utilización de anticuerpos para el bloqueo de una función proteica determinada, son técnicas que se pueden aplicar en el estudio de la espermatogénesis y la infertilidad masculina *in vivo*. En este trabajo se ha microinyectado un anticuerpo anti-GOPC en los túbulos seminíferos de ratones C57BL/6 a través de los conductos eferentes que conectan el testículo con el epidídimo, con el fin de bloquear la proteína GOPC en la espermiogénesis *in vivo*.

5.2. Contracepción masculina

Actualmente, los métodos de anticoncepción duraderos y reversibles sólo están disponibles para las mujeres, como los anticonceptivos hormonales, entre otros. La contracepción hormonal es uno de los métodos utilizados por mujeres en edad reproductiva (Kimport, 2018), sin embargo, su utilización de manera prolongada puede suponer problemas futuros en la capacidad de embarazo en el momento de dejar de usarla. De esta manera, es obvio asumir que la misma modificación de los niveles hormonales en el hombre provoque, a largo plazo, problemas en la capacidad de producir espermatozoides, e incluso problemas hormonales a corto plazo (Chao *et al.*, 2014). Por estos motivos, actualmente el desarrollo de un método anticonceptivo no hormonal y reversible está siendo objeto de estudio.

Así, los genes o proteínas candidatos que puedan ser excelentes dianas farmacéuticas de posibles anticonceptivos masculinos deberían ser específicos de las células haploides, y de esta manera, la inhibición de estas proteínas tendría efectos secundarios mínimos o nulos en el resto del organismo. Igualmente, orientar el método anticonceptivo a las células germinales haploides conlleva menos riesgos en términos de transmisión a la descendencia de genoma paterno defectuoso en caso de embarazo accidental ya que todos los eventos de recombinación se producen antes de la etapa haploide (Yan, 2009).

La mayoría de los genes relacionados con la espermatogénesis están altamente conservados entre ratones y humanos. Si la creación de ratones *knockout* inactivando un gen espermatogénico produce

infertilidad en ratones, teóricamente el bloqueo de manera específica de los productos de estos genes en los humanos podría resultar en un efecto anticonceptivo (Yan, 2009; Murdoch *et al.*, 2014). Una manera de bloquear la función de una proteína es, como ya se ha comentado, con anticuerpos anti-péptidos. De esta manera, sería posible postular que el bloqueo de una proteína diana pueda usarse en el desarrollo de un método anticonceptivo masculino duradero y reversible, que no involucre la modificación inducida de los niveles de hormonas en el organismo.

La inmunocontracepción masculina es un tipo de anticonceptivo dirigido a los antígenos espermáticos, y cuyo estudio ha dado resultados muy prometedores. Se basa en la capacidad del sistema inmunitario de producir una respuesta inmune a agentes externos, como las proteínas espermáticas. Así, uno de los ejemplos que encontramos en la bibliografía es la inmunización de cobayas macho a la proteína *Hyaluronidase PH-20* (PH-20), localizada en los espermatozoides, lo que provocó infertilidad (Tung *et al.*, 1997; Primakoff *et al.*, 1997). Otra proteína estudiada es Eppin, cuyo bloqueo inhibió la motilidad de los espermatozoides (O´Rand *et al.*, 2004; Yan *et al.*, 2015). Por otro lado, también se ha demostrado que la inmunización de una glicoproteína de espermatozoides provoca infertilidad al producir aglutinados de espermatozoides maduros. Igualmente, la administración de un anticuerpo contra esta glicoproteína también indujo infertilidad en ratas macho y hembras (Bandivdekar *et al.*, 2005; Khobarekar *et al.*, 2008). El objetivo de un anticonceptivo masculino tiene que ser el de suprimir la espermatogénesis o el de producir espermatozoides no funcionales (Murdoch *et al.*, 2014).

II. OBJETIVOS

En la actualidad, la infertilidad es un problema que afecta entorno al 15% de las parejas, de las cuales más de la mitad se atribuyen atribuidos al varón. Los estudios centrados en la espermatogénesis defectuosa se suelen basar en el estudio de proteínas con funciones relevantes en el correcto desarrollo de las células germinales. Es por esto que los modelos experimentales más utilizados suelen ser ratones *knockout* infértiles, con modificaciones en genes importantes durante la espermatogénesis. Sin embargo, la obtención y mantenimiento de los ratones *knockout* suelen presentar varias dificultades, por lo que la obtención de otros modelos de estudio, como por ejemplo mediante el bloqueo directo de la función proteica en el órgano de estudio, sería muy interesante.

La infertilidad masculina tiene un gran impacto social y médico, por lo que la mayoría de los estudios están centrados en conocer y entender sus bases metabólicas para poder desarrollar un tratamiento eficaz, pero también es muy interesante dirigir estas investigaciones hacia la obtención de un método anticonceptivo masculino eficaz, no hormonal, duradero y reversible.

La globozoospermia es un tipo de infertilidad masculina. Se trata de una teratozoospermia, caracterizada por la presencia de cabezas de espermatozoides con morfología redonda. Durante la espermiogénesis de los individuos con esta afección se producen errores en la formación del complejo acrosoma-acroplaxoma-manchette, lo que provoca que la elongación de la cabeza de la espermátida no se desarrolle de manera normal.

Nuestro punto de partida ha sido el estudio de la distribución y expresión de las proteínas acrosómicas Acrosina, GCNF y sp56 en un modelo murino globozoospermico *knockout* para en gen *Gopc*, ya que sospechamos que el comportamiento de las proteínas acrosómicas en la biogénesis del acrosoma puede ser diferente durante una espermatogénesis defectuosa. Estas proteínas tienen funciones muy importantes ya que forman parte del acrosoma desde el momento de su formación, hasta la reacción acrosómica durante la fecundación. También nos hemos propuesto la obtención de un modelo de globozoospermia inducida mediante la microinyección intratesticular de un anticuerpo anti-GOPC en ratones de genotipo silvestre, para determinar si es posible bloquear *in vivo* la acción de la proteína GOPC exclusivamente en las células espermiogénicas.

Por lo tanto, los objetivos de este trabajo son:

Objetivo 1

Realizar un análisis de la espermiogénesis en ratones *Gopc*^{-/-} para observar la distribución y expresión de los componentes acrosómicos en un modelo murino infértil.

Objetivos específicos

- 1.1. Análisis de la distribución de las proteínas acrosómicas Acrosina, GCNF y sp56 mediante su inmunolocalización con microscopía óptica y TEM en ratones *Gopc*^{-/-} en comparación con ratones de genotipo silvestre.
- 1.2. Análisis de la expresión génica y proteica de las proteínas GCNF y sp56 en ratones *Gopc*^{-/-} en comparación con ratones de genotipo silvestre.

Objetivo 2

Validación del método de microinyección intratesticular del anticuerpo anti-GOPC en ratones de genotipo silvestre, para obtener un fenotipo globozoospermico.

Objetivos específicos

- 2.1. Análisis de la distribución de las proteínas Acrosina, GCNF y sp56 entre ratones tras microinyección intratesticular con anti-GOPC, y su comparación con ratones *Gopc*^{-/-} y ratones de genotipo silvestre.
- 2.2. Análisis ultraestructural de la espermiogénesis de ratones tras microinyección intratesticular con anti-GOPC, en comparación con ratones *Gopc*^{-/-} y ratones de genotipo silvestre.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. ANIMALES DE ESTUDIO

Los procedimientos llevados a cabo en este proyecto fueron aprobados por el Comité de Ética para la Experimentación Animal (CEEA) de la Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU): M20/2015/114.

El Animalario de los Servicios Generales de Investigación (SGIker) de la UPV/EHU suministró los ratones C57BL/6 machos adultos. Estos animales se mantuvieron en condiciones de 12 horas luz/oscuridad, así como con agua y comida *ad libitum*.

Los ratones machos con el gen *Gopc* mutado (*knockout*) (No. RBRC01253) fueron facilitados por el Profesor Tetsuo Noda del *Japanese Foundation for Cancer Research* (JFCR) y del *RIKEN BioResource Center* (RIKEN BRC), a través del *National Bio-Resource Project* del Ministerio de Educación, Cultura, Deportes, Ciencia y Tecnología (MEXT, Japón). Estos ratones tienen eliminados los exones 2, 2b y 3 (Yao *et al.*, 2002), y han sido objeto de estudio de varias publicaciones (Yao *et al.*, 2002; Ito *et al.*, 2002; Suzuki-Toyota *et al.*, 2004).

Todos los animales fueron sacrificados mediante dislocación cervical para la extracción de los testículos mediante una incisión abdominal.

A continuación se describirán las técnicas de laboratorio llevadas a cabo en este estudio con las muestras de testículo de ratones C57BL/6, *Gopc^{-/-}* y con microinyección intratesticular de anti-GOPC. La composición de los reactivos y los equipos utilizados están detallados en los Anexos 2 y 3, respectivamente.

2. MICROSCOPIA ÓPTICA

2.1. Fijación, inclusión y cortes

En primer lugar, los testículos se fijaron en la solución de Bouin (Anexo 2.1.) durante cuatro horas, después se lavaron con etanol al 50% durante dos días y se deshidrataron mediante concentraciones crecientes de etanol con el equipo *Shandon Citadel™ 1000 Tissue Processor* (Thermo Scientific). Después, se incluyeron en parafina con el equipo *Shandon Histocentre 2 Tissue Embedding Center* (Thermo Scientific) y se cortaron en secciones de 4µm de grosor con el microtomo *Shandon Finesse 325* (Thermo Scientific), que se depositaron sobre portaobjetos previamente tratados con *Poly-L-lysine Solution 0,1% (p/v) in H₂O* (Sigma-Aldrich) al 10%. Las secciones se secaron en una estufa a 37°C durante la noche.

2.2. Tinción del Ácido Peryódico-Schiff

La tinción del Ácido Peryódico-Schiff (PAS) es una técnica específica para la detección al microscopio óptico de una elevada concentración de polisacáridos. Estos se tiñen de color rosa por acción de los dos reactivos principales: el Ácido Peryódico transforma los grupos hidroxilo de los sacáridos unidos a las proteínas en aldehídos, y el Reactivo de Schiff después reacciona con estos grupos aldehídos, resultando el color rosa. Los núcleos se ven de color azul debido a la tinción con hematoxilina, que se une a los grupos ácidos de la cromatina (Esteban-Ruiz *et al.*, 2009).

Después de desparafinar e hidratar las secciones, se incubaron con Ácido Peryódico al 1% (Panreac) durante cinco minutos y tras un lavado con agua destilada, cada sección se incubó con el reactivo de Schiff (Merck Millipore) durante 30 minutos. Se realizó un lavado de cinco minutos en agua caliente, se contrastó con hematoxilina de Mayer (Merck Millipore) durante un minuto. Finalmente, las secciones se deshidrataron mediante concentraciones decrecientes de etanol en el equipo *Varistain 24-4* (Thermo Scientific) y se cubrieron con un cubreobjetos usando DPX (Sigma-Aldrich).

2.3. Inmunohistoquímica para microscopía óptica

Las técnicas inmunohistoquímicas para microscopía óptica utilizan anticuerpos específicos para detectar proteínas *in situ* en secciones de

cualquier muestra de tejido. Esta localización es visible al microscopio óptico gracias al uso de cromógenos, productos insolubles coloreados, normalmente de color marrón o rojo (Guembe-Echarri, 2009).

Con el objetivo de desparafinar el tejido y desenmascarar los antígenos, las secciones de tejido se trataron con la solución *10% Heat Mediated Antigen Retrieval Solution pH 6,0* (Abcam) diluida al 1% a 98°C durante 20 minutos. Después se incubaron con H₂O₂ diluido en *Phosphate Buffer Saline* (PBS) al 3%, durante 30 minutos para el bloqueo de la peroxidasa endógena. Se permeabilizó el tejido con PBS-Triton100X al 0,1% (PBTx) durante 10 minutos, y se bloquearon las uniones inespecíficas con un suero de bloqueo compuesto por *Bovine Serum Albumina* (BSA) 1mg/ml y *Normal Goat Serum* (NGS) al 10%, disueltos en PBTx, durante una hora. Las secciones se incubaron durante toda la noche a 4°C con los anticuerpos primarios, diluidos en el mismo suero de bloqueo. Después, se incubó con el anticuerpo secundario disuelto en el suero de bloqueo, durante dos horas y a temperatura ambiente (RT^a). Cuando el anticuerpo secundario estaba biotinilado las muestras se incubaron con *ABC kit Peroxidase Standard* (Vectastain) (Tabla 2). Como control negativo se emplearon secciones en las que no se incubó con el anticuerpo primario.

Tabla 2. Anticuerpos primarios y secundarios para inmunohistoquímica en microscopía óptica.

Anticuerpos	Concentración	Referencia
Anticuerpos Primarios		
Rabbit anti-Acrosin	9,3µg/ml	TA323228, ORIGENE
Rabbit anti-GCNF	33µg/ml	MBS246731, MyBioSource
Mouse anti-sp56	13,4µg/ml	55101, QED BioScience
Anticuerpos Secundarios		
Goat Anti-rabbit-biotin • ABC kit Peroxidase Standard	90µg/ml 10µl/ml	B8895, Sigma PK-4000, Vectastain
Goat Anti-mouse-HRP	10µg/ml	A0412, Sigma

Para la visualización del marcaje positivo en color marrón se utilizó el Kit Solution DAB (Invitrogen, Thermo Scientific) que tiene como cromógeno 3,3-diaminobenzidine (DAB). Asimismo, se realizó una coloración de contraste con hematoxilina para diferenciar los núcleos de

las diferentes células. Las secciones se deshidrataron mediante concentraciones decrecientes de etanol en el equipo Varistain 24-4 (Thermo Scientific) y se montaron con DPX (Sigma-Aldrich).

2.4. Obtención de las imágenes

Las preparaciones se observaron con un microscopio óptico *Olympus BX50*, y se fotografiaron con una cámara *Olympus XC50* y el programa informático Cell^A (Olympus Soft Imaging Solutions).

3. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN

La inmunohistoquímica para Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) se utiliza para determinar la localización ultraestructural de las proteínas en muestras incluidas en resina. Esta localización se observa en forma de puntos negros debido al oro coloidal, el cual está unido a los anticuerpos secundarios. Estas partículas de oro son fácilmente visibles al TEM ya que tienen propiedades electrodensas (Guembe-Echarri, 2009).

3.1. Fijación

La fijación del tejido se realizó mediante inmersión en glutaraldehído al 2% durante cuatro horas y posterior incubación con NH₄Cl durante una hora para bloquear la unión de los anticuerpos a los grupos aldehído.

3.2. Inclusión en resina y cortes ultrafinos

El tejido se incluyó en Lowicryl[®] K4M (Sigma-Aldrich) siguiendo el protocolo de Altman *et al.* (1984). Las secciones de tejido se deshidrataron en concentraciones crecientes (50%, 75%, 90% y 100%) de Dimetil-formamida (DMF), durante 25 minutos cada una. A continuación, se comenzó la inmersión en resina, primero sumergiendo las secciones del tejido en concentraciones de Lowicryl:DMF, en relaciones de 1:2, 1:1 y 2:1, cada una durante 30 minutos, para evitar la degradación del tejido durante la inclusión. Finalmente se incubó con Lowicryl al 100% durante 45 minutos. Se expuso la resina en forma de bloques, con el tejido incluido en ella, durante las primeras 24 horas a -20°C bajo luz ultravioleta y después seis días sólo con luz ultravioleta para su solidificación.

Posteriormente, ya con los bloques solidificados, se realizaron cortes semifinos para observar y seleccionar la región de interés con la que realizar los cortes ultrafinos. Para ello, los cortes semifinos, depositados sobre portaobjetos, se tiñeron con Azul de Toluidina y se montaron con DPX (Sigma-Aldrich). Tras seleccionar la zona de interés de cada bloque de Lowicryl, se realizaron secciones ultrafinas de 70nm de grosor con un ultramicrotomo *Leica Ultracut UCT* (Leica), que se depositaron sobre rejillas de níquel de 200Mesh (Gilder Glids), previamente tratadas con *0,25% Formvar Solution* (Electron Microscopy Sciences).

3.2. Inmunohistoquímica para TEM

Las incubaciones de las secciones se realizaron en placas de Terasaki y para manipular las rejillas se utilizaron unas pinzas para microscopía electrónica (Electron Microscopy Sciences).

Las secciones se permeabilizaron con PBTx durante 10 minutos y seguidamente se incubaron con el suero de bloqueo formado por BSA 1mg/ml y NGS al 10% en PBTx durante una hora para el bloqueo de las uniones inespecíficas. Después, se incubaron con los anticuerpos primarios en las diluciones adecuadas en el mismo suero de bloqueo durante toda la noche a 4°C. Tras tres lavados de cinco minutos cada uno con PBTx, se incubó con el anticuerpo secundario disuelto en el suero de bloqueo, durante dos horas y a RT^a (Tabla 3). Como control negativo se emplearon secciones en las que se obvió la incubación con el anticuerpo primario.

Tabla 3. Anticuerpos primarios y secundarios para inmunohistoquímica en TEM.

Anticuerpos	Concentración	Referencia
<i>Anticuerpos Primarios</i>		
Rabbit anti-GCNF	100µg/ml	MBS246731, MyBioSource
Mouse anti-sp56	0,6mg/ml	55101, QED BioScience
<i>Anticuerpos Secundarios</i>		
Goat Anti-rabbit (15nm Gold)	0,19µg/ml	ab27236, Abcam
Goat Anti-mouse (15nm Gold)	0,34µg/ml	ab202673, Abcam

Finalmente, las secciones se contrastaron mediante la precipitación de metales pesados con el fin de poder visualizar algunas de las estructuras celulares, de manera que las membranas celulares sean más electrodensas (De Paul *et al.*, 2012).

3.3. Contraste del tejido

El contraste negativo de las secciones se realizó mediante incubaciones consecutivas en atmósfera anhidra, para evitar la formación de precipitados, con:

1. Acetato de uranilo durante 15 minutos y dos lavados sucesivos en H₂O Mili-Q.

2. Citrato de plomo durante 10 minutos con cinco lavados sucesivos en H₂O Mili-Q. El Citrato de Plomo se elaboró según el método de Reynolds (Anexo 2.2.).

3.4. Obtención de las imágenes

Las rejillas se observaron mediante un TEM *Philips EM208S* y una cámara *Morada* (Olympus Soft Imaging Solutions). El análisis de las imágenes se realizó con el programa informático FIJI (ImageJ).

4. BIOLOGÍA MOLECULAR

4.1. Western Blot

Esta técnica se utiliza para la detección de proteínas de una muestra totalmente homogeneizada. Se basa en separar las proteínas de la muestra en función de su peso molecular con una electroforesis en condiciones desnaturizantes y reductoras, a continuación se transfieren las proteínas ya separadas a una membrana, donde se localizan las proteínas de interés mediante la incubación con anticuerpos específicos.

4.1.1. Extracción y cuantificación de proteína

Se extrajo proteína de testículos enteros. La muestra se homogeneizó con el tampón de lisis celular *RIPA Buffer* (Sigma-Aldrich) y un cóctel de inhibidores de proteasas contra serina, cisteína, y metaloproteasas (Sigma-Aldrich) (Anexo 2.3.), a una concentración de 100µl de inhibidores de proteasas por un mililitro de *RIPA Buffer*. Tras dejar actuar durante 20 minutos, las muestras se sonicaron con el sonicador *Sonopuls Ultrasonic homogenizers* (Bandelin). La muestra se centrifugó a 13000rpm y se recuperó el sobrenadante. El extracto proteico obtenido se almacenó a -20°C.

La concentración de proteína de cada muestra se determinó mediante el ensayo del Ácido bicinonínico (BCA). Este ensayo es un método colorimétrico muy sensible que permite determinar la concentración de proteínas de una muestra mediante espectrofotometría. Se basa en la capacidad del Reactivo de cuantificación, BCA junto con el Sulfato de cobre (CuSO₄), de reaccionar con las proteínas y formar un complejo de color púrpura, con un máximo de absorbancia a 562nm. Esta absorbancia es directamente proporcional a la concentración de proteína en una muestra.

Para calcular la concentración de proteína se utilizó como referencia una recta patrón de BSA, formada por diluciones de concentración creciente desde una concentración inicial de 1mg/ml. Las diluciones de la recta patrón de BSA y las muestras (diluidas a la mitad en H₂O Mili-Q) se mezclaron con el Reactivo de cuantificación, a una concentración de 50:1. A continuación, se incubó esta mezcla a 37°C durante 30 minutos en un *TS1 ThermoShaker* (Biometra), lo que permite que el reactivo actúe sobre las proteínas y cambie de color: si hay poca cantidad de proteína el color será verde mientras que si hay mucha será

púrpura. Después de la incubación se leyeron las absorbancias a 562nm con el lector *Synergy HT* (BioTek) y el software Gen5 (BioTek). Finalmente, se obtuvo un gráfico de dispersión con las absorbancias de la recta patrón de BSA y, mediante la extrapolación de los datos de las absorbancias de las muestras, se determinó la concentración de proteína total de cada una.

4.1.2. Electroforesis

Las distintas extracciones proteicas se mezclaron con el tampón de carga de Morris al 1X (Anexo 2.3.) cuya función es la de deshacer la configuración terciaria de las proteínas y cargarlas negativamente. Se calentaron durante 10 minutos a 95°C para la desnaturalización de las proteínas en un *TS1 ThermoShaker* (Biometra) y se separaron mediante electroforesis en un gel de SDS-Poliacrilamida al 10% (Anexo 2.3.), a una concentración de 30µg de proteína por calle. La electroforesis se llevó a cabo a 120V durante 45 minutos en tampón de electroforesis 1X (Anexo 2.3.).

4.1.3. Transferencia

Las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa *Whatman™* de 0,2µm de poro (LifeSciences) en tampón de transferencia (Anexo 2.3.) con un Amperaje constante de 0,36A durante tres horas. Para su verificación se tiñeron las membranas con Rojo Ponceau (Anexo 2.3.). A continuación, se bloquearon las uniones inespecíficas con BSA al 5% en TBS-Tween20 al 0,1% (TBS-T) durante una hora y después se incubaron los anticuerpos primarios durante toda la noche a 4°C. Tras tres lavados de 10 minutos con TBS-T, se incubó con anticuerpo secundario (Tabla 4), diluido en BSA al 5% en TBS-T durante dos horas a RT^a.

Tras la eliminación del marcaje de cada anticuerpo primario mediante la incubación con el tampón de *Stripping*, se utilizó la proteína α-tubulin como control endógeno.

Tabla 4. Anticuerpos primarios y secundarios para Western Blot.

Anticuerpos	Concentración	Referencias
Anticuerpos Primarios		
Rabbit anti-GCNF	2µg/ml	MBS246731, MyBioSource
Mouse anti-sp56	4µg/ml	55101, QED Bioscience
Mouse anti-α-tubulin	1,5µg/ml	T5168, Sigma-Aldrich
Anticuerpos Secundarios		
Goat Anti-rabbit-HRP	0,1µg/ml	S2030, SantaCruz
Goat Anti-mouse-HRP	0,2µg/ml	S2004, SantaCruz

4.1.4. Obtención de las imágenes

Las membranas se revelaron con el sustrato *LuminataTM Crescendo Western HRP* en una G:BOX (Syngene) y las imágenes fueron capturadas con el software GeneSnap. Las imágenes fueron procesadas con el programa informático FIJI (ImageJ).

4.2. Reacción en Cadena de la Polimerasa Cuantitativa con Transcripción Inversa

La Reacción en Cadena de la Polimerasa Cuantitativa con Transcripción Inversa (RT-qPCR) se ha utilizado para determinar la cantidad de RNA transcrito de un gen específico en las muestras.

La RT-qPCR es una variante de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) convencional en la que las hebras de RNA son retrotranscritas a DNA complementario (cDNA) mediante la enzima Transcriptasa inversa. A continuación, este cDNA es amplificado por la enzima *Taq* polimerasa (la DNA polimerasa de la bacteria termófila *Thermus aquaticus* descubierta por Chien *et al.*, 1976) mediante una serie de cambios de temperatura, llamados ciclos. También se necesitan un par de cebadores complementarios del gen que se amplifica, denominados *forward primer* y *reverse primer*, los desoxirribonucleótidos (dNTPs) para la formación de las copias de DNA, y un tampón de reacción con un fluorocromo que permita medir, a la longitud de onda apropiada, la generación de los productos en un termociclador con sensores para medir fluorescencia.

4.2.1. Extracción del RNA

Se extrajo el RNA total de testículos incluidos en parafina de ratones C57BL/6 y *Gopc*^{-/-} (inclusión descrita en el punto 2.1.) con el *FFPE RNA Purification Kit* (Norgen Biotek Corp.), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se determinó la concentración de RNA extraído a una absorbancia de 260nm, y su pureza, con el *Nanodrop Synergy HT* (BioTek) en el lector *Synergy HT* (BioTek) y el software Gen5 (BioTek).

4.2.2. Obtención del cDNA

Para obtener el cDNA correspondiente al RNA se realizó una retrotranscripción utilizando el kit *iScript™ cDNA Synthesis Kit* (BIO-RAD), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para ello se mezclaron 730ng de RNA de cada muestra con 4µl de *5x iScript Reaction Mix*, 1µl de *iScript reverse transcriptase* y H₂O DEPC hasta un volumen final de 20µl. La reacción se llevó a cabo en un termociclador *C1000™ Thermal Cycler* (BIO-RAD) con el protocolo de la Tabla 5. El producto final se almacenó a -20°C.

Tabla 5. Protocolo de reacción de retrotranscripción.

Paso	Tiempo	Temperatura
Comienzo	5 min	25°C
Retrotranscripción	20 min	46°C
Inactivación de la transcriptasa inversa	1 min	95°C
Final	∞	4°C

4.2.3. Preamplificación del cDNA

El RNA extraído de tejido suele estar muy fragmentado, lo que implica que el cDNA que se obtiene es muy pequeño para poder realizar una Reacción en Cadena de la Polimerasa Cuantitativa (qPCR). Por este motivo se realizó previamente a la qPCR una pequeña amplificación del cDNA con el kit *Platinum® Multiplex PCR Master Mix 2X* (Applied Biosystems), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para ello se mezclaron 0,15µg del cDNA de cada muestra con 5µl del *primer mix* (el cual está compuesto por 0,5µM de cada cebador) a una concentración final de 50nM/cebador, 25µl de *Multiplex Mix* y H₂O DEPC hasta un volumen final de 50µl. La reacción (Tabla 6) se llevó a cabo en un termociclador *C1000™ Thermal Cycler* (BIO-RAD).

Tabla 6. Protocolo de la *Multiplex*.

Paso	Tiempo	Temperatura
Comienzo	2 min	95°C
14 ciclos de amplificación	30s	95°C
	90s	60°C
	30s	72°C
Mantenimiento	10 min	72°C
Final	∞	4°C

Para realizar la amplificación del cDNA se diseñaron cebadores específicos para *Gcnf*, *Sp56* y el control endógeno *Rps15* (40S ribosomal protein S15) (Tabla 7). El diseño se realizó con el programa *Primer Designing Tool* (NCBI).

Tabla 7. Secuencias de los cebadores (*Forward* y *Reverse*) de cada gen.

Gen		Secuencia (5' a 3')
<i>Gcnf</i>	Forward	CATCCAGTAGGTCTGTGGA
	Reverse	GGCACTGACATCCCCATGTA
<i>Sp56</i>	Forward	GAATAGTGAGCAGAGGCGCA
	Reverse	AGCTTGACACCTTCAGGGC
<i>Rps15</i>	Forward	CCGAGTAACCGCCAAGATGG
	Reverse	TTGCTCATAGGACATGTCTGA

El producto final se diluyó con H₂O DEPC a una dilución final 1:5 y se almacenó a -20°C.

4.2.4. Reacción en Cadena de la Polimerasa Cuantitativa

Para la realización de la qPCR se utilizó el kit *Power SYBR[®] Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems), que está compuesto por dNTPs, *iTaq* polimerasa, MgCl₂, y el fluorocromo *SYBR[®] Green*. Para cada reacción, llevadas a cabo en placa de 96 pocillos, se emplearon 5µl de *SYBR[®] Green Mix*, 0,2µl de *Forward primer* y *Reverse primer* a una concentración final de 0,1µM y 4,8µl de cada muestra a una dilución final 1:10 respecto del producto obtenido de la *Multiplex*. Cada gen con cada muestra se amplificó por triplicado. Se utilizaron como controles negativos el cDNA de cada muestra sin los cebadores y cada par de cebadores sin la muestra.

La reacción (Tabla 8) se llevó a cabo en un termociclador *CFX96™* (BIO-RAD).

Tabla 8. Protocolo de la qPCR.

Paso	Tiempo	Temperatura
Comienzo	10 min	95°C
40 ciclos de amplificación	15s	95°C
	60s	60°C

4.2.5. Análisis de la amplificación

Tras obtener los ciclos de amplificación de cada gen (C_T) con el software *CFX Manager™* (BIO-RAD), se relativizaron los ciclos de cada gen con su control endógeno (ΔC_T) en cada tipo de ratón y las diferencias de expresión relativa de cada gen entre ratones *Gopc^{-/-}* y ratones C57BL/6 con el método $2^{-\Delta C_T}$ (Schmittgen y Livak, 2008).

5. DETERMINACIÓN DE LOS ESTADIOS DEL CICLO DEL TÚBULO SEMINÍFERO DE RATÓN

Como ya se ha comentado, la primera clasificación de los tipos celulares en el túbulo seminífero de ratones fue propuesta por Oakberg (1956). Posteriormente, Russell, Ettlín, Sinha-Hikim y Clegg en el libro *Histological and Histopathological Evaluation of the Testis* (1990) realizaron el esquema mencionado en el apartado 2.3. de la Introducción. Igualmente, Meistrich y Hess, en el libro *Spermatogenesis: Methods and Protocols* (2013) elaboraron una guía para ayudar a reconocer los estadios del túbulo seminífero, observando las características morfológicas de los tipos celulares (Fig. 20).

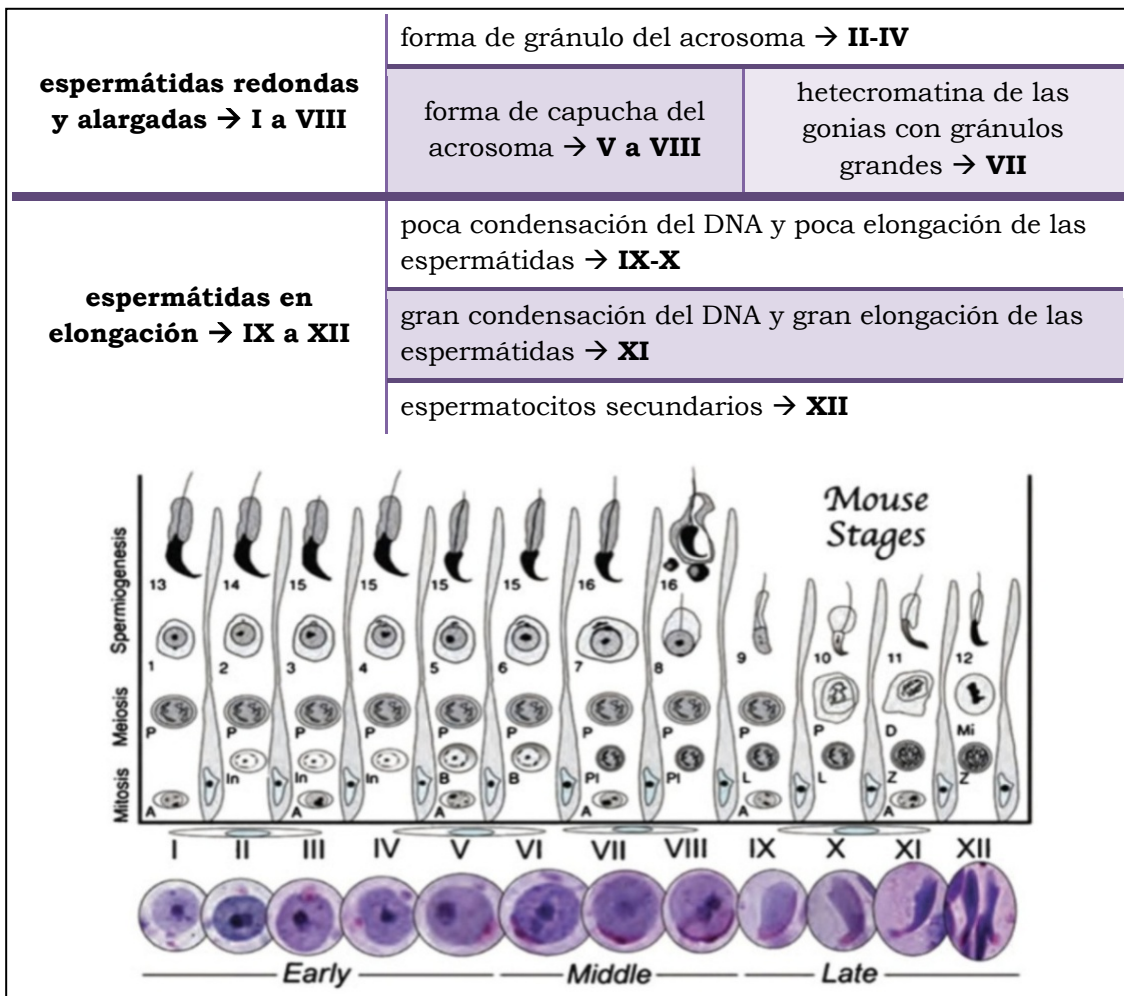


Figura 20. Guía para la identificación de los estadios del túbulo seminífero de ratón en función de las características morfológicas de cada tipo celular. Debajo de cada estadio de la tabla se observan las espermátidas durante la espermiogénesis con una tinción PAS (Modificado de Meistrich y Hess, 2013).

De esta manera, con la tinción PAS en un corte histológico de testículo de ratón es posible ver los cambios en la forma del núcleo y del acrosoma durante el desarrollo de las células espermáticas y diferenciar los estadios (Fig. 21).

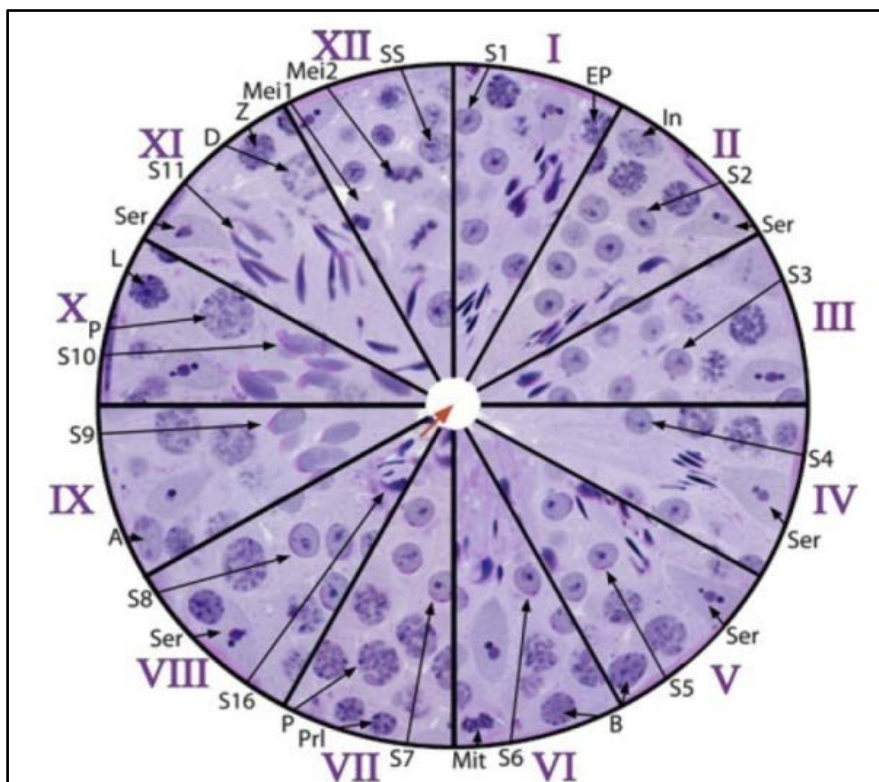


Figura 21. Representación de un túbulo seminífero de ratón con todos los estadios del ciclo con una tinción PAS. Por ejemplo, el estadio V del túbulo seminífero del ratón está formado por las espermatogonias del tipo B (B), espermatocitos en fase de paquiteno, espermátidas redondas del tipo 5 (S5) y espermátidas alargadas del tipo 15. (Meistrich y Hess, 2013).

Igualmente, para la identificación de los tipos celulares mediante TEM, se utiliza a la vez que el esquema de la Figura 20 los criterios específicos detallados en la siguiente tabla extraída del libro *Histological and Histopathological Evaluation of the Testis* (1990) (Tabla 9).

Tabla 9. Criterios para distinguir los tipos celulares en cada estadio del ciclo del túbulo seminífero en ratones (Modificado de Russell et al., 1990).

Estadio	Criterios
I	<ul style="list-style-type: none"> ○ No se observan espermatogonias en la base del epitelio. ○ En espermátidas redondas del tipo 1 no se observa vesícula acrosómica adherida al núcleo.
II-III	<ul style="list-style-type: none"> ○ La heterocromatina de las espermatogonias intermedias está localizada cerca de la membrana nuclear. ○ La vesícula acrosómica es redonda y esta acoplada al núcleo.
IV	<ul style="list-style-type: none"> ○ La vesícula acrosómica se aplana encima del núcleo.
V	<ul style="list-style-type: none"> ○ La heterocromatina de las espermatogonias del tipo B forma gran cantidad de pequeños gránulos. ○ La vesícula acrosómica comienza a elongarse. ○ En las espermátidas del tipo 15 las mitocondrias se posicionan en el cuello del flagelo.
VI	<ul style="list-style-type: none"> ○ La heterocromatina de las espermatogonias forma gránulos grandes. ○ El acrosoma continúa alargándose, ocupando casi la mitad de la célula.
VII	<ul style="list-style-type: none"> ○ La heterocromatina de los espermatocitos en preleptoteno forma gránulos pequeños. ○ El acrosoma ocupando más de la mitad de la célula.
VIII	<ul style="list-style-type: none"> ○ El núcleo de los espermatocitos en preleptoteno se redondea y la heterocromatina ocupa todo el núcleo. ○ El núcleo de las espermátidas del tipo 8 hace contacto con la membrana celular y ya se observa el axonema. ○ Se elimina todo el citoplasma de las espermátidas del tipo 16.
IX	<ul style="list-style-type: none"> ○ El núcleo de los espermatocitos en leptoteno se hace más grande. ○ En los espermatocitos en paquiteno se distingue el cuerpo XY. ○ El núcleo de las espermátidas del tipo 9 comienza a elongarse. ○ No se observan espermátidas del tipo 16.
X	<ul style="list-style-type: none"> ○ En los espermatocitos en leptoteno hay más heterocromatina. ○ En los espermatocitos en paquiteno el núcleo se agranda y hay poca heterocromatina. ○ En las espermátidas del tipo 10 la cromatina comienza a condensarse.
XI	<ul style="list-style-type: none"> ○ En los espermatocitos en diploteno el núcleo se hace más grande y hay poca heterocromatina. ○ En las espermátidas del tipo 11 el núcleo se hace más alargado.
XII	<ul style="list-style-type: none"> ○ Se pueden encontrar espermatocitos en meiosis II. ○ En las espermátidas del tipo 12 la cromatina está casi totalmente condensada y el acrosoma totalmente alargado.

Como ya se ha explicado en la Introducción, la proteína GOPC actúa durante el transporte de las vesículas proacrosómicas desde la red *trans*-Golgi hasta la parte anterior del núcleo, donde se fusionan para formar el acrosoma. Los ratones *Gopc*^{-/-} son infértiles porque no se forma el acrosoma (Fig. 19A y B), junto con defectos estructurales de la *manchette* para la elongación de la cabeza de las espermátidas, lo que resulta en espermatozoides globozoospermicos. Hay que destacar que debido a estos fallos en la espermiogénesis en ratones *Gopc*^{-/-}, no es posible fijarse solamente en las espermátidas en elongación por lo que ha sido necesario observar todos los tipos celulares de cada estadio en su conjunto. Por ejemplo, en el *Gopc*^{-/-} la estructura del acrosoma en la espermátida tipo 5 es muy semejante a la espermátida de tipo 3, y el núcleo de las espermátidas en elongación tiene una forma anormal (Fig. 22). No obstante, las espermatogonias y espermatoцитos son similares a los del genotipo silvestre.

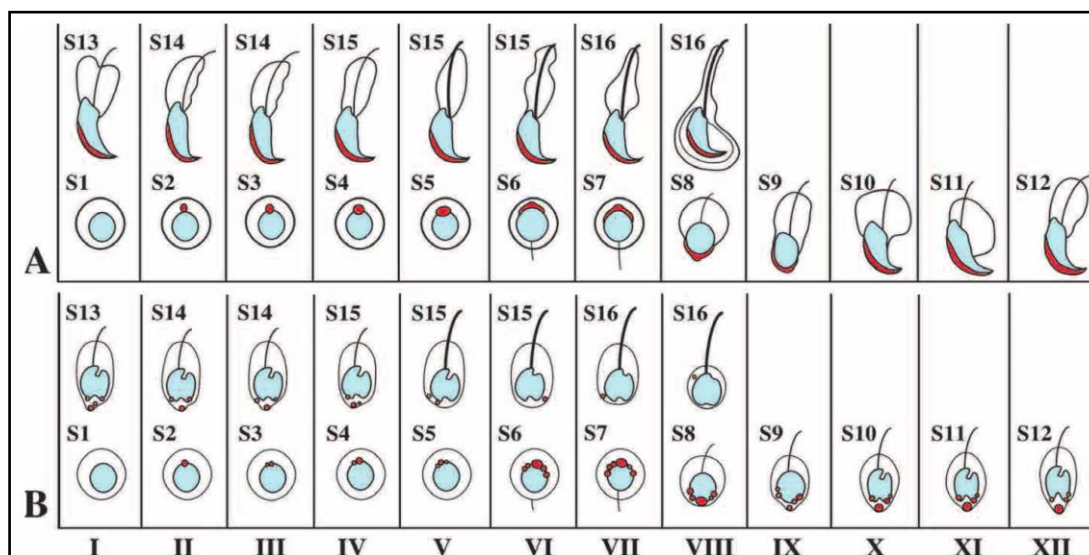


Figura 22. Comparación de los tipos de espermátidas en cada estadio de la espermiogénesis entre ratones de genotipo silvestre y *Gopc*^{-/-}. El bloque A corresponde a la espermiogénesis de genotipo silvestre y el B a ratones *Gopc*^{-/-}. Se observan los núcleos en azul, los acrosomas y pseudoacrosomas en rojo (Ito et al., 2004).

6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se realizó utilizando el programa *GraphPad Prism5* (San Diego, California, EEUU).

Se analizó el tipo de distribución de los datos mediante el test de Shapiro-Wilk. Todos los datos no seguían una distribución Normal, por lo que se llevaron a cabo pruebas no paramétricas (Martínez-González *et al.*, 2014; Toledo *et al.*, 2014).

La media y el error estándar de la media (SEM) se obtuvieron de todos los datos y se expresaron como media \pm SEM. Las diferencias estadísticamente significativas se consideraron cuando $p < 0,05$ (*), las diferencias altamente significativas cuando $p < 0,01$ (**) y las diferencias muy significativas cuando $p < 0,001$ (***) .

6.1. Inmunohistoquímica para TEM

Para determinar si existen diferencias en cuanto a la expresión y distribución proteica de GCNF y sp56 durante la espermatogénesis de ratones C57BL/6 y *Gopc^{-/-}*, se analizaron varios tipos celulares (Tabla 10), que son representativos del conjunto del ciclo del túbulo seminífero.

Tabla 10. Tipos celulares analizados en inmunohistoquímica para TEM.

Estadio	Espermatocitos	Espermátidas redondas	Espermátidas alargadas
I	S _{Paquiteno}	S1	S13
V	-	S5	S15
VIII	S _{Leptoteno} S _{Paquiteno}	S8	S16
X	S _{Leptoteno} S _{Paquiteno}	S10	

Se realizó un recuento de número de partículas de oro por área del núcleo, citoplasma, *manchette* y región acrosómica de cada tipo celular.

En primer lugar se realizó una comparación entre los tipos celulares en cada tipo de ratón con el test de Kruskal-Wallis, con la prueba de comparación múltiple *post-hoc* de Dunn. A continuación, se realizó el test de la U de Mann-Whitney para la comparación entre los ratones

C57BL/6 y *Gopc*^{-/-}. Sin embargo, este test compara los tipos celulares en conjunto y no entre ellos, por lo que se usó el test de la ANOVA de dos factores, con la prueba de comparación múltiple *post-hoc* de Bonferroni, ya que este tipo de test no tiene un equivalente no paramétrico (Sayón-Orea *et al.*, 2014).

Los resultados obtenidos se representaron en diagramas de barras, con el SEM en cada barra.

6.2. Reacción en Cadena de la Polimerasa Cuantitativa con Transcripción Inversa

Se determinó la variación de la expresión (*Fold change*) de los genes *Gcnf* y *Sp56* entre ratones C57BL/6 y *Gopc*^{-/-} con la fórmula:

$$Fold\ change = \frac{2^{-\Delta CT\ Gopc^{-/-}}}{2^{-\Delta CT\ C57BL/6}}$$

Para observar si la variación en la expresión era significativa se realizó el test de la U de Mann-Whitney, comparando las expresiones relativas (método $2^{-\Delta CT}$) de cada gen (*Gcnf* y *Sp56*) entre ratones C57BL/6 y *Gopc*^{-/-} (Schmittgen y Livak, 2008).

Los resultados obtenidos se representaron en diagramas de barras, con el error estándar en cada barra.

7. MICROINYECCIÓN INTRATESTICULAR DEL ANTICUERPO ANTI-GOPC

Este procedimiento quirúrgico se realizó en un quirófano del Animalario de los Servicios Generales (SGIker) del Campus de Bizkaia de la UPV/EHU.

7.1. Anestesia

Los ratones machos adultos se anestesiaron con Isoflurano (IsoFlo, Veterinaria Esteve) a un porcentaje de inducción del 3% y un flujo de O₂ de 1L/min. Para el mantenimiento de la anestesia se usó un porcentaje de Isoflurano del 1,75% y un flujo de O₂ de 1L/min. Los animales se mantuvieron durante todo el procedimiento quirúrgico sobre una manta térmica para evitar su entrada en hipotermia.

7.2. Procedimiento quirúrgico

Para realizar el procedimiento se emplearon un microscopio quirúrgico *Leica M651* y un micromanipulador *Mk1 Micromanipulator* (Singer Instruments). La microinyección fue realizada con el microinyector *CellTram[®]Air* (Eppendorf) (Fig. 23), a una presión entre 0,1-4Pa, con capilares de vidrio de boro-silicato de 1mm de diámetro exterior y 0,75mm de diámetro interior (World Precision Instruments), estirados en un estirador de capilares *Pul-1* (World Precision Instruments).



Figura 23. Microinyector *CellTram[®]Air* (Eppendorf).

En primer lugar, se rasuró el pelo de la zona abdominal de los animales donde posteriormente se realizaría la incisión. También se desinfectó la zona con Povidona Iodada al 10% (Betadine).

Mediante una incisión abdominal se extrajeron los testículos y se colocaron sobre Parafilm® para su manipulación, que consiste en realizar una limpieza del tejido adiposo que hay alrededor de los conductos eferentes, cerca de la *rete testis*, con unas pinzas de cirugía.

A continuación, se realizó el llenado de los túbulos seminíferos (Fig. 24) mediante la microinyección de 1µg de anticuerpo anti-GOPC (Abnova), disuelto en 15µL de PBS con colorante azul de bromofenol al 0,5 % (p/v). Los testículos contralaterales se microinyectaron sólo con colorante.

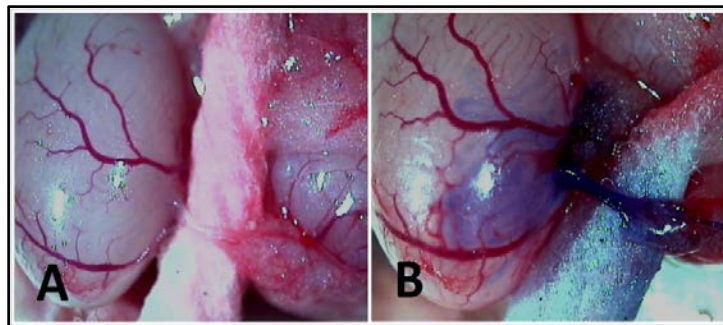


Figura 24. Proceso de microinyección a través de los conductos eferentes. A) Se observa el testículo y los conductos eferentes limpios del tejido adiposo que les rodea. B) Llenado de los túbulos seminíferos, en azul, durante la microinyección.

Una vez llevado a cabo el procedimiento quirúrgico los testículos fueron introducidos en el animal. En primer lugar, el testículo y en segundo lugar el epidídimo y el tejido adiposo unido a él, para evitar así la torsión del testículo. Finalmente se suturó la incisión con hilo de sutura absorbible e hilo de sutura no absorbible (Laboratorio Aragón S.L.) usando unas tijeras de sutura.

A todos los ratones se les realizó la eutanasia mediante dislocación cervical a los 35 días de la operación y los testículos fueron procesados para microscopía óptica y TEM (apartados 2 y 3).

IV. RESULTADOS

1. ESTUDIO HISTOLÓGICO DEL EPITELIO SEMINÍFERO DE RATONES GOPC^{-/-}

En el examen al microscopio óptico del epitelio de los túbulos seminíferos de ratones *Gopc*^{-/-} se observó que estaban representadas todas las células de la línea espermatogénica.

Entre los estadios I al VIII, se localizaron las espermatogonias y los espermatoцитos primarios en fase de leptoteno en la base del túbulo seminífero. Los criterios para determinar los diferentes tipos celulares fueron: su localización basal en el epitelio, el grado de condensación de la cromatina y la forma del núcleo. En un segundo estrato se localizaron los espermatoцитos primarios en fase de paquiteno, con el núcleo grande y gran cantidad de heterocromatina. En el compartimento adluminal del túbulo seminífero se localizaron las espermátidas redondas, con el núcleo más pequeño que el de los espermatoцитos. A partir del estadio IX al XII, el núcleo de espermatoцитos de ratones *Gopc*^{-/-} se observó algo más grande que el del genotipo silvestre. Por otro lado, las espermátidas fueron más pequeñas y mostraron una morfología irregular en comparación con las espermátidas en elongación del genotipo silvestre. Finalmente, delimitando la luz del túbulo, se localizaron las espermátidas globozoosperómicas, fácilmente reconocibles por la forma redonda de su núcleo condensado. No se observaron espermátidas alargadas, lo que indica que la delección del gen *Gopc* resulta en una globozoospermia total. Asimismo, las células de Sertoli y las células de Leydig, estas últimas situadas en el intersticio, mostraron una morfología normal.

1.1. Tinción del Ácido Peryódico-Schiff

Con la tinción PAS se pudo observar la morfología anómala del acrosoma en formación durante la espermiogénesis de ratones *Gopc*^{-/-} en comparación con los ratones C57BL/6. Esta tinción marca de color rosa las regiones con abundancia en glicoproteínas. De esta manera se han localizado dos regiones PAS positivas: el acrosoma y la membrana basal.

Los acrosomas de las células espermiogénicas de C57BL/6 mostraron una morfología normal. En las espermátidas redondas entre los tipos S2 al S5, se observó la vesícula acrosómica con forma redonda. El acrosoma de los tipos S13 al S15 con forma alargada, se localizó en la región anterior al núcleo (Fig. 25A-C).

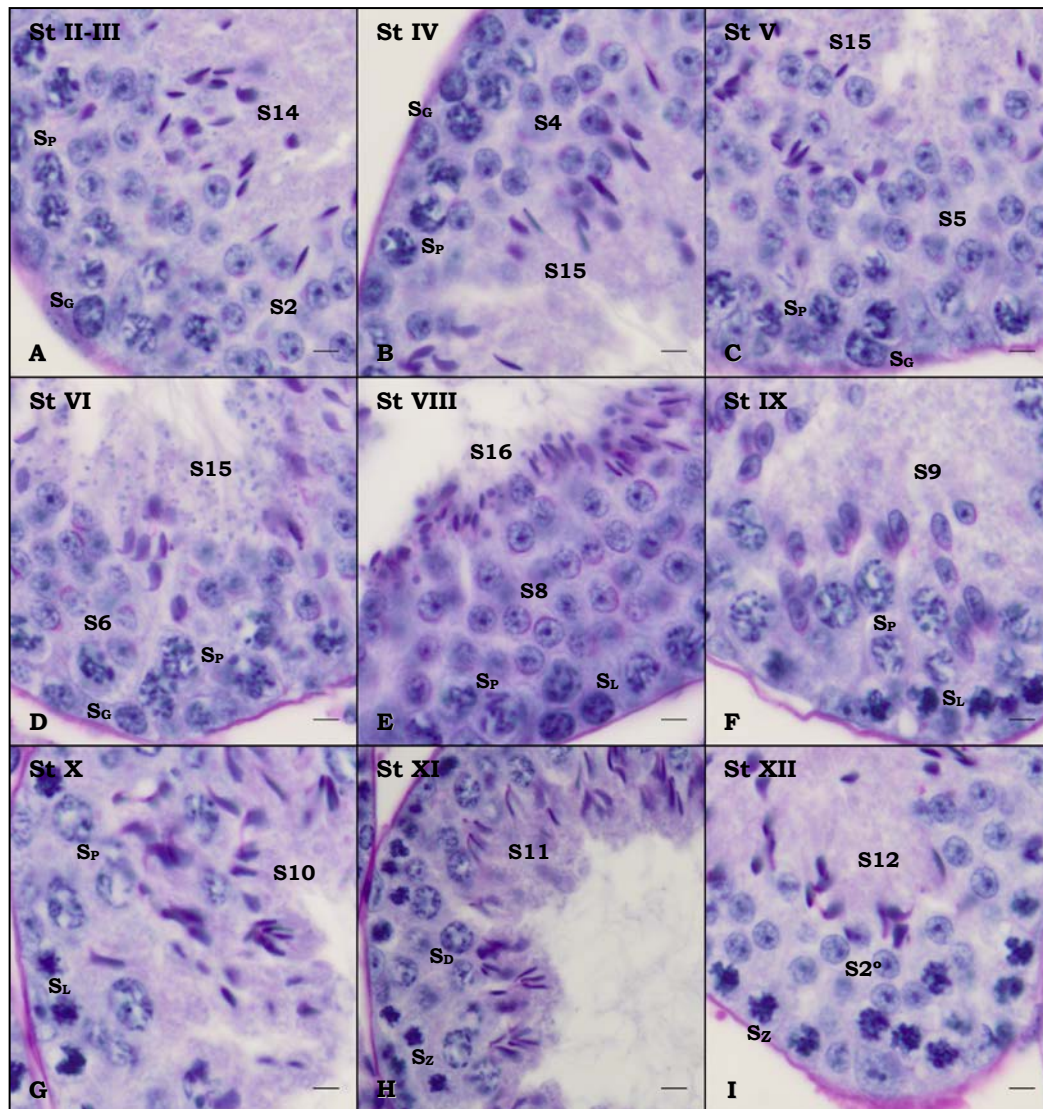


Figura 25. Tinción PAS de estadios del epitelio del túbulo seminífero de ratón silvestre C57BL/6. Se obtuvo marcaje PAS positivo (rosa) en los acrosomas y en la membrana basal. Contraste con hematoxilina para visualizar los núcleos (azul). *S_D*: espermatocito en diploteno, *S_G*: espermatogonia, *S_L*: espermatocito en leptoteno, *S_P*: espermatocito en paquiteno, *St*: estadios, *S_Z*: espermatocito en zigoteno, *S₂^o*: espermatocito secundario, *S1-S16*: tipo de espermátida. Barra: 5µm.

En los ratones *Gopc*^{-/-} las espermátidas del tipo S2 al tipo S5 mostraron también acrosomas con morfología normal (Fig. 26A-C). Sin embargo, en las espermátidas entre los tipos S6 al S12, se observaron pseudoacrosomas muy característicos, con forma pequeña, redonda y en algunas de las células incluso separados del núcleo (Fig. 26D-I). En las espermátidas del tipo S14 al S16 fue muy difícil ver la tinción PAS positiva de los pseudoacrosomas (Fig. 26A-E).

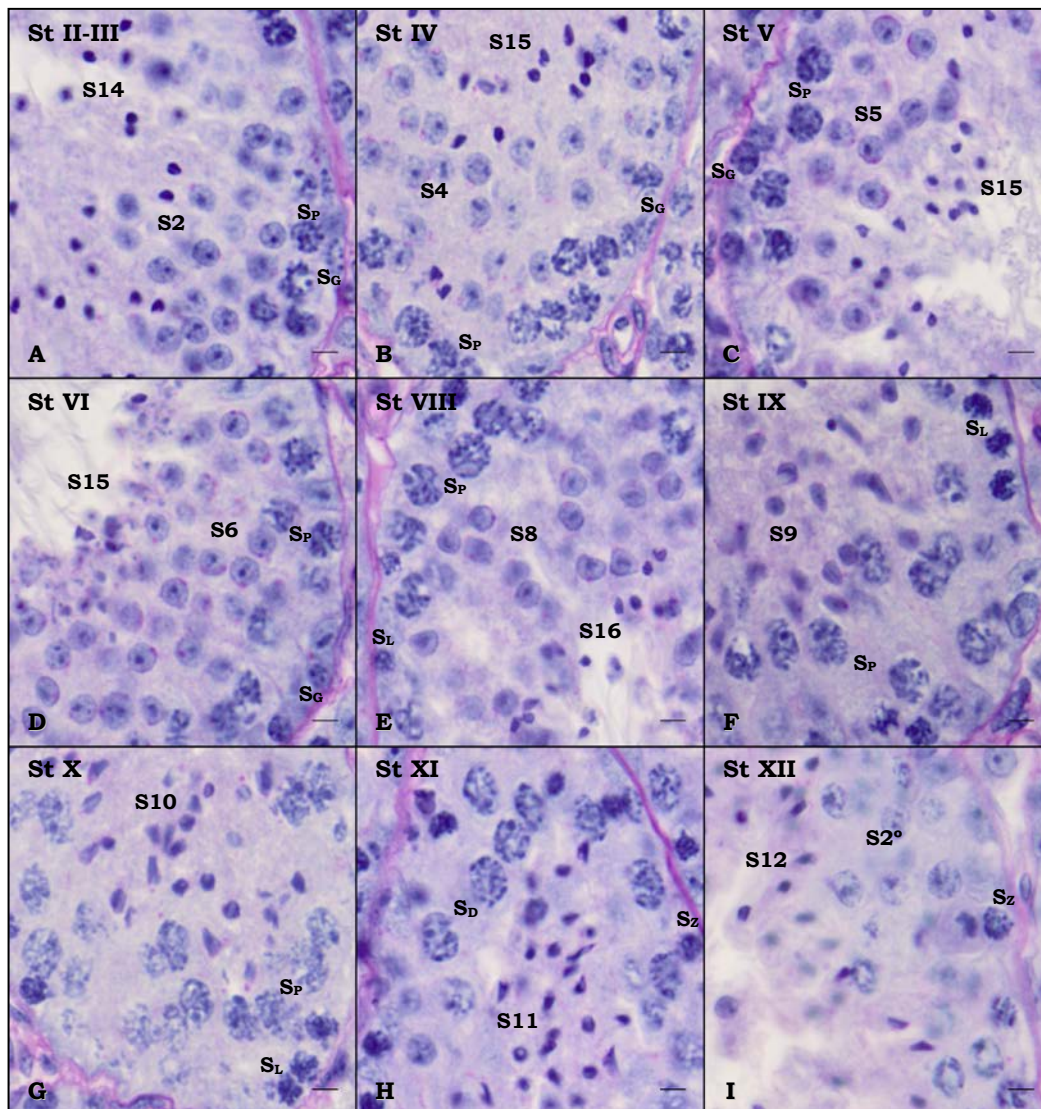


Figura 26. Tinción PAS de estadios del epitelio del túbulo seminífero de ratón *Gopc*^{-/-}. Se obtuvo marcaje PAS positivo (rosa) en los acrosomas y en la membrana basal. Contraste con hematoxilina para visualizar los núcleos (azul). *S_D*: espermatocito en diploteno, *S_G*: espermatogonia, *S_L*: espermatocito en leptoteno, *S_P*: espermatocito en paquiteno, *St*: estadios, *S_Z*: espermatocito en zigoteno, *S₂^o*: espermatocito secundario, *S1-S16*: tipo de espermátida. Barra: 5µm.

1.2. Localización inmunohistoquímica de Acrosina

Con el objetivo de poder analizar los acrosomas en las espermátidas, se localizó el precursor de la Acrosina: la Proacrosina. Realizamos inmunohistoquímica para microscopía óptica sobre secciones de testículo de ratones C57BL/6 y *Gopc*^{-/-}. La Acrosina es una proteína exclusiva del acrosoma y necesaria para la fecundación del oocito por parte del espermatozoide.

Se localizó la Proacrosina únicamente en el acrosoma de las espermatídas, aunque con variaciones entre los tipos de ratones. El epitelio de los ratones de genotipo silvestre mostró marcaje positivo en la vesícula acrosómica redonda, desde las espermatídas redondas del tipo S3. Entre los tipos S5 a S10, se observó un fuerte marcaje en los acrosomas. Sin embargo, en las espermatídas alargadas no se obtuvo marcaje de la Proacrosina (Fig. 27A-D).

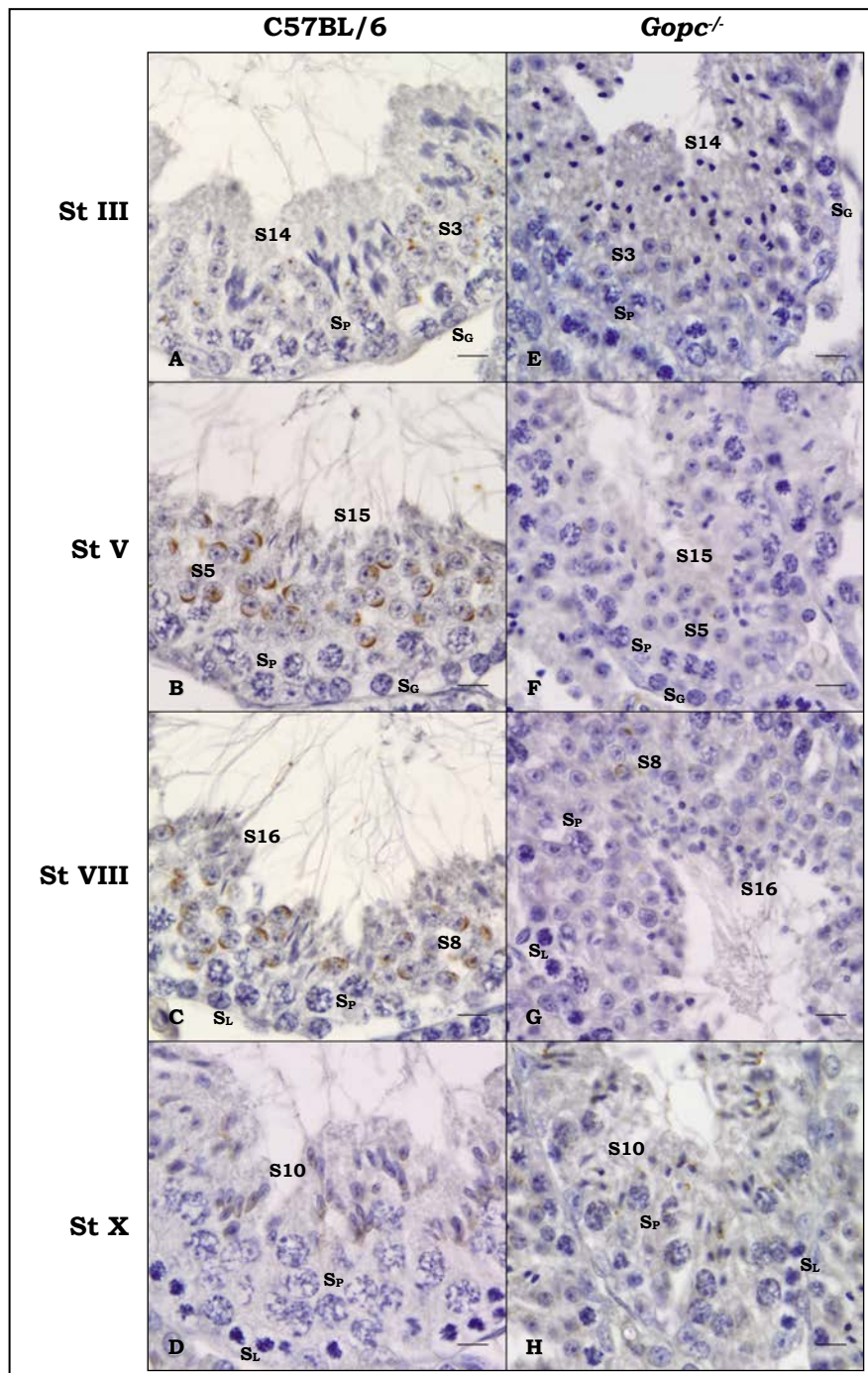


Figura 27. Localización inmunohistoquímica de Proacrosina en ratones C57BL/6 y *Gopc*^{-/-}. Se observa de color marrón la inmunolocalización de Proacrosina en los acrosomas en formación en el

epitelio seminífero *S_G*: espermatogonia, *S_L*: espermatocito en leptoteno, *S_P*: espermatocito en paquiteno, *St*: estadios, *S1-S16*: tipo de espermátida.
Barra: 10µm.

Por su parte, en el epitelio de los túbulos de ratones *Gopc*^{-/-}, se observó poco marcaje en la zona acrosómica de las espermátidas redondas. Igualmente, la malformación del acrosoma en este tipo de ratón quedó evidenciada ya que entre los tipos S5 al S10 se observaron pseudoacrosomas con forma redondeada. Finalmente, al igual que en los ratones C57BL/6, en las espermátidas a partir del tipo S10 no se detectó Proacrosina (Fig. 27E-H).

2. ANÁLISIS DE LA DISTRIBUCIÓN DE PROTEÍNAS ACROSÓMICAS EN LA ESPERMATOGÉNESIS DE RATONES *GOPC*^{-/-}

A continuación se describirán la localización y expresión de las proteínas GCNF y sp56 en la línea espermatogénica del epitelio del túbulo seminífero en ratones de genotipo silvestre (C57BL/6) y knockout (*Gopc*^{-/-}).

Se han observado interesantes diferencias entre los tipos de ratones en cuanto a la distribución y nivel de expresión de estas proteínas.

2.1. GCNF

En las células espermatogénicas, la proteína *Germ Cell Nuclear Factor* (GCNF) tiene la función de represor de la transcripción de los genes *Protamina 1*, *Protamina 2* y *Oct4*, mediante su unión al DNA en forma de homodímero.

Hemos localizado GCNF en el núcleo de las espermatogonias y espermatoцитos, así como en el acrosoma, acroplaxoma, *manchette* y núcleo de las células espermiogénicas. Sin embargo, aunque el patrón de distribución de GCNF en la línea espermatogénica de los ratones C57BL/6 y *Gopc*^{-/-} parece semejante, se ha observado que el grado de expresión difiere entre los dos tipos de ratones estudiados.

2.1.1. Localización inmunohistoquímica de GCNF

Mediante microscopía óptica, se localizó GCNF en la región acrosómica de las espermátidas entre los tipos S3 a S10 en ambos tipos de ratones. No obstante, las diferencias fueron importantes puesto que se observó mayor marcaje en los acrosomas que en los pseudoacrosomas. A partir del tipo S10 la detección de GCNF en la región acrosómica fue únicamente distinguible en el epitelio de ratones C57BL/6 (Fig. 28).

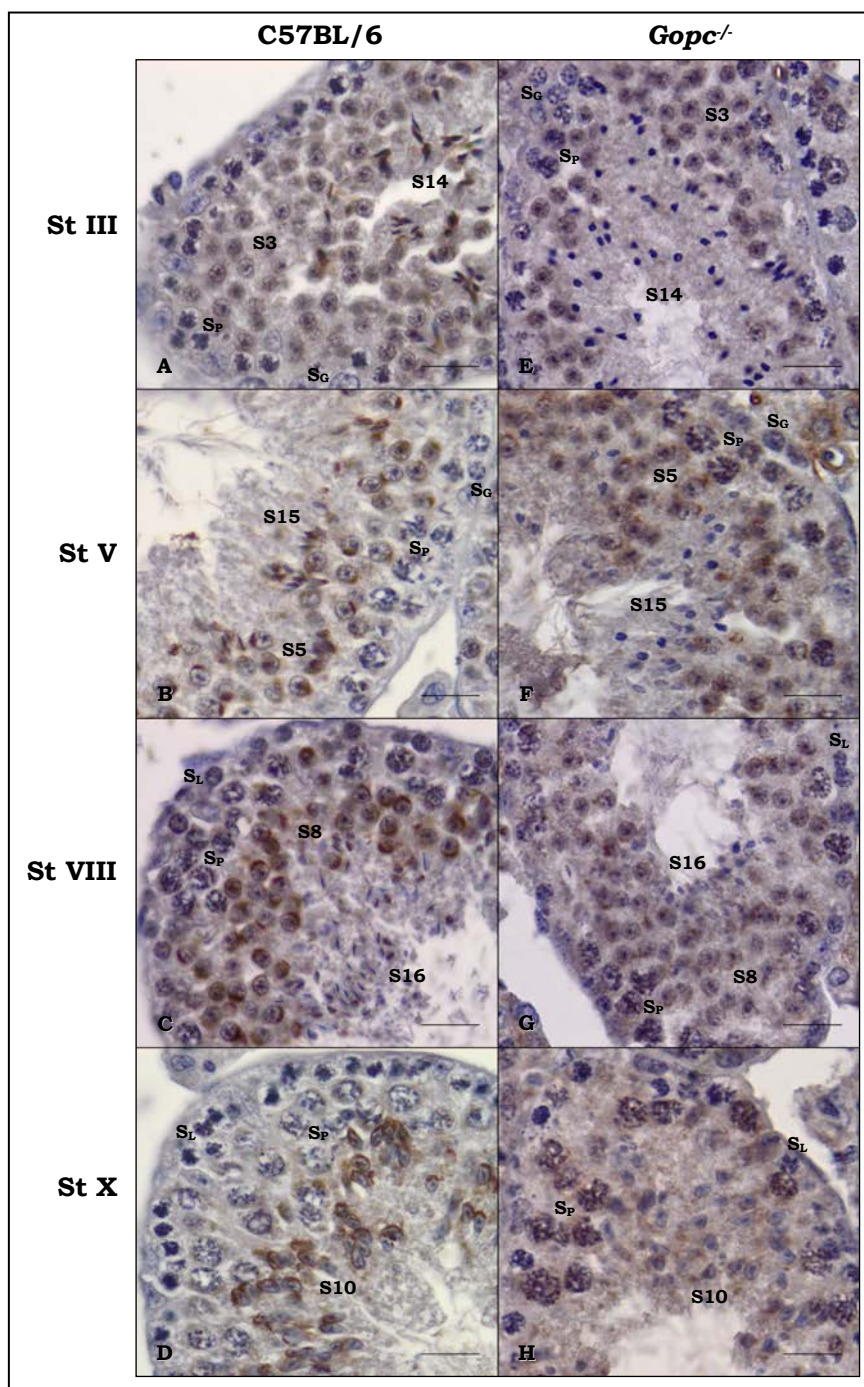


Figura 28. Inmunohistoquímica para microscopía óptica de GCNF en ratones C57BL/6 y *Gopc*^{-/-}. La localización de GCNF se visualiza de color marrón en los acrosomas, núcleo y citoplasma de las células espermatogénicas. S_g: espermatogonia, S_l: espermatocito en leptoteno, S_p: espermatocito en paquiten, St: estadios, S1-S16: tipo de espermátida. Barra: 10µm.

También, GCNF es observable en el núcleo de los espermatocitos en fase de paquiten de ratones *Gopc*^{-/-}, pero en el epitelio de ratones de genotipo silvestre no se visualizó debido a que la tinción con hematoxilina enmascara este marcaje. Por otro lado, se observaron diferencias en las espermátidas S10, que aparecieron teñidas en el

epitelio de ratones *Gopc*^{-/-}, tanto en la región del acrosoma, como en el citoplasma (Fig. 28D y H).

Mediante inmunohistoquímica con TEM se observó marcaje de GCNF en el núcleo de todas las células de la línea espermatogénica de los dos tipos de ratones. En ratones *Gopc*^{-/-} las espermatogonias y los espermatocitos en fase de leptoteno mostraron mayor marcaje que en las células del genotipo silvestre, y estas diferencias se mantuvieron en todas las fases de la meiosis I (Fig. 29).

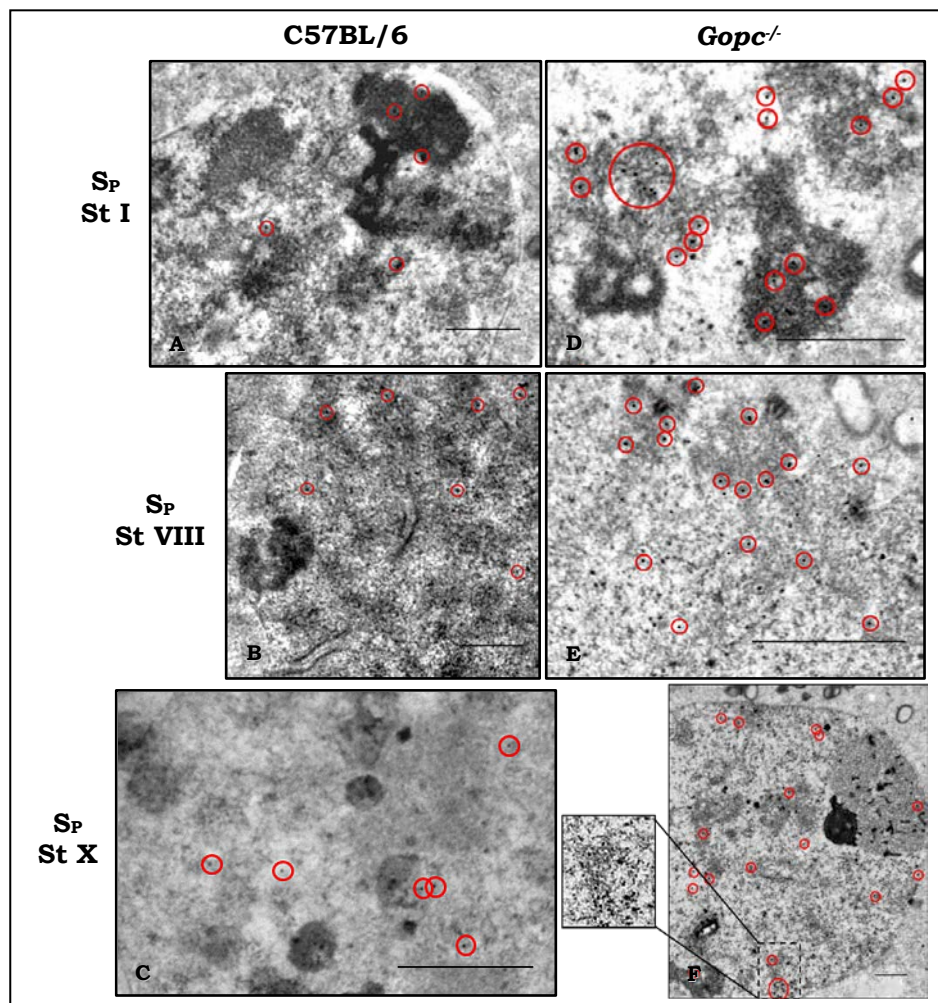


Figura 29. Inmunohistoquímica para TEM de GCNF en espermatocitos en fase de paquiteno de ratones C57BL/6 y *Gopc*^{-/-}. GCNF se encuentra localizado en el núcleo (círculos rojos) de los espermatocitos en fase de paquiteno de ratones C57BL/6 (A, B y C) y de *Gopc*^{-/-} (D, E y F). *Sp*: espermatocito en paquiteno, *St*: estadios. Barra: 1µm.

Igualmente, todas las células haploides tanto de ratones C57BL/6 (Fig. 30) como de *Gopc*^{-/-} (Fig. 31) mostraron marcaje en el núcleo. Así, mediante inmunohistoquímica para TEM se ha podido determinar que

todas las células espermatogénicas presentan marcaje nuclear para GCNF.

También se observó GCNF distribuida por la *manchette* de las espermátidas en elongación. La *manchette* es la estructura citoesquelética formada por microtúbulos y filamentos de actina, que actúa en la elongación del núcleo y acrosoma de las espermátidas redondas. Se localizó GCNF en los tipos S8 a S13 en ambos tipos de ratones, aunque fue más evidente en los *knockout* (Fig. 31C-D) que en los de genotipo silvestre (Fig. 30C-D).

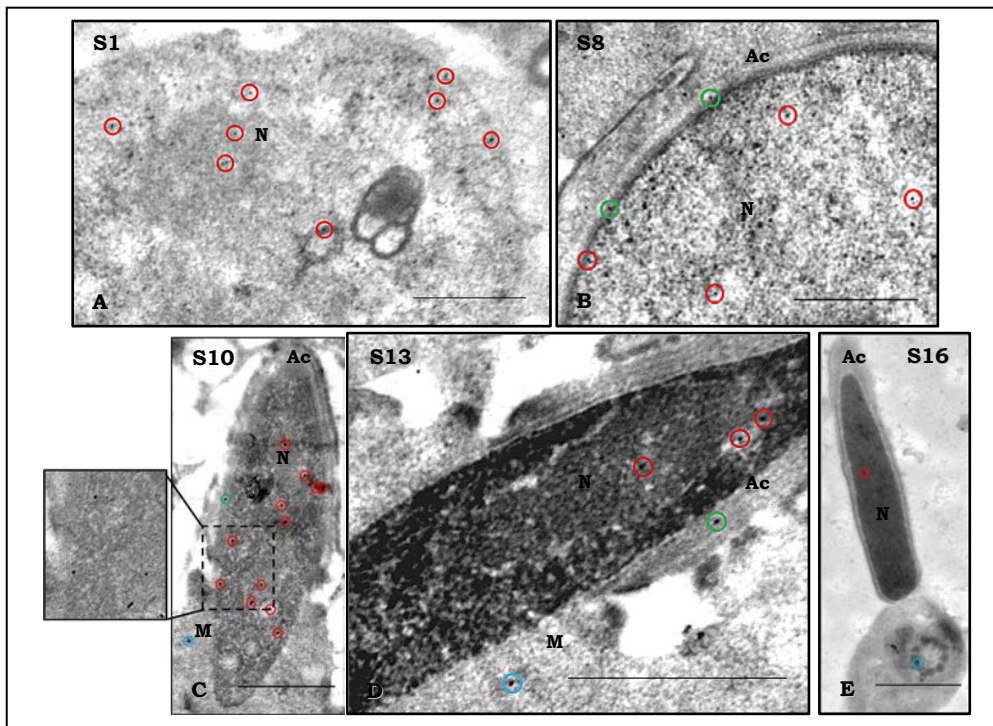


Figura 30. Inmunohistoquímica para TEM de GCNF en espermátidas redondas y alargadas de ratones C57BL/6. GCNF se encuentra localizado en el núcleo (círculos rojos), en el acrosoma (círculos verdes) y en *manchette* y flagelo (círculos azules) de las espermátidas. A) espermátida tipo 1, B) espermátida tipo 8, C) espermátida tipo 10, D) espermátida tipo 13, E) espermátida tipo 16. Ac: acrosoma, M: *manchette*, N: núcleo, S1-S16: tipo de espermátida. Barra: 1μm.

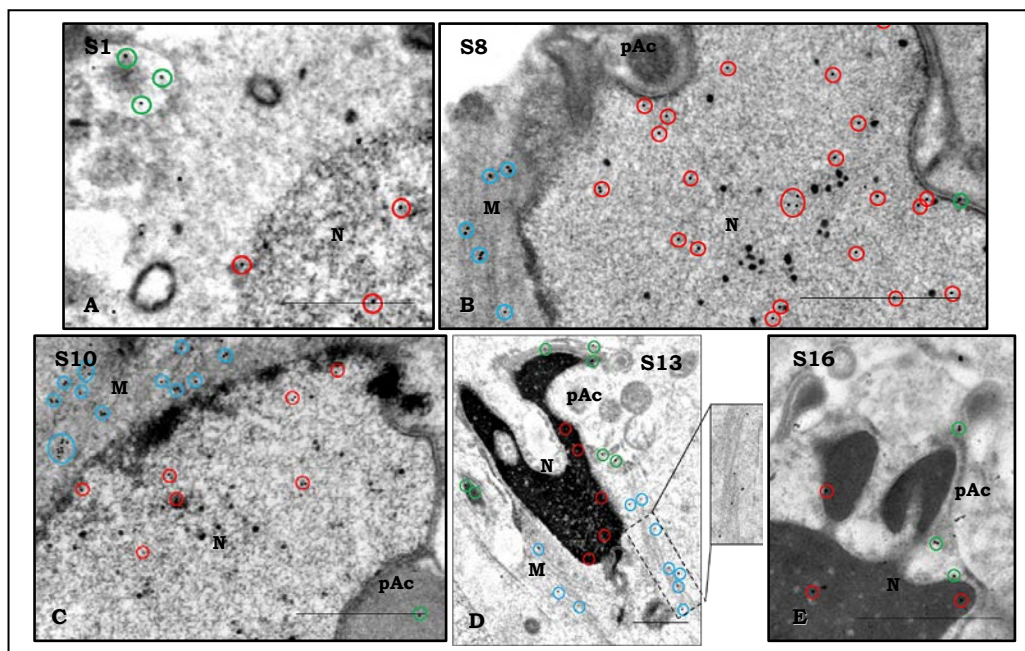


Figura 31. Inmunohistoquímica para TEM de GCNF en espermátidas redondas y en elongación de ratones *Gopc*^{-/-}. GCNF se encuentra localizado en el núcleo (círculos rojos), en el acrosoma (círculos verdes) y en las estructuras de microtúbulos: *manchette* y flagelo (círculos azules) de las espermátidas. A) espermátida tipo 1, B) espermátida tipo 8, C) espermátida tipo 10, D) espermátida tipo 13, E) espermátida tipo 16. Ac: acrosoma, M: *manchette*, N: núcleo, S1-S16: tipo de espermátida. Barra: 1 μ m.

En cuanto al acrosoma, se observó más concentración de GCNF en los pseudoacrosomas de *Gopc*^{-/-} (Fig. 31B-E) que en los acrosomas de los ratones de genotipo silvestre (Fig. 30B-E).

2.1.2. Análisis de la variación de la expresión de GCNF

Los resultados analizados en las inmunohistoquímicas nos hicieron intuir que podían existir diferencias de expresión de GCNF entre los ratones C57BL/6 y *Gopc*^{-/-}. Para determinar si efectivamente existían estas diferencias en la expresión durante la espermatogénesis entre los dos tipos de ratones, se realizaron varios tipos de análisis.

En primer lugar, mediante Western Blot se pudo analizar la presencia de GCNF en extractos proteicos de ambas muestras de ratones, tanto en su forma activa de homodímero unido al DNA (100KDa), como en la inactiva (50KDa). Esta última fue notablemente más abundante en los ratones *knockout* (Fig.32).

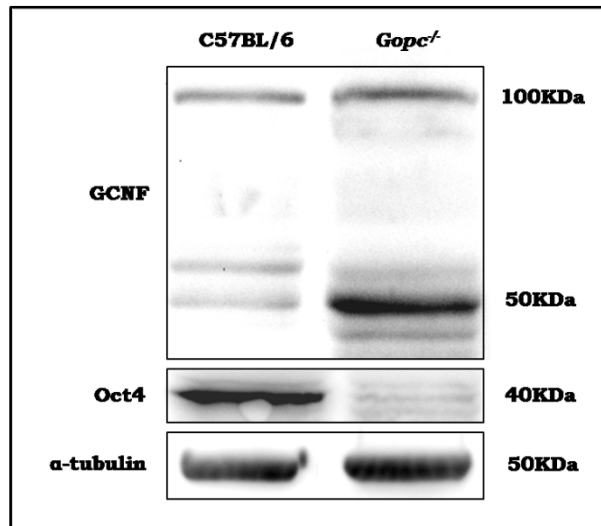
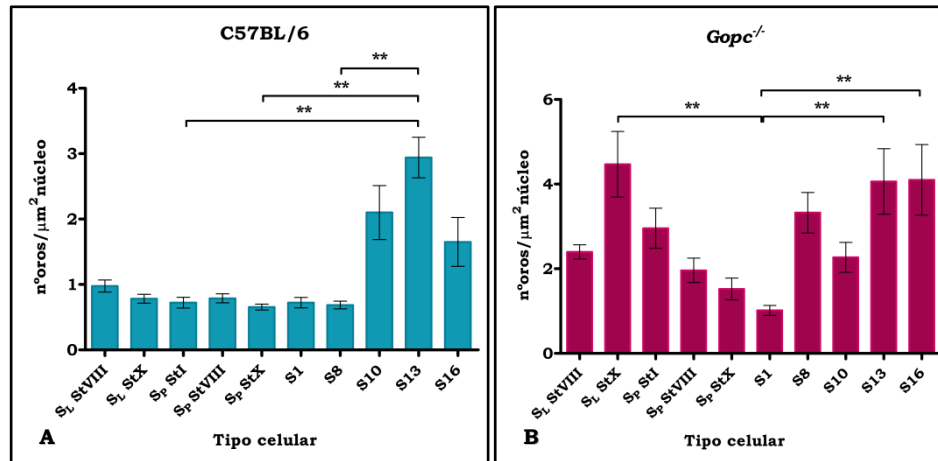


Figura 32. Western Blot de GCNF en muestra de testículos de ratones C57BL/6 y *Gopc*^{-/-}. Se observan dos bandas de GCNF, a 100KDa y a 50KDa. Se utilizó α -tubulin como control interno.

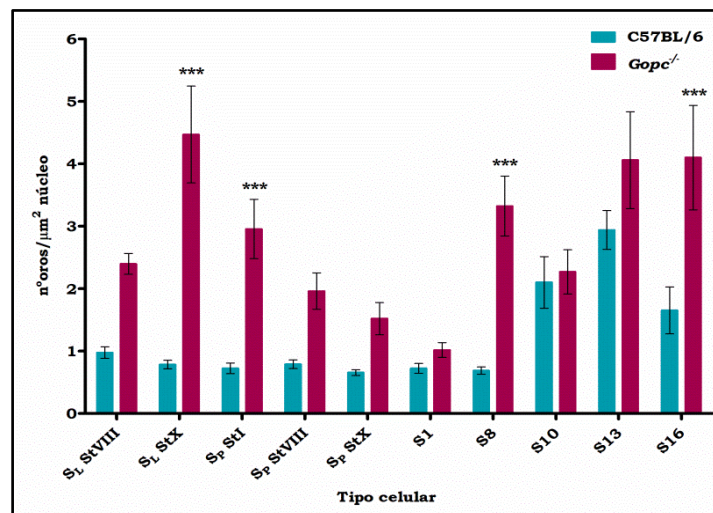
Este resultado nos proporcionó una visión general de la cantidad de proteína en el conjunto del testículo. Por ello, a continuación se realizó un análisis más detallado de la distribución de la proteína a lo largo de la espermatogénesis mediante un recuento, por tipo celular, del número de partículas de oro observadas a nivel de TEM. El número de partículas de oro fueron relativizadas al área de los núcleos, región acrosómica y zona de la *manchette*.

Así, entre los tipos celulares de los ratones C57BL/6, se observó que la expresión de GCNF se mantenía constante al inicio de la espermatogénesis. No obstante, al comenzar la elongación de la cabeza de las espermátidas (S10 y S13), las diferencias en la expresión aumentaron significativamente ($p < 0,01$) (Gráf. 1A). Por otro lado, en ratones *knockout* se observaron diferencias significativas entre espermátocitos y espermátidas, y también a lo largo de toda la espermiogénesis ($p < 0,01$) (Gráf. 1 B).



Gráfica 1. Recuento de partículas de oro por área nuclear en células de la línea espermatogénica para GCNF. A) C57BL/6 y B) *Gopc*^{-/-}. Los tipos celulares analizados pertenecen a los estadios I, VIII y X del ciclo del túbulo seminífero. (**) p<0.01, Kruskal-Wallis con *post-hoc* de Dunn.

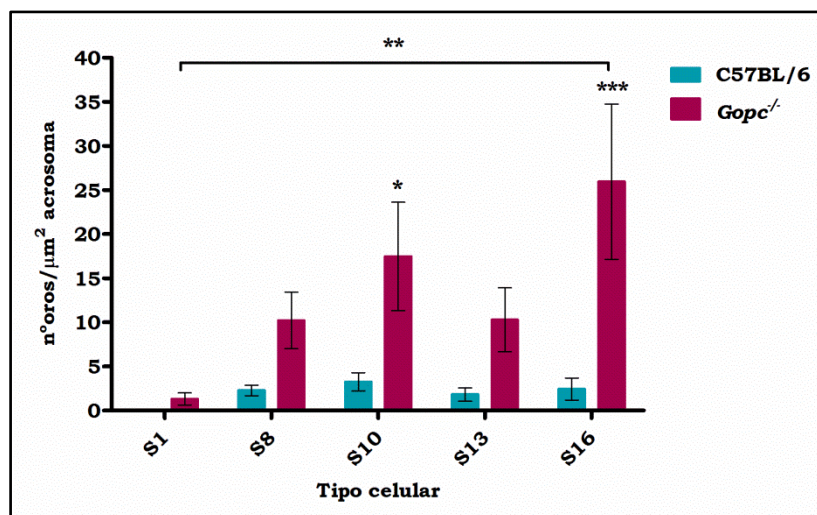
Confirmando los resultados previos, GCNF se localizó en el núcleo de los espermatoцитos en fase de paquiteno de ratones *Gopc*^{-/-}, pero no en ratones C57BL/6, debido a que el nivel de expresión de GCNF en los espermatoцитos en fase de paquiteno de ratones C57BL/6 fue menor que en los *knockout* (p<0,001). También se evidenciaron diferencias muy significativas entre las espermátidas redondas de tipo S8 y S16 (p<0,001) (Gráf. 2).



Gráfica 2. Comparación del recuento de partículas de oro por área nuclear en células de la línea espermatogénica de ratones C57BL/6 y *Gopc*^{-/-} para GCNF. Los tipos celulares analizados pertenecen a los estadios I, VIII y X del ciclo del túbulo seminífero. (***) p<0.001, ANOVA de dos factores con el test *post-hoc* de Bonferroni.

El análisis de la inmunolocalización en los acrosomas/pseudoacrosomas y *manchette* de ambos tipos de ratones reveló los siguientes resultados.

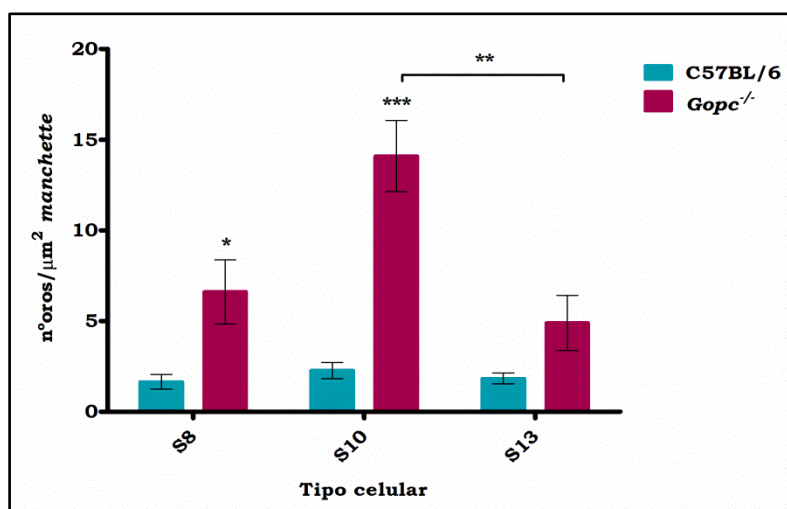
En los acrosomas de ratones C57BL/6 la dinámica de expresión de GCNF se mantuvo constante durante toda la espermiogénesis. Sin embargo, en los ratones *knockout* se observó que la expresión de GCNF aumentaba a medida que la espermiogénesis progresaba, entre los tipos celulares S1 y S16 ($p < 0,01$). Comparando los tipos celulares entre ambos tipos de ratones, se vio que había diferencias significativas en la expresión de GCNF en las espermátidas de tipo S10 ($p < 0,05$), obteniéndose un pico máximo entre las espermátidas de tipo S16 ($p < 0,001$) (Gráf. 3)



Gráfica 3. Comparación del recuento de partículas de oro por área de acrosoma en células de la línea espermatogénica de ratones C57BL/6 y *Gopc*^{-/-} para GCNF. (**) $p < 0,01$, Kruskal-Wallis con test *post-hoc* de Dunn; (*) $p < 0,05$ y (***) $p < 0,001$, ANOVA de dos factores con el test *post-hoc* de Bonferroni.

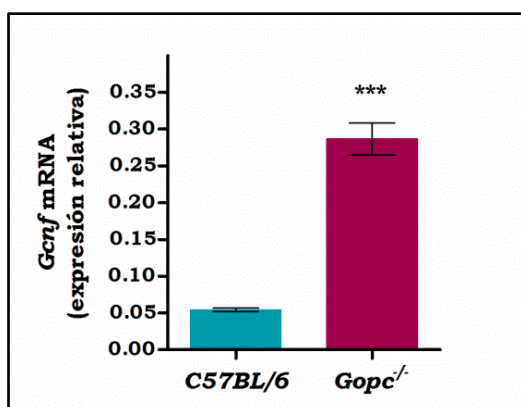
No se observaron diferencias en la expresión de GCNF en la *manchette* entre los tipos celulares de ratones de genotipo silvestre, pero sí en los ratones *knockout*, donde se observaron diferencias altamente significativas entre los tipos celulares en S10 y S13 ($p < 0,01$) (Gráf. 4).

Al comparar la expresión de la proteína entre los tipos celulares de ratones C57BL/6 y *Gopc*^{-/-} se encontraron diferencias significativas en la localización de GCNF en la *manchette* de las espermátidas del tipo S8 ($p < 0,05$) y S10 ($p < 0,001$) (Gráf. 4).



Gráfica 4. Comparación del recuento de partículas de oro por área de manchette en células de la línea espermatogénica de ratones C57BL/6 y *Gopc*^{-/-} para GCNF. (**) $p < 0.01$, Kruskal-Wallis con test *post-hoc* de Dunn; (*) $p < 0.05$ y (***) $p < 0.001$, ANOVA de dos factores con el test *post-hoc* de Bonferroni.

Finalmente, se realizó RT-qPCR para determinar si los resultados en la variación de expresión de la proteína se correlacionaban con la expresión génica en las muestras de testículo. Los resultados obtenidos mostraron que en ratones *knockout* la expresión relativa de *Gcnf* era cinco veces mayor ($5,343 \pm 0,4027$) que en ratones de genotipo silvestre (Gráf. 5).



Gráfica 5. Variación de la expresión relativa (mRNA) de *Gcnf* entre muestras de ratones C57BL/6 y *Gopc*^{-/-}. Se encuentra representada la comparación entre las expresiones relativas obtenidas mediante el método $2^{-\Delta CT}$. (***) $p < 0.001$, U de Mann-Whitney.

2.2. sp56

También hemos analizado la localización y expresión de la proteína *Sperm fertilization protein 56* (sp56), cuya función está relacionada con el reconocimiento de la proteína ZP3 del oocito en el momento de la fecundación. Hemos localizado sp56 en el acrosoma y en el citoplasma de las células en espermiogénesis, viendo que sigue un patrón de

distribución semejante entre la línea espermiogénica de ratones C57BL/6 y *Gopc*^{-/-}, aunque con algunas diferencias en su expresión.

2.2.1. Localización inmunohistoquímica de sp56

Se ha analizado mediante inmunohistoquímica la distribución de sp56. Los resultados con microscopía óptica indican que sp56 tiene el mismo patrón de distribución en los ratones C57BL/6 y *Gopc*^{-/-}.

Únicamente se ha localizado sp56 en las espermátidas. Ni espermatogonias ni espermátocitos mostraron marcaje. Tampoco se observó marcaje alguno en las células somáticas de los epitelios. En relación con las espermátidas de ambos tipos de ratones, los citoplasmas de las espermátidas entre los tipos S2 a S10 fueron inmunoreactivos, y a partir de las espermátidas del tipo S14 no se observó marcaje alguno (Fig. 33). No obstante, el marcaje de los citoplasmas de las espermátidas S5 a S8 de ratones *Gopc*^{-/-} fue notablemente más tenue en las espermátidas de los ratones C57BL/6 (Fig. 33F y G).

La región acrosómica de ambos tipos de ratones analizados mostró marcaje similar de sp56, desde S2 hasta S10. Pero las espermátidas S14 y S15 de los ratones knockout mostraron mayor marcaje que en los individuos silvestres (Fig. 33E y F).

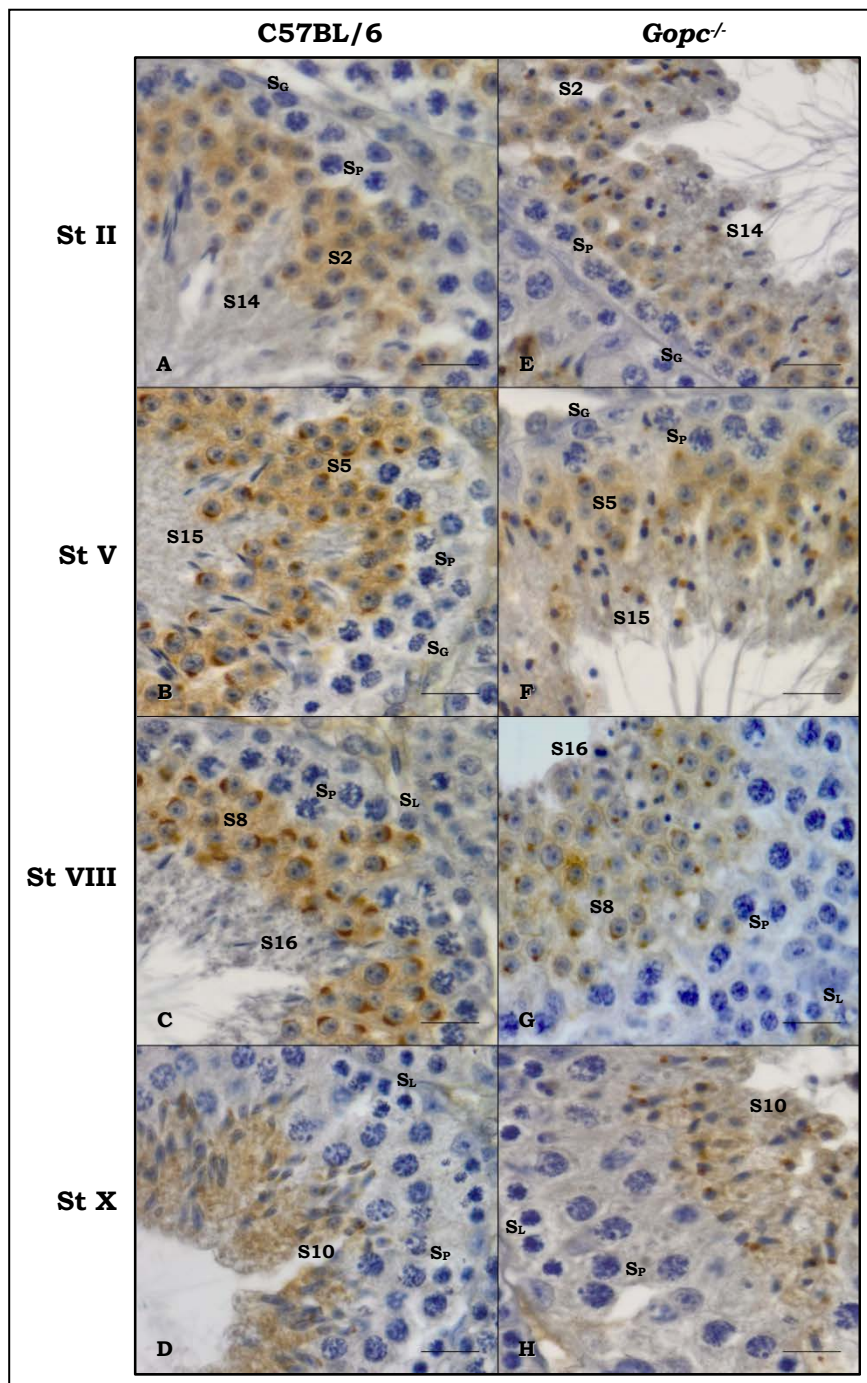


Figura 33. Inmunohistoquímica para microscopía óptica de sp56 en ratones C57BL/6 y *Gopc*^{-/-}. La localización de sp56 se observa de color marrón en los acrosomas y citoplasma de las células espermatogénicas. *S_G*: espermatogonia, *S_L*: espermatocito en leptoteno, *S_P*: espermatocito en paquiteno, *St*: estadios, *S1-S16*: tipo de espermátida. Barra: 10µm.

A continuación, se realizó inmunohistoquímica para TEM con el fin de analizar la localización intracelular de sp56 en las espermátidas redondas y en elongación. Se ha podido determinar que todas las células espermiogénicas tanto de ratones C57BL/6 (Fig. 34) como de *Gopc*^{-/-} (Fig. 35) mostraron marcaje de sp56 en el citoplasma, tanto en la

región del aparato de Golgi, como distribuido por el resto del citoplasma.

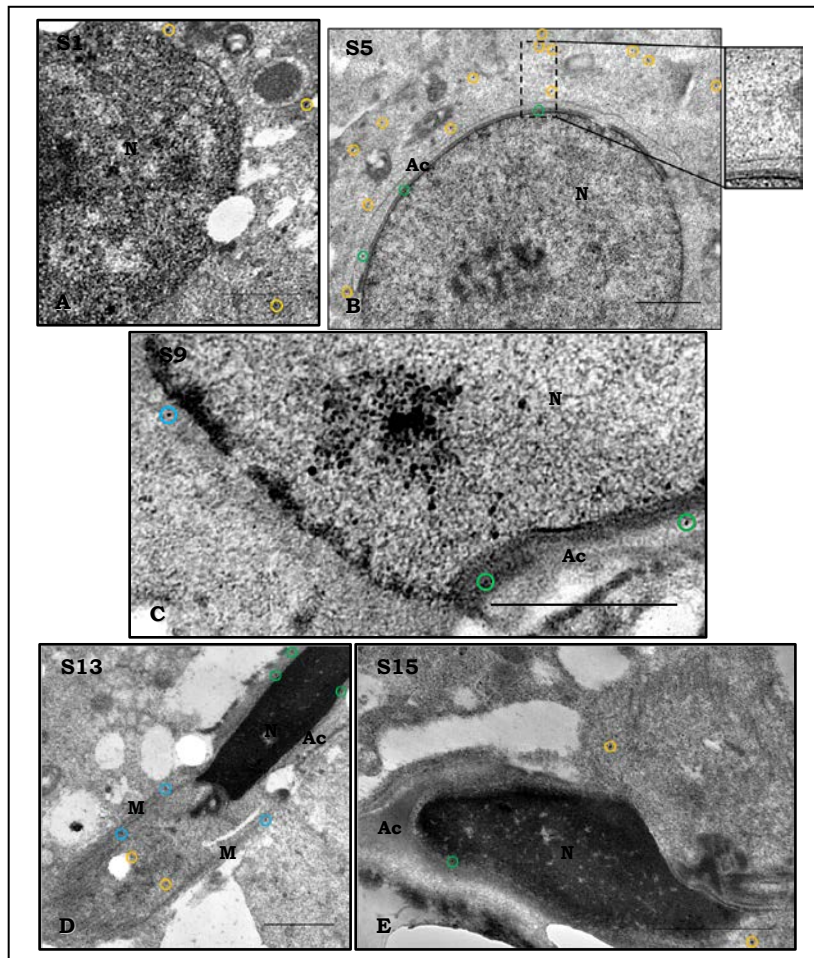


Figura 34. Inmunohistoquímica para TEM de sp56 en espermátidas redondas y alargadas de ratones C57BL/6. sp56 se localiza en el citoplasma (círculos naranjas), en el acrosoma (círculos verdes) y en *manchette* y flagelo (círculos azules) de las espermátidas. A) espermátida tipo 1, B) espermátida tipo 5, C) espermátida tipo 9, D) espermátida tipo 13, E) espermátida tipo 15. Ac: acrosoma, M: *manchette*, N: núcleo, S1-S16: tipo de espermátida, Barra: 1μm.

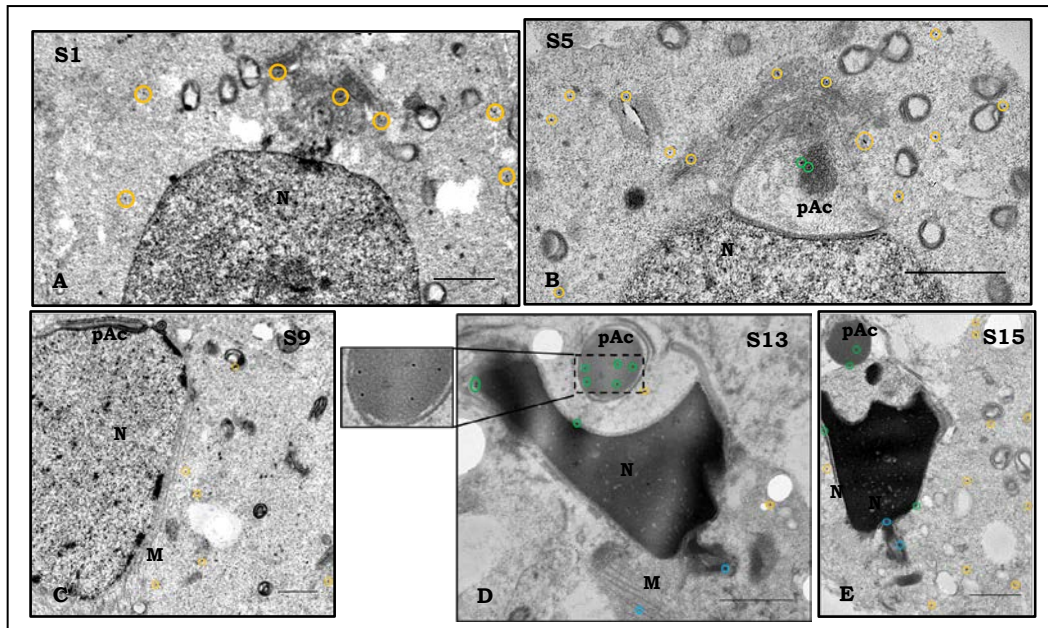


Figura 35. Inmunohistoquímica para TEM de sp56 en espermátidas redondas y alargadas de ratones *Gopc*^{-/-}. sp56 se localiza en el citoplasma (círculos naranjas), en el acrosoma (círculos verdes) y en *manchette* y flagelo (círculos azules) de las espermátidas. A) espermátida tipo 1, B) espermátida tipo 5, C) espermátida tipo 9, D) espermátida tipo 13, E) espermátida tipo 15. *M*: *manchette*, *N*: núcleo, *pAc*: pseudoacrosoma, *S1-S16*: tipo de espermátida. Barra: 1μm.

La localización de sp56 en la región acrosómica de las espermátidas redondas fue similar en ambos tipos de epitelios. A partir de la espermátida tipo 13 sp56 fue más abundante en la espermiogénesis de *Gopc*^{-/-} (Fig. 35D y E) que en la de genotipo silvestre (Fig. 34D y E). Estos resultados confirman los obtenidos con la inmunohistoquímica mediante microscopía óptica (Fig. 33E y F).

2.2.2. Análisis de la variación de la expresión de sp56

Para determinar la diferencia de expresión de la proteína sp56 entre los ratones C57BL/6 y *Gopc*^{-/-}, se realizaron dos tipos de análisis, Western Blot y un análisis estadístico del recuento del número de partículas de oro observadas con TEM por tipo celular, que fueron relativizadas al área de los citoplasmas y región acrosómica.

La detección de la proteína por Western Blot localizó la proteína sp56 en extractos proteicos de testículos enteros de ambas muestras de ratones, a una altura de 65KDa y sin diferencias apreciables entre las muestras analizadas (Fig. 36).

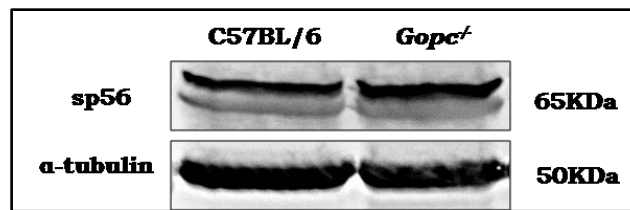
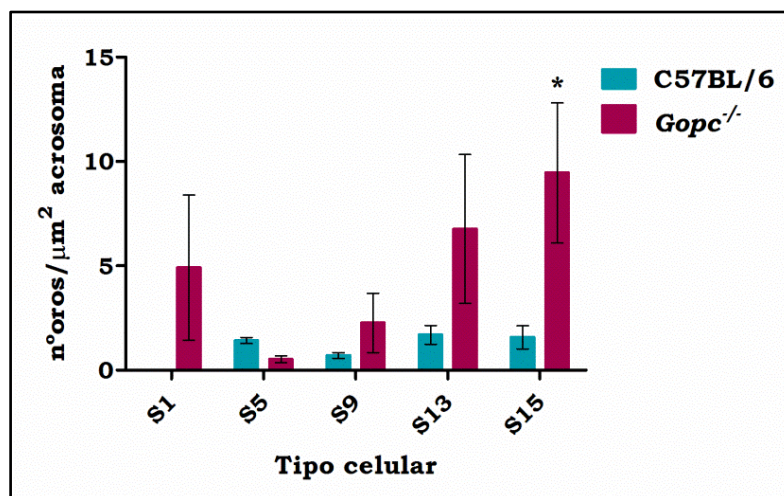


Figura 36. Western Blot de sp56 en muestra de testículos de ratones C57BL/6 y *Gopc*^{-/-}. Se observan bandas a 65KDa. Se utilizó α -tubulin como control interno.

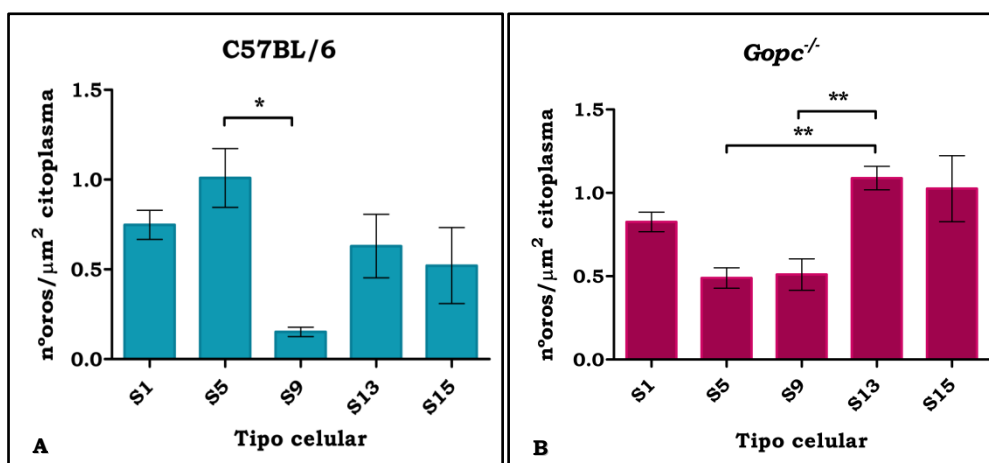
No obstante, el recuento de las partículas de oro permitió hacer un análisis más fino de la distribución de la proteína a lo largo de la espermatogénesis, al igual que permitió determinar las diferencias en la expresión de sp56.

Al analizar la distribución acrosómica, no se encontraron diferencias de expresión de sp56 en los diferentes tipos de espermátidas de los ratones *Gopc*^{-/-}. Por su parte, entre los ratones C57BL/6 y *Gopc*^{-/-} sólo se observaron diferencias significativas entre las células del tipo S15, donde la expresión de sp56 era mayor en los ratones *knockout* (Gráf. 6).



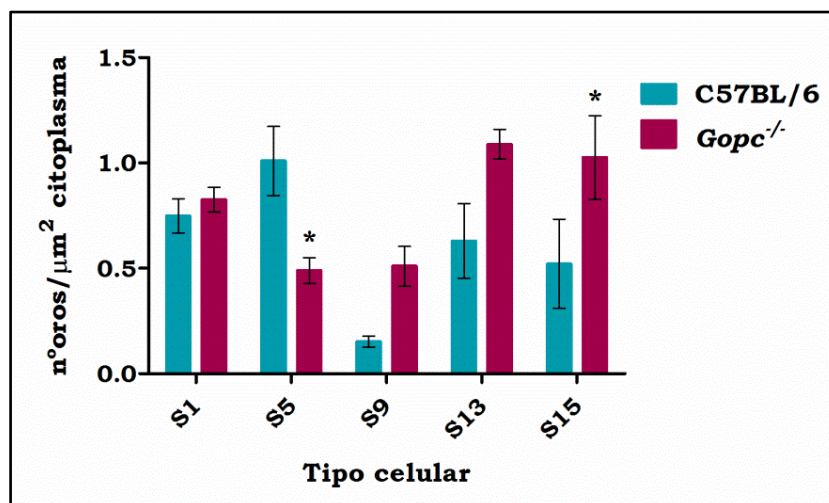
Gráfica 6. Comparación del recuento de partículas de oro por área de acrosoma en células de la línea espermatogénica de ratones C57BL/6 y *Gopc*^{-/-} para sp56. (*) $p < 0.05$, ANOVA de dos factores con el test *post-hoc* de Bonferroni.

La expresión de sp56 en los citoplasmas de ratones C57BL/6 se mantuvo constante durante toda la espermiogénesis, excepto entre los tipos S5 a S9 donde sufrió una bajada significativa ($p < 0,05$). Sin embargo, en los ratones *knockout* mostraron un aumento de la expresión de sp56 altamente significativo ($p < 0,01$) entre los tipos S5 a S13 (Gráf. 7).



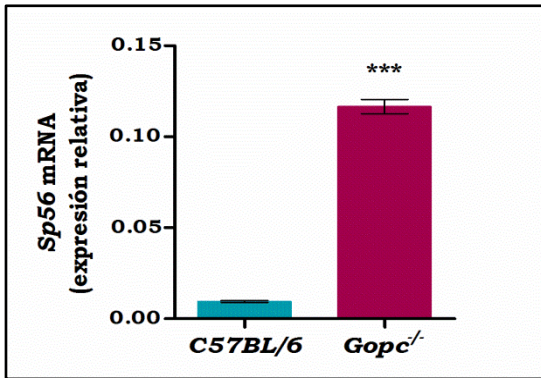
Gráfica 7. Recuento de partículas de oro por área de citoplasma en células de la línea espermiogénica para sp56. A) C57BL/6 y B) *Gopc*^{-/-}. (*) p < 0.05 y (**) p < 0.01, Kruskal-Wallis con *post-hoc* de Dunn.

Al comparar la concentración de sp56 en los citoplasmas de las espermatidas entre los dos tipos de ratones, se observó que en los ratones *knockout*, por un lado en las espermatidas de tipo S5 había una bajada significativa del número de oro por área de citoplasma (p < 0,05), mientras que en las espermatidas S15 había un incremento significativo (p < 0,05) (Gráf. 8).



Gráfica 8. Comparación del recuento de partículas de oro por área de citoplasma en células de la línea espermatogénica de ratones C57BL/6 y *Gopc*^{-/-} para sp56. (*) p < 0.05, ANOVA de dos factores con el test *post-hoc* de Bonferroni.

También se analizó la expresión génica de *Sp56* y los resultados obtenidos con la RT-qPCR mostraron que la expresión relativa de mRNA en ratones *knockout* era doce veces mayor ($12,67 \pm 0,8609$) que en ratones de genotipo silvestre (Gráf. 9).



Gráfica 9. Variación de la expresión relativa (mRNA) de *Sp56* entre muestras de ratones C57BL/6 y *Gopc*^{-/-}. Se encuentra representada la comparación entre las expresiones relativas obtenidas mediante el método $2^{-\Delta C_T}$. (***) $p < 0.001$, U de Mann-Whitney.

3. ANÁLISIS HISTOLÓGICO DEL EPITELIO SEMINÍFERO DE RATONES TRAS MICROINYECCIÓN INTRATESTICULAR DE ANTI-GOPC

En este trabajo se ha microinyectado en ratones C57BL/6 un anticuerpo anti-GOPC directamente en los túbulos seminíferos a través de los conductos eferentes que conectan el testículo con el epidídimo, con el fin de bloquear la proteína GOPC en la espermiogénesis *in vivo*. La microinyección intratesticular del anticuerpo anti-GOPC ha producido modificaciones en la espermiogénesis, que a continuación se analizarán.

El primer examen al microscopio óptico del epitelio seminífero de los ratones a los que se había microinyectado el anticuerpo anti-GOPC mostró en algunos de los túbulos un epitelio bastante roto, de manera que algunas de las espermátidas no aparecían en su compartimento habitual. Las células, tanto las germinales como las somáticas, de los túbulos con buena estructura se encontraban situadas en su compartimento correspondiente, siendo este basal o adluminal.

Las espermatogonias y los espermaticitos primarios mostraron una morfología normal, de igual manera que lo observado en los ratones *knockout*. Las espermátidas en espermiogénesis tenían una morfología irregular, similar a lo encontrado en los ratones *Gopc*^{-/-}, aunque sí se observaron diferencias entre los tipos de ratones, que se van a analizar a continuación.

Los núcleos de las espermátidas en los ratones microinyectados eran más grandes e incluso se localizaron algunas células que estaban elongándose, de manera similar a lo que ocurre en ratones silvestres. Por este motivo, se observaron espermátidas entre los tipos S13 a S16 con morfología variada, tanto alargadas como con forma globular cerca de la luz de los túbulos seminíferos. Sin embargo, en los túbulos seminíferos entre estadios I a V, se observó menor número de espermátidas de los tipos S13 a S16, en comparación con los ratones *Gopc*^{-/-}, y en algunos túbulos no se observó ninguna espermátida, ni globozoospermica ni alargada.

A continuación, se realizará un análisis de la biogénesis del acrosoma en la espermatogénesis de ratones *Gopc*^{-/-} y anti-GOPC, y se detallarán las diferencias durante la espermiogénesis entre ratones *Gopc*^{-/-} y ratones con el anticuerpo anti-GOPC.

3.1. Tinción del Ácido Peryódico-Schiff

Con la tinción PAS se localizaron dos regiones PAS positivas: la región acrosómica y la membrana basal. Así, en la región acrosómica, tanto de ratones microinyectados como de los *knockout*, se localizaron vesículas de color rosa. Esta región marcada corresponde a los pseudoacrosomas (Fig. 37).

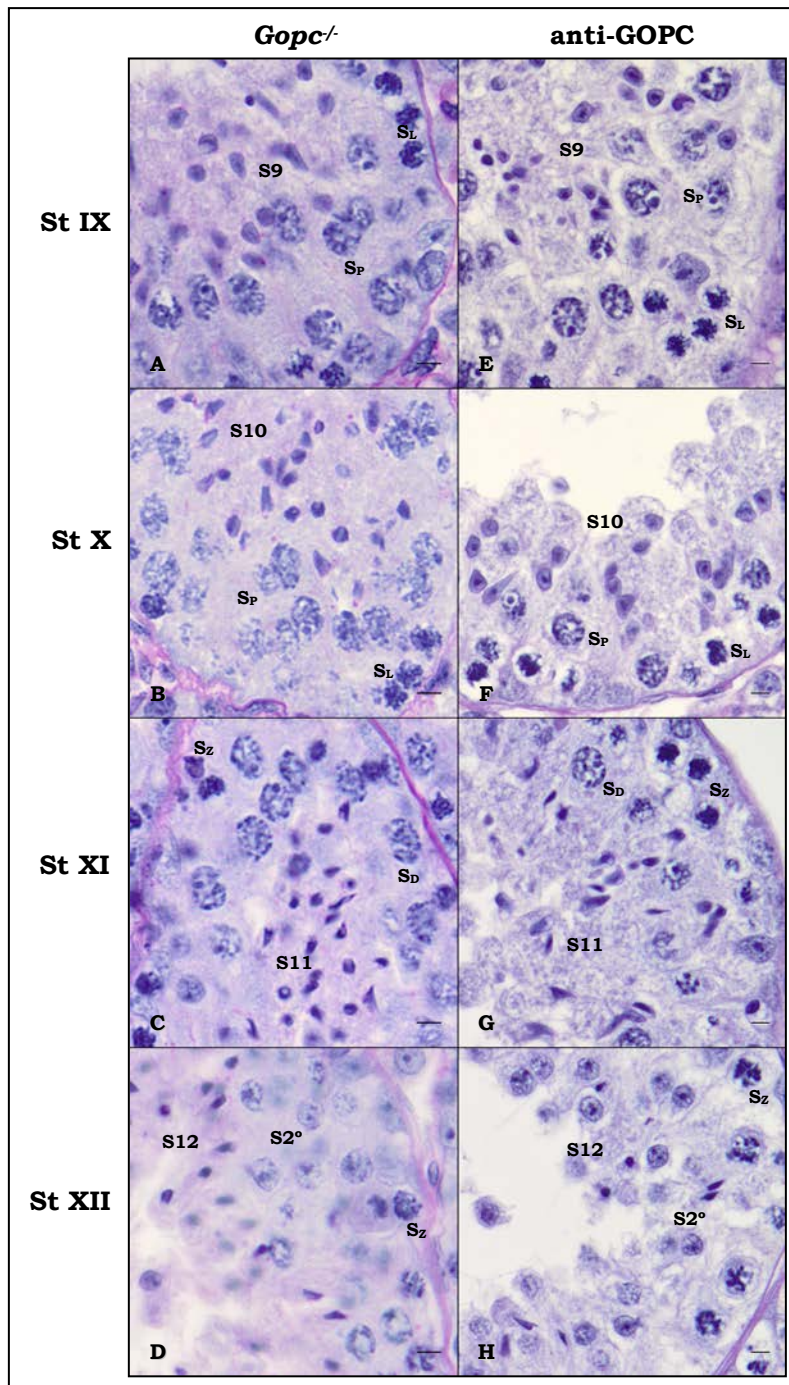


Figura 37. Tinción PAS de la espermiogénesis de ratones *Gopc*^{-/-} y ratones tras microinyección intratesticular de anti-GOPC. Se obtuvo marcaje PAS positivo (rosa) en la región acrosómica y en la membrana

basal. Contraste con hematoxilina para visualizar los núcleos (azul). *S_D*: espermatocono en diploteno, *S_L*: espermatocono en leptoteno, *S_P*: espermatocono en paquiteno, *St*: estadios, *S_Z*: espermatocono en zigoteno, *S₂*: espermatocono secundario, *S1-S16*: tipo de espermátida. Barra: 5µm.

Igualmente, con esta tinción se ha podido observar mediante microscopía óptica que la estructura histológica del epitelio seminífero al que se ha microinyectado anti-GOPC durante la espermiogénesis (St IX-XII) presentaba una morfología muy similar que el de ratones *Gopc*^{-/-} (Fig. 37). Las espermátidas en proceso de elongación en ambos tipos de ratones tenían una estructura irregular semejante, pero algunas de las espermátidas entre los tipos S11-S16 en los ratones anti-GOPC tenían morfología alargada (Fig. 37G y H).

3.2. Distribución de proteínas acrosómicas

La localización mediante inmunohistoquímica, de las proteínas acrosómicas ACR (proacrosina), GCNF y sp56, permitió analizar la biogénesis del acrosoma en ratones tras microinyección intratesticular de anti-GOPC. Los resultados se compararon con los obtenidos en ratones *Gopc*^{-/-}, descritos en el punto anterior.

Los estadios V y VIII son representativos de las fases de casquete y acrosómica de la biogénesis del acrosoma. Algunas de las espermátidas en estos estadios mostraron acrosomas con forma muy irregular (Fig. 38). Algunos de los acrosomas en el estadio V del ciclo del túbulo seminífero de ratones tras la microinyección intratesticular fueron semejantes a los *Gopc*^{-/-} (Fig. 38A, B, C y detalles), aunque otros fueron similares a los de ratones silvestres. Estas dos morfologías diferentes de acrosomas se observaron en células de un mismo túbulo seminífero.

Respecto a las proteínas estudiadas, su localización en los acrosomas de las espermátidas S5 con anti-GOPC fue similar que lo observado en el epitelio de ratones *knockout* (Fig. 38A, C, E y detalles). No obstante, las espermátidas S15 en ratones tras microinyección no se pudieron comparar con las del epitelio de *Gopc*^{-/-} ya que en muchos de los túbulos no se encontraron representadas.

También se observó que los acrosomas de algunas espermátidas tipo S8 de ratones tratados con anti-GOPC, se encontraban recubriendo solo una pequeña parte de la región anterior del núcleo, mientras que en ratones silvestres estaban recubriendo toda la región anterior del núcleo (Fig. 38B). La morfología que mostraban era la de vesículas sin

fusionar que se extendían por toda la región perinuclear (Fig. 38D y F). Otras espermátidas sí presentaban la morfología de pseudoacrosoma de *Gopc*^{-/-} (Fig. 38B, F y detalles).

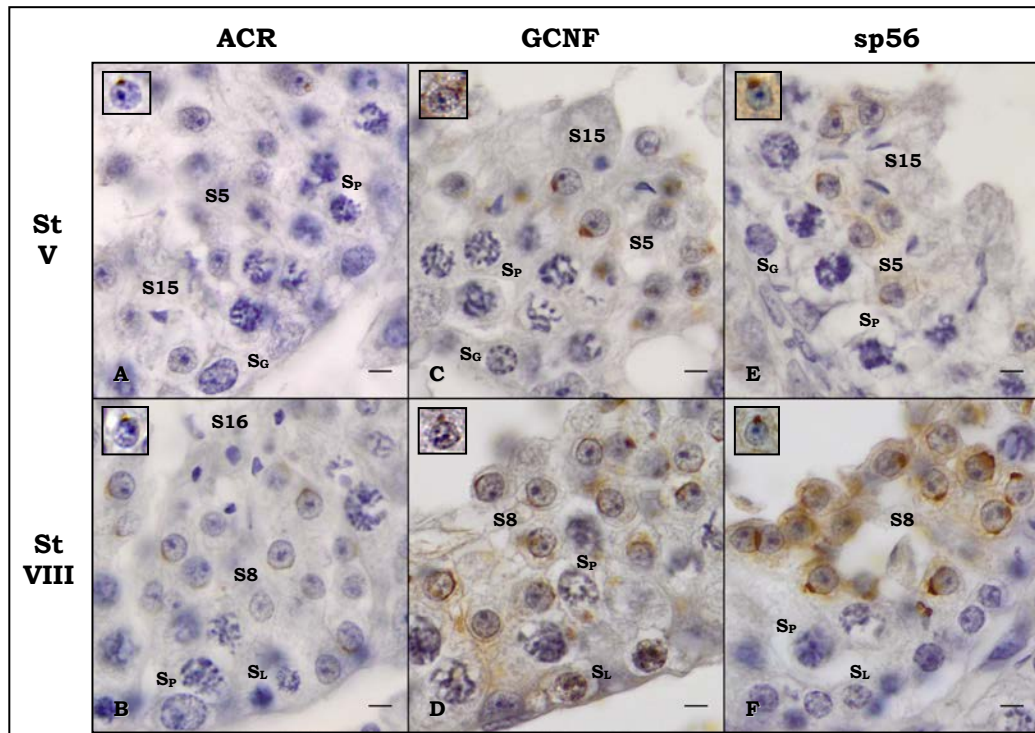


Figura 38. Inmunohistoquímicas para microscopía óptica de proteínas acrosómicas en ratones tras microinyección intratesticular de anti-GOPC. La localización de las proteínas acrosómicas se observa de color marrón en las células espermatogénicas. Los detalles en cada fotografía corresponden a una espermátida globozoospermica del estadio observado. *S_G*: espermatoгония, *S_L*: espermatoцито en leptoteno, *S_P*: espermatoцито en paquiteno, *St*: estadios, *S5-S15*: tipo de espermátida. Barra: 5μm.

A continuación se analizarán las diferencias y similitudes en cuanto a la morfología de las células durante la espermiogénesis de ratones *Gopc*^{-/-} respecto a ratones con anti-GOPC.

La inmunohistoquímica de GCNF mostró que algunos pseudoacrosomas del estadio IX de ratones tratados con anti-GOPC presentaron una estructura similar a los de ratones *Gopc*^{-/-}, al igual que la forma nuclear sin elongar (Fig. 39A y B).

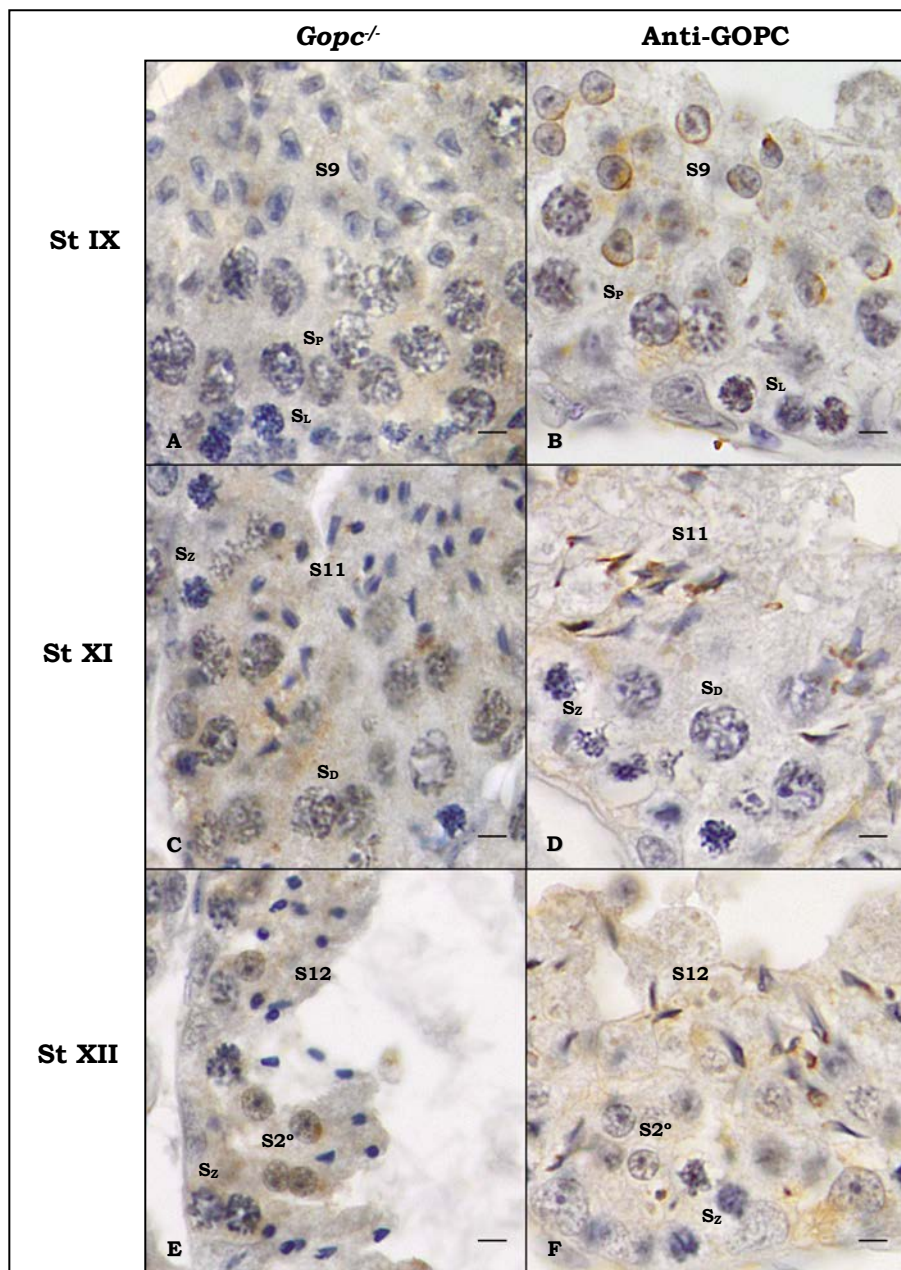


Figura 39. Inmunohistoquímica para microscopía óptica de GCNF de la espermiogénesis de ratones *Gopc*^{-/-} y tras microinyección intratesticular de anti-GOPC. La localización de GCNF se visualiza de color marrón en los pseudoacrosomas de las células espermiogénicas. *S_D*: espermatocono en diploteno, *S_L*: espermatocono en leptoteno, *S_P*: espermatocono en paquiteno, *St*: estadios, *S_Z*: espermatocono en zigoteno, *S2°*: espermatocono secundario, *S1-S16*: tipo de espermátida. Barra: 5µm.

La forma nuclear y la morfología del pseudoacrosoma de las espermátidas S11 y S12 de anti-GOPC fueron alargadas, similares a los de ratones con genotipo silvestre (Fig. 39D-F). La distribución de GCNF durante toda la espermiogénesis fue diferente en ratones *knockout* y con microinyección intratesticular de anti-GOPC ya que no se pudo observar la morfología del pseudoacrosoma de ratones *Gopc*^{-/-} mediante

esta técnica (Fig. 39A, C y E). Los pseudoacrosomas de ratones con anti-GOPC tenían una morfología alargada en las células S9 pero en los tipos S11 y S12 su morfología se observó mayoritariamente fue redonda (Fig. 39D y F).

Respecto a sp56, se pudo observar que algunos pseudoacrosomas del estadio IX de ratones tratados con anti-GOPC presentaron una estructura semejante a los de ratones *Gopc*^{-/-}, al igual que la forma nuclear sin elongar (Fig. 40A y B).

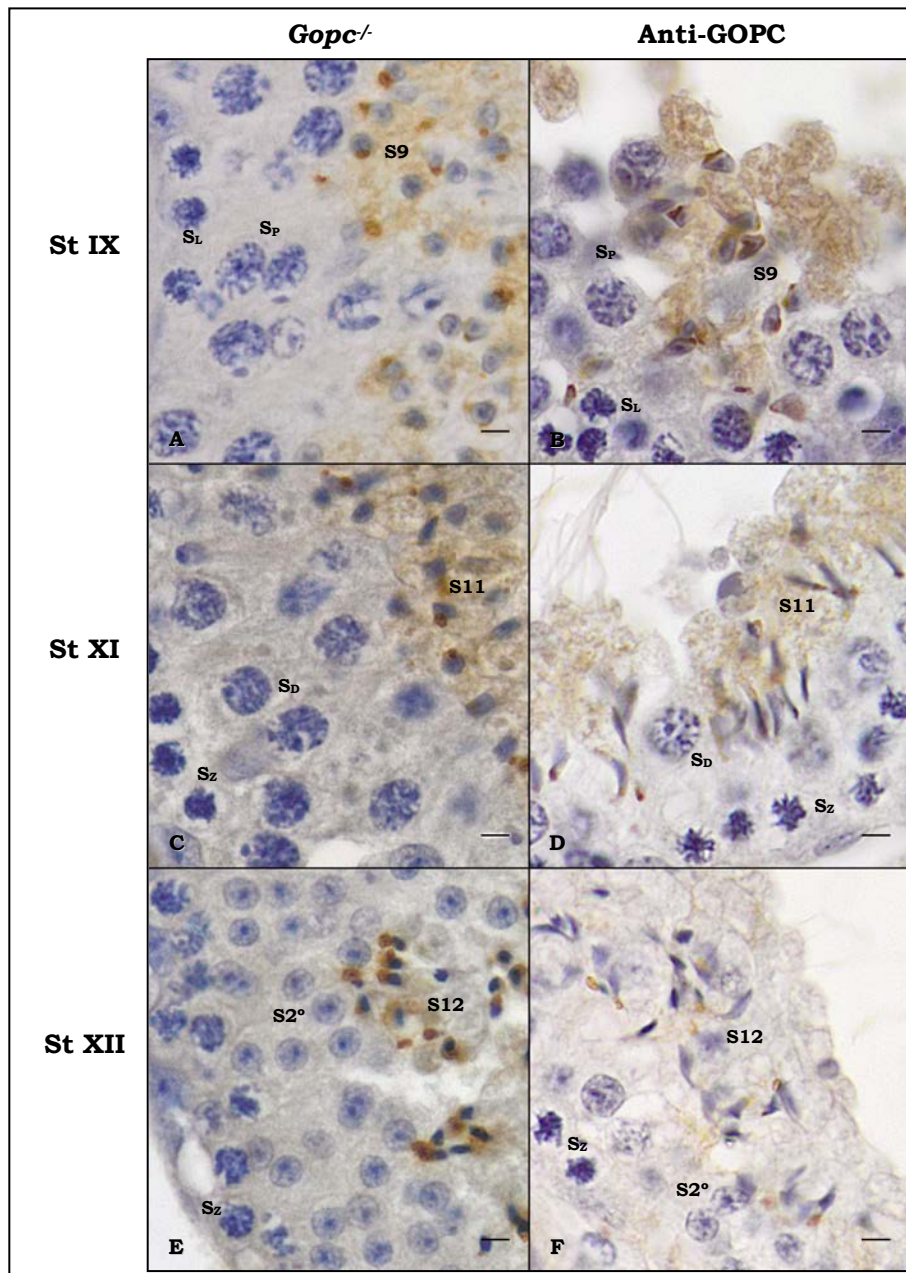


Figura 40. Inmunohistoquímica para microscopía óptica de sp56 en la espermiogénesis de ratones *Gopc*^{-/-} y con microinyección intratesticular de anti-GOPC. La localización de sp56 se visualiza de color marrón en los acrosomas y citoplasma de las células

espermiogénicas. *S_D*: espermatocito en diploteno, *S_L*: espermatocito en leptoteno, *S_P*: espermatocito en paquiteno, *St*: estadios, *S_Z*: espermatocito en zigoteno, *S_{2°}*: espermatocito secundario, *S1-S16*: tipo de espermátida. Barra: 5µm.

En cuanto a las espermátidas S11 y S12 de ratones microinyectados con anti-GOPC, el núcleo era alargado pero la morfología del pseudoacrosoma fue similar a la de las espermátidas S11 y S12 globozoospermicas (Fig. 40 C-F). Por otro lado, la distribución de sp56 durante toda la espermiogénesis fue similar en ratones *knockout* y con microinyección intratesticular de anti-GOPC, donde hubo marcaje, tanto en los pseudoacrosomas como en el citoplasma de las espermátidas S9 a S12. No obstante, este fue mayor en los pseudoacrosomas de las espermátidas de los ratones *Gopc^{-/-}* (Fig. 40A, C y E).

Con el objetivo de entender cuales podían ser los fallos en el proceso de elongación del núcleo y del acrosoma en los ratones a los que se hubo microinyectado intratesticularmente de anti-GOPC, se analizó la ultraestructura del epitelio seminífero a nivel de TEM.

3.3. Análisis ultraestructural de la espermiogénesis

Los cortes histológicos semifinos en epon teñidos con Azul de Toludina mostraron que los túbulos seminíferos en estadio VIII estaban conformados por células del tipo S8 y S9 semejantes a las del epitelio de ratones globozoospermicos, confirmando los resultados previos analizados e las inmunohistoquímicas (Fig. 41A y B).

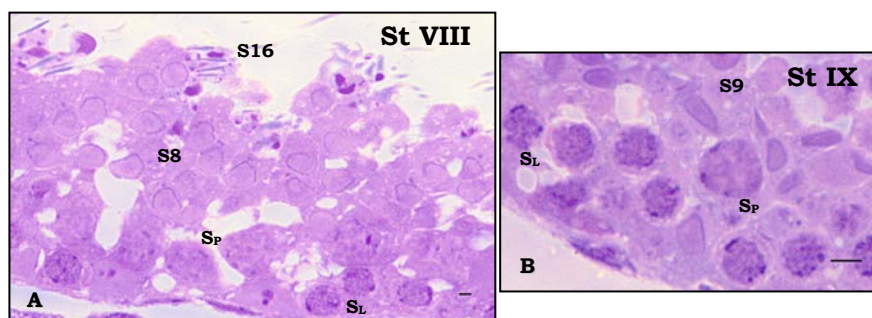


Figura 41. Secciones semifinas de testículos de ratones tras microinyección intratesticular de anti-GOPC teñidas con Azul de Toludina. Se observan las espermátidas de tipo S8 y S9 con núcleos grandes e irregulares. *S_L*: espermatocito en leptoteno, *S_P*: espermatocito en paquiteno, *St*: estadios, *S1-S16*: tipo de espermátida. Barra: 5µm.

En los siguientes estadios de la espermiogénesis, de igual manera, se observó, en un mismo túbulo seminífero en estadio XI, algunas espermátidas con morfología alargada, similares a las de genotipo silvestre, mientras que otras con el núcleo más grande y menor nivel de condensación (Fig. 42A). Asimismo, se visualizó que en distinto túbulo de igual estadio había espermátidas con distinto grado de elongación (Fig. 42B).

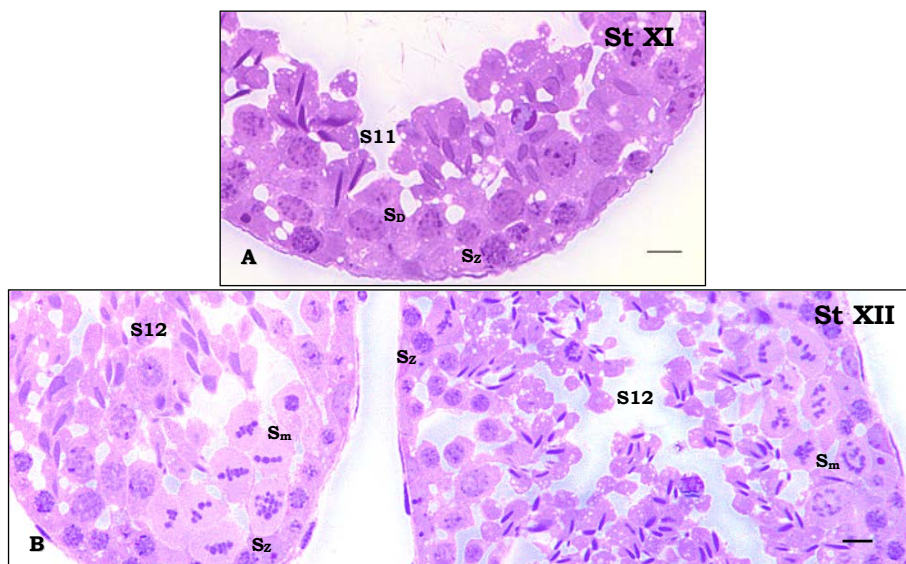


Figura 42. Secciones semifinas de testículos de ratones tras microinyección intratesticular de anti-GOPC teñidas con Azul de Toluidina. A) Túbulo seminífero compuesto de espermátidas S11 con distinto grado de condensación de la cromatina. B) En el túbulo seminífero de la izquierda se observan las espermátidas de tipo S12 con los núcleos grandes y menos condensados que en las espermátidas del mismo estadio en el túbulo de la derecha. *S_D*: espermatocono en diploteno, *S_m*: espermatocono en división, *St*: estadios, *S_Z*: espermatocono en zigoteno, *S1-S16*: tipo de espermátida. Barra: 5µm.

Debido a esta diversidad en cuanto a la morfología de las espermátidas en los túbulos, se seleccionaron para su análisis al TEM los que presentaban una morfología semejante al globozoospermico.

El tamaño de los núcleos de las espermátidas en espermiogénesis con la morfología irregular anteriormente señalada, fue mayor que los núcleos de estos tipos celulares en el epitelio de *Gopc*^{-/-}. Esta diferencia era evidente ya que el grado de condensación de los núcleos no correspondía con el estadio del ciclo del túbulo seminífero en el que se encontraba el epitelio (Fig. 43).

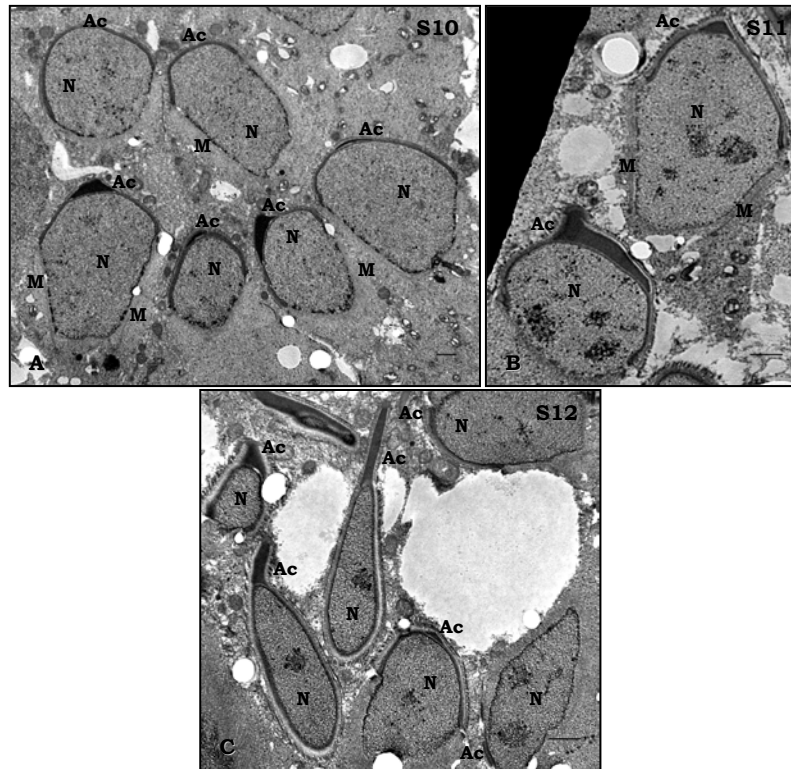


Figura 43. Ultraestructura de espermátidas de ratones tras microinyección intratesticular de anti-GOPC. Se observa que la estructura de los núcleos de las espermátidas de los tipos S10, S11 y S12 es muy semejante entre sí. Algunas de las espermátidas presentan los acrosomas con morfología irregular. *Ac*: acrosoma, *M*: manchette, *N*: núcleo, *S*: tipo de espermátida. Barra: 1 μ m.

En relación con los acrosomas, se observó que tenían una morfología diferente tanto a ratones silvestres como a *knockout*, con una estructura alargada, semejante a el genotipo silvestre, y el gránulo acrosómico aún muy condensado, más típico en ratones *Gopc*^{-/-} (Fig. 43).

Los acroplaxomas de algunas de las espermátidas en elongación aparecían algo separados de los núcleos por las invaginaciones que estos presentaron (Fig.44 y Fig. 45C).

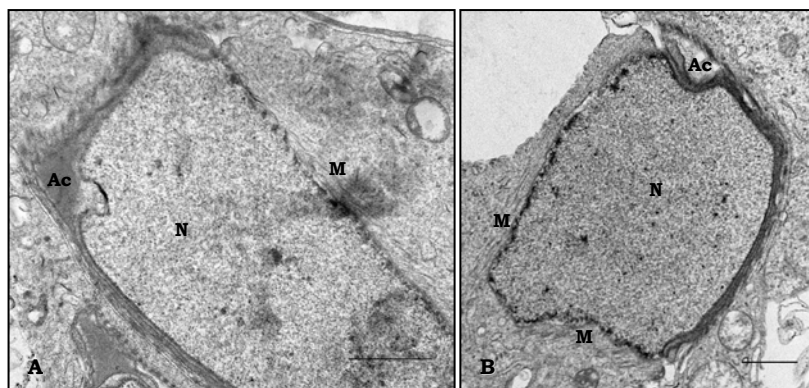


Figura 44. Ultraestructura de espermátidas del tipo S9 de ratones con microinyección intratesticular de anti-GOPC. Se observan los acrosomas elongados e irregulares y los núcleos con invaginaciones no habituales. Ac: acrosoma, M: manchette, N: núcleo.. Barra: 1µm.

Por último, la *manchette* también se visualizó deslocalizada en algunas de las espermátidas en elongación (Fig. 45) de manera similar a lo observado en las espermátidas globozoospermicas (Fig. 45).

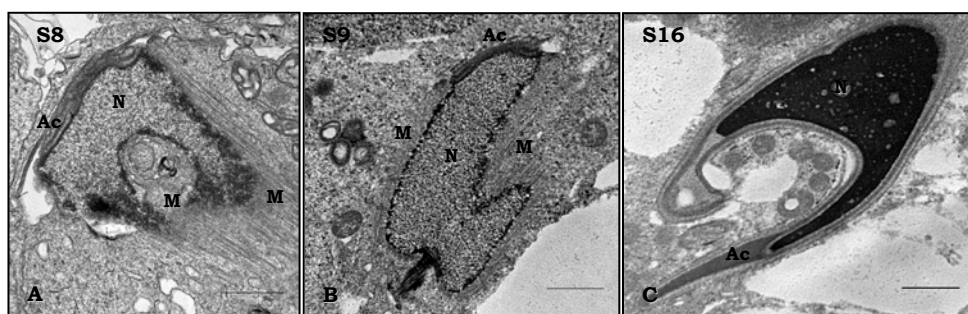


Figura 45. Ultraestructura de la manchette y acroplaxoma en espermátidas en espermiogénesis de ratones tras microinyección intratesticular de anti-GOPC. Se observan *manchettes* mal localizados (A y B). El acrosoma y acroplaxoma en la espermátida S16 presentan morfología irregular, al igual que el núcleo (C) Ac: acrosoma, M: manchette, N: núcleo, S: tipo de espermátida. Barra: 1µm.

En conclusión, según nuestro análisis, no todas las células espermiogénicas presentaban una morfología similar a la globozoospermica. Las similitudes en cuanto a la morfología de los pseudoacrosomas entre ratones tras microinyección intratesticular y los ratones *Gopc*^{-/-} fueron más evidentes cuando se observaron mediante microscopía óptica. Por otro lado, con el TEM se observó la localización errónea de la *manchette*, similar a la observada en las espermátidas globozoospermicas, al igual que la separación de algunos acroplaxomas de los núcleos de ratones tras microinyección intratesticular de anti-GOPC.

V. DISCUSIÓN

Actualmente, la infertilidad es un problema que afecta al 10-15% de las parejas (Matzuk y Lamb, 2002) y muchas acuden a las clínicas de reproducción asistida debido a la incapacidad de concebir de manera natural. Más del 50% de los casos de infertilidad en las parejas son debidos a problemas de fertilidad del varón (Massart *et al.*, 2012), por lo que su estudio es importante. El estudio de la infertilidad masculina tiene como objetivo principal el conocimiento de las bases metabólicas de este proceso tan complejo para poder entender y poner un remedio a esta alteración, pero también es interesante para proponer un método de anticoncepción masculino que sea duradero y reversible. De hecho, en las parejas los métodos de anticoncepción duraderos y reversibles son utilizados por las mujeres, lo que deja un vacío que puede ser llenado por el descubrimiento de nuevos métodos de anticoncepción masculinos.

La formación de los espermatozoides es un proceso complejo, en el que, tras una división reduccional del material genético, hay un proceso de diferenciación celular que conlleva grandes cambios estructurales de las células germinales masculinas. Este proceso está altamente controlado por la expresión de genes específicos, entre los que se encuentran *Gja1*, *mHR23B*, *HSP70-2*, *Cor1*, *Dazl*, *Tnp2*, *STAT4*, *SPATA16*, *Csnk2a2*, *Hrb*, *Gopc*, entre otros muchos (Toshimori *et al.*, 2004; Massart *et al.*, 2012; Chalmel *et al.*, 2012; Coutton *et al.*, 2015). La mutación o la no expresión de estos genes provoca infertilidad masculina, por malformaciones de los espermatozoides, espermatozoides con poca motilidad o escasa producción del gameto masculino (Liska, 2003). Una de las malformaciones de los espermatozoides es la globozoospermia, un tipo de alteración genética que se caracteriza por la forma globular de las cabezas de los espermatozoides maduros (Schirren *et al.* 1971).

En este trabajo hemos analizado la espermatogénesis de ratones *knockout* del gen *Gopc*, que producen espermatozoides globozoospermicos. Para ello se ha estudiado la localización de las proteínas acrosómicas Acrosina, GCNF y sp56, que nos han permitido analizar la formación errónea del acrosoma y el transporte proteico intracelular durante la formación del espermatozoide globozoospermico. También nos ha permitido indagar en la acción de GOPC en la espermiogénesis, lo que nos da pie a sugerir que la ausencia de GOPC provoca la desorganización de la red *trans*-Golgi, que parece inducir el fallo en el transporte de las vesículas pre-acrosómicas hacia la región perinuclear. Este hecho impide la fusión de las vesículas pre-

acrosómicas y produce la deslocalización del complejo acrosoma-acroplaxoma-manchette.

Por otro lado, hemos comparado la expresión génica y la concentración de las proteínas acrosómicas entre los ratones C57BL/6 y *Gopc*^{-/-}. Nuestros resultados nos han mostrado diferencias en la concentración de estas proteínas durante la espermatogénesis de C57BL/6 y *Gopc*^{-/-}, en varias estructuras celulares. Así, hay mayor expresión proteica de GCNF en el núcleo, *manchette* y pseudoacrosoma de las células en espermiogénesis de los ratones *Gopc*^{-/-} que en las mismas estructuras de los ratones con genotipo silvestre. Por su parte, la localización de la proteína sp56 en la espermatogénesis es exclusiva de las células haploides, situada tanto en los acrosomas en formación como en los citoplasmas de las espermátidas.

Como ya se ha comentado, el estudio de las funciones de los genes espermáticos son los que han permitido que se tenga un conocimiento sobre las causas de la infertilidad masculina. Sin embargo, los modelos experimentales murinos utilizados suelen conllevar problemas de natalidad y fecundidad (O'Bryan y de Kretser, 2006). Por este motivo, la obtención de otros modelos de estudio, como por ejemplo, mediante el bloqueo directo de la función proteica en el órgano de estudio a través de la microinyección de anticuerpos específicos, puede ser un modelo sustitutorio de los ratones *knockout*. Así, en este estudio se ha utilizado esta técnica para bloquear la proteína GOPC en la espermatogénesis *in vivo* de ratones con genotipo silvestre, y se han observado los fallos propios de una espermatogénesis globozoospermica.

1. LA ESPERMATOGÉNESIS EN RATONES GOPC^{-/-}

En las células germinales masculinas la proteína GOPC está localizada en la región *trans*-Golgi y actúa durante el transporte de las vesículas pre-acrosómicas desde el aparato de Golgi hacia la región perinuclear, donde se encuentra el acrosoma en formación. Esta proteína se ha localizado en un principio en la región perinuclear y en el citoplasma de los espermátocitos secundarios, en las espermátidas redondas en la región del acrosoma en formación, y finalmente en los restos citoplasmáticos de las espermátidas alargadas, eliminados durante la elongación de la cabeza (Yao *et al.*, 2002).

En este trabajo, con la tinción PAS se observó marcaje de las glicoproteínas acrosómicas en todas las espermátidas de los ratones de genotipo silvestre. Aunque el acrosoma está ausente en las espermátidas de los ratones *Gopc^{-/-}*, también se observó teñida la región perinuclear de las espermátidas entre los tipos S3 a S13 de ratones *knockout* ya que sí se produce la formación de las vesículas pre-acrosómicas. No obstante, estas no llegan a fusionarse y forman pseudoacrosomas (Ito *et al.*, 2004; Kierszenbaum *et al.* 2004; Chemes y Álvarez-Sedo, 2012). Entre las espermátidas S14 al S16 fue muy difícil ver la tinción PAS positiva de los pseudoacrosomas, debido a que hay glicoconjugados como la Galactosa, la Manosa y la Fucosa que no se encuentran en los ratones *Gopc^{-/-}* y sí, sin embargo, en los acrosomas de los animales silvestres. Asimismo, la concentración de N-Acetil-Glucosamina, Ácido Siálico y N-Acetil-Galactosamina es menor en los ratones *Gopc^{-/-}* que en los ratones de genotipo silvestre (Martínez de Ubago *et al.*, 2013).

La inmunolocalización de la Proacrosina en las espermátidas entre los tipos S3 a S10 nos ha proporcionado otro método de estudio de las diferencias en la formación y elongación de los acrosomas en los ratones *Gopc^{-/-}*. La Acrosina es una proteasa del tipo de las serinas, cuya función es la de romper la zona pelúcida del oocito (Nayernia *et al.*, 1994). En el epitelio globozoospermico hemos observado que los acrosomas de las espermátidas de tipo S5 a S13 no cubren la parte frontal perinuclear debido a que la vesícula acrosómica no se ha alargado (Yao *et al.*, 2002), diferencia notable respecto a los acrosomas de ratones de genotipo silvestre. Es de suponer que estas diferencias entre los dos tipos de ratones se mantengan también durante la espermiogénesis, pero no se observa marcaje de Proacrosina ni en los epitelios seminíferos de ratones con genotipo silvestre ni en los globozoospermicos, debido a que esta proteína está situada en la parte

anterior de la IAM y en poca concentración (Ferrer *et al.*, 2012). A pesar de que está descrito que la Proacrosina se sintetiza desde la fase de paquiteno de la meiosis I, y durante la espermatogénesis se incrementa gradualmente su cantidad en el acrosoma (Escalier *et al.*, 1991), nosotros no la localizamos en esta etapa de la espermatogénesis.

La biogénesis del acrosoma tiene lugar en las espermátidas redondas. Comienza en la fase de Golgi, cuando las vesículas pre-acrosómicas, previamente formadas, migran hasta la parte anterior del núcleo donde se fusionan y se anclan al acroplaxoma. La formación de vesículas por parte del aparato de Golgi es constante hasta la espermátida del tipo 12 (Anakwee *et al.*, 1991).

GOPC está localizada en la red *trans*-Golgi e interacciona con la proteína syntaxina-6, de la familia de proteínas SNARE, por lo que es de suponer que interviene en el tráfico vesicular y en la fusión entre membranas de vesículas (Moreno *et al.*, 2000b; Chares *et al.* 2001). De esta manera, cuando GOPC no es funcional el transporte desde el aparato de Golgi y la posterior fusión de las vesículas pre-acrosómicas no se produce, lo que induce la deslocalización de la *manchette*, que no se une al acrosoma. Este hecho desencadena la incorrecta elongación de la cabeza de la espermátida. En el modelo murino *Hrb*^{-/-} estos eventos también se producen (Kierszenbaum *et al.*, 2004).

No obstante, nosotros sugerimos que la incorrecta elongación de la cabeza de la espermátida podría iniciarse antes debido a una previa desorganización en el transporte vesicular de la red *trans*-Golgi, al igual que sugieren Funaki *et al.* (2013) en su modelo murino globozoospermico *knockout* de la proteína SMAP2. En el caso de los ratones *Smmap2*^{-/-} la falta de fusión de las vesículas pre-acrosómicas y la posterior deslocalización de la *manchette* serían consecuencia de la desorganización de la red *trans*-Golgi.

El transporte de las vesículas pre-acrosómicas desde el aparato de Golgi hasta la parte anterior del núcleo se produce mediante las proteínas motoras kinesina y dineína a través de los microtúbulos. También la proteína miosina-Va forma parte del transporte de las vesículas por los filamentos de actina, y gracias a la interacción con su receptor Rab27a/b, localizado en el acroplaxoma, ayuda a anclar las vesículas a la parte anterior del núcleo (Seabra *et al.*, 2002; Yang y Sperry, 2003; Ito *et al.*, 2004; Kierszenbaum y Tres, 2004; Hayasaka *et al.*, 2008; Harris y Littleton, 2011). Sin embargo, aunque se han sugerido varias vías de transporte de las vesículas pre-acrosómicas hasta el acroplaxoma, es posible que GOPC tenga un papel importante de

interacción con las proteínas de transporte. En los ratones *Gopc*^{-/-} los filamentos de actina presentes entre el aparato de Golgi y la región perinuclear están, al igual que la *manchette*, mal distribuidos y desorganizados (Ito *et al.*, 2004). Por este motivo, es posible que el transporte de las vesículas pre-acrosómicas esté afectado, debido a que GOPC pueda interactuar con la miosina-Va de alguna forma aún sin dilucidar. Esta interacción podría realizarse mediante sus motivos *coiled-coil* o el dominio PDZ que le proporciona la capacidad de unirse a otras proteínas (Chares *et al.*, 2001; Cheng *et al.*, 2002; Cheng *et al.*, 2004, Mendes y Kodaek, 2011).

La ultraestructura de los espermatozoides globozoospermicos, ampliamente estudiada en la bibliografía, involucra la malformación del acrosoma, lenta condensación de la cromatina, malformación de las estructuras citoesqueléticas como el acroplaxoma, *manchette* y axonema, desorganización de las mitocondrias en la pieza media del flagelo y flagelos con morfología espiral (Escalier, 1990; Yao *et al.*, 2002; Ito *et al.*, 2004; Suzuki-Toyota *et al.*, 2004; Ito *et al.*, 2009). Las espermátidas globozoospermicas que hemos observado al TEM presentaron las malformaciones ya descritas en la bibliografía, de las cuales las más evidentes fueron la presencia de vesículas pre-acrosómicas sin fusionar y la desorganización de la *manchette*. Los microtúbulos de la *manchette*, que deberían estar orientados hacia el centrosoma (Kierszenbaum y Tres, 2004), se encontraron localizados ectópicamente y algunos estaban invaginados en el núcleo, de manera similar a lo descrito por Ito *et al.* (2004). Así, es posible que GOPC pueda realizar también alguna función de forma indirecta, relacionada con la polaridad celular durante la formación de la *manchette* (Ito *et al.*, 2004), puesto que GOPC también interactúa con la familia proteica *Frizzled* (*frizzled 5* y *frizzled 8*) que proporciona polaridad a las células en desarrollo (Yao *et al.*, 2001). Si la polaridad celular está afectada, se podría sugerir que también lo está la formación de los microtúbulos orientados hacia el centrosoma de la *manchette* desde el MTOC. En la bibliografía existe bastante controversia sobre el MTOC de la *manchette* ya que se ha sugerido que los microtúbulos de esta estructura se polimerizan desde el anillo perinuclear (Wolosewick y Bryan, 1977; Russell *et al.*, 1991; Moreno y Schatten, 2000), y no desde el centrosoma, estructura compuesta por subunidades de γ -tubulina. Incluso la proteína Centrobina ha sido localizada en el acroplaxoma, anillo marginal, *manchette* y centrosoma durante la espermiogénesis (Liska *et al.*, 2009), y en el citosol (Shinet *et al.*, 2015). Siguiendo esta línea, se puede sugerir que la localización errónea de los microtúbulos de la *manchette* sea debida a que el anillo perinuclear no se encuentra ni bien formado ni bien localizado. Por este

motivo el resto de los microtúbulos que forman la *manchette* no se polimerizan desde la región perinuclear, sino que están localizados ectópicamente en el citoplasma ya que hay más factores que inducen su polimerización.

Igualmente, la ausencia de GOPC parece que induce la incorrecta formación del acroplaxoma y la región post-acrosómica de la teca perinuclear, dado que, como ya se ha comentado, la elongación de las espermátidas alargadas se produce gracias a un conjunto de factores que parecen involucrar al acrosoma, al acroplaxoma y a la *manchette* (Kierszenbaum *et al.*, 2003; Kierszenbaum *et al.*, 2004; Suzuki-Toyota *et al.*, 2004; Ito *et al.*, 2009).

En resumen, GOPC actúa en el transporte de las vesículas pre-acrosómicas hasta el acroplaxoma, lo que permite la fusión entre ellas. Sin embargo, cuando GOPC está ausente, este transporte no se produce, aunque el resto de proteínas de transporte de vesículas y proteínas sea funcional. Esto sugiere que GOPC puede tener un papel muy importante durante el tráfico vesicular en la red *trans*-Golgi, antes de actuar en el transporte de vesículas hacia la región acrosómica. También, al actuar de forma indirecta en la polaridad de la espermátida, pueden provocar que la célula no se alargue de la manera habitual debido a errores inducidos por la localización incorrecta del complejo acrosoma-acroplaxoma-*manchette*.

2. DISTRIBUCIÓN Y EXPRESIÓN DE GCNF EN LA ESPERMIOGÉNESIS

Gcnf es un represor de algunos genes, como *Oct4*, factor de transcripción requerido para mantener la pluripotencia en células madre. GCNF reprime la expresión de *Oct4* mediante su unión al motivo DR0 ubicado dentro del promotor de *Oct4* (Fuhrmann *et al.*, 2001; Guet *et al.*, 2011; Weikum *et al.*, 2016). En estudios con análisis mediante RT-PCR, Western Blot e inmunohistoquímica para microscopía óptica, GCNF se ha localizado desde los espermátocitos en paquiteno hasta las espermátidas del tipo S10, y se ha visto como luego la cantidad de proteína disminuye (Yang *et al.*, 2003). Otros trabajos han confirmado que los niveles más altos de GCNF se encuentran en las espermátidas redondas (Bauer *et al.*, 1998, Lan *et al.*, 2009, Kavarthapu y Dufau, 2015).

Hemos llevado a cabo un estudio de distribución y expresión de GCNF en la espermatogénesis en ratones de genotipo silvestre y *Gopc*^{-/-}. Los resultados del análisis mediante inmunohistoquímica para microscopía óptica nos han permitido observar la distribución de la proteína GCNF en el acrosoma durante su formación. Asimismo, el análisis de las inmunohistoquímicas con TEM ha revelado que GCNF se localiza en el núcleo, el acrosoma y la *manchette* de todos los tipos celulares de los estadios I, VIII y X del ciclo del túbulo seminífero. Nuestros resultados determinan que la expresión de GCNF no es exclusiva de las células haploides.

En la espermatogénesis de ratones C57BL/6, la concentración de GCNF en el núcleo de espermatogonias y espermátocitos fue constante. En la espermiogénesis, la concentración aumentó, como lo descrito anteriormente (Yang *et al.*, 2003), alcanzó un máximo en las espermátidas alargadas del tipo S13, y recuperó los niveles iniciales al final de la espermiogénesis. En el epitelio de los ratones *Gopc*^{-/-}, determinamos una concentración de GCNF en los núcleos de las células germinales mayor que en los ratones de genotipo silvestre. Así, la concentración de GCNF aumentó en los espermátocitos en leptoteno, para luego disminuir en las espermátidas redondas y aumentar nuevamente en las espermátidas globozoospermicas. Igualmente, hemos detectado mediante Western Blot que la alta expresión de GCNF en ratones *Gopc*^{-/-} se relaciona con una menor expresión de *Oct4*, al igual que la represión de la transcripción de los genes *Protamina 1* y *Protamina 2*, necesarios para condensación de la cromatina (Yan *et al.*, 1997; Hummelke y Cooney, 2001).

Por estos motivos, podemos deducir que los niveles altos de concentración de GCNF encontrados en los núcleos de las células en espermiogénesis de los ratones *knockout* podrían estar relacionados de alguna manera con el proceso de condensación de la cromatina. Las espermátidas globozoospermicas al tener el proceso de elongación defectuoso, la condensación de la cromatina se produce de manera poco eficaz, lo que induciría la expresión continua de *Gcnf*.

También hemos localizado GCNF en el acrosoma y en la *manchette*. En lo referente a los acrosomas y pseudoacrosomas, la cuantificación de GCNF en ambos tipos de ratones se ha realizado teniendo siempre en cuenta que estas dos estructuras tienen morfología bastante diferente. Por ese motivo se han relativizado los resultados al área del orgánulo. En los acrosomas del epitelio de ratones silvestres la dinámica de expresión de GCNF es constante. Además, GCNF se inmunolocalizó en la *manchette* de las espermátidas en elongación, lo que sugiere que hay un transporte intramanchette (IMT), y también, aunque en menor cantidad, en los flagelos de las espermátidas por lo que parece haber algo de transporte intraflagelar (IFT). Se han descrito muchas proteínas relacionadas con la *manchette* (revisadas en Chen *et al.*, 2016), la mayoría de ellas realizan funciones de transporte proteico, porque la *manchette*, además de actuar en la elongación de la cabeza de la espermátida, está involucrada en el transporte hacia la región posterior y al flagelo en formación, al igual que en el transporte núcleo-citoplasmático a través de los poros nucleares (Kierszenbaum y Tres, 2004).

Con estos datos podemos sugerir que, durante la espermiogénesis, el transporte de GCNF entre el acrosoma, núcleo y *manchette* están conectados. Nos basamos en estudios que han localizado la nucleoporina NUP62 asociada a la proteína motora KIFC1 (Yang *et al.*, 2006; Lehti y Sironen, 2016), localizada en las vesículas derivadas del aparato de Golgi hacia el acrosoma (Yang y Sperry, 2003). Por su parte, la proteína KIFC1 está regulada por la maquinaria Ran-GTPasa (Yang y Sperry, 2003), localizada también en la *manchette*, y actúa durante el transporte núcleo-citoplasmático a través de los complejos del poro de la envoltura nuclear (Kierszenbaum, 2002; Kierszenbaum *et al.*, 2002; Kierszenbaum *et al.*, 2011). Así, es posible que el transporte de GCNF se produzca mediante transporte citoplasmático hacia la región perinuclear y hacia la *manchette*, desde donde entra y sale del núcleo a través de los poros nucleares.

En los ratones *Gopc*^{-/-} la concentración de GCNF en los pseudoacrosomas fue sustancialmente mayor respecto a ratones

silvestres, con mayor concentración en las espermátidas del tipo S10 y S16. También está en mayor concentración en la *manchette* de las células en espermiogénesis, coincidiendo con su pico de concentración intranuclear. Este aumento de concentración puede ser debido a que la ausencia de GOPC provoca que haya transporte de proteínas por la *manchette* (Kierszenbaum *et al.*, 2003; Hayasaka *et al.*, 2008), y el exceso de GCNF sea transportado hasta el proteasoma 26S presente en esta estructura (Mochida *et al.*, 2000), para su eliminación. Otra hipótesis es que GOPC tenga alguna relación con el IMT de una forma similar a lo sugerido por Kierszenbaum *et al.* (2011) de la proteína GMAP210, presente en el aparato de Golgi, que parece interactuar con la proteína de transporte intraflagelar IFT88, esencial para la formación del flagelo. Cuando estas dos proteínas no están interaccionando, se produce una acumulación de la proteína GMAP210 en la *manchette*. Siguiendo esta línea, es posible que GOPC pueda interactuar de alguna forma con las proteínas de transporte citoplasmáticas, concretamente, con la miosina-Va, haciendo que, cuando GOPC no es funcional, el transporte de GCNF por los filamentos de actina se vea afectado y se acumule en la *manchette*.

Resumiendo, la localización ultraestructural de GCNF en los ratones globozoospermicos sugiere que la alta concentración de GCNF sea la causa de que la condensación de la cromatina esté ralentizada, lo que induciría que *Gcnf* continúe expresándose. Por otro lado, aunque la *manchette* este mal localizada, el transporte IMT no se ve afectado. Incluso se encuentra aumentado respecto a las espermátidas de genotipo normal, ya que GOPC podría influir en el IMT de una manera indirecta.

3. DISTRIBUCIÓN Y EXPRESIÓN DE SP56 EN LA ESPERMIOGÉNESIS

La proteína sp56 actúa en el reconocimiento de la proteína ZP3 de la zona pelúcida del oocito durante la reacción acrosómica (Bleil y Wassarman, 1990; Cheng *et al.*, 1994; Bookbinder *et al.*, 1995). Se localiza en la matriz del acrosoma (Guyonnet *et al.*, 2012), pero su expresión comienza en la fase de paquiteno y continúa durante toda la espermiogénesis (Kim *et al.*, 2001). No obstante, también se ha caracterizado como parte de la OAM, e incluso asociada a la membrana plasmática de los espermatozoides maduros (Cheng *et al.*, 1994; Suzuki-Toyota *et al.*, 1995; Cohen y Wassarman, 2001) ya que tras la capacitación se localiza en la superficie del espermatozoide (Buffone *et al.*, 2008; Wassarman, 2009). Cabe destacar que las publicaciones sobre esta proteína se centran en su localización en los espermatozoides maduros y no tanto en su expresión durante la espermiogénesis.

En este estudio mediante inmunodetección de la proteína sp56 hemos analizado su localización y distribución mediante microscopía óptica y TEM, en el ciclo del túbulo seminífero de ratones C57BL/6 y *Gopc*^{-/-}. Con microscopía óptica, hemos localizado sp56 en el acrosoma en formación de todos los tipos de espermátidas. No hemos localizado sp56 en las espermatogonias y tampoco en las células en fase de meiosis, similar a lo observado por Bookbinder *et al.* (1995). Sin embargo, se ha descrito que la síntesis de sp56 comienza en la fase de paquiteno (Kim *et al.*, 2001), lo que difiere con nuestros resultados. Aun así, nosotros sugerimos que la expresión de sp56 es exclusiva de las células haploides.

En la espermiogénesis de ratones C57BL/6 el análisis ultraestructural nos ha permitido observar que la concentración de sp56 en los acrosomas de las espermátidas es constante. Sin embargo, Kim *et al.*, (2001) mediante Western Blot determinaron que la concentración de sp56 aumenta durante la espermatogénesis, hasta obtener un pico máximo de concentración en espermatozoides maduros, ya que observaron que la mayor concentración de esta proteína se encuentra en el extracto proteico de los espermatozoides totalmente formados, comparándolo con los extractos de espermátidas redondas y alargadas, cuyas cantidades proteicas eran similares. En nuestros resultados de Western Blot en extracto total de testículo, observamos sp56 a una altura de 65KDa, igual que lo descrito en la bibliografía referente a los espermatozoides (Kim *et al.*, 2001; Buffone *et al.*, 2009), sin diferencias apreciables entre ambos tipos de ratones. Las diferencias se

observaron en la expresión génica, cuantificada mediante análisis de RT-qPCR. En el epitelio seminífero de *Gopc*^{-/-} hay una expresión génica mucho mayor que en ratones silvestres. Esto puede ser debido a que, como ya se ha comentado en el punto dos de esta Discusión, al estar afectada la elongación de la cabeza de la espermátida, la condensación poco eficaz de la cromatina puede estar afectando de alguna manera la expresión de *Sp56*.

En los ratones *Gopc*^{-/-}, hemos observado que la dinámica de concentración de sp56 en los pseudoacrosomas es mayor que en los acrosomas de ratones de genotipo silvestre, aunque las diferencias estadísticas sólo son observables en las espermátidas S15. También con microscopía óptica hemos observado sp56 en el citoplasma de las espermátidas entre los tipos S1 a S11 de ratones C57BL/6, pero desde los tipos S12 a S16, su localización ha sido exclusiva del acrosoma de las espermátidas alargadas. No obstante, el análisis ultraestructural ha revelado que sp56 también se localiza en el citoplasma de las espermátidas alargadas, aunque en menor concentración que en las espermátidas redondas. Hay que destacar que no hemos observado esta proteína en la *manchette* de las espermátidas en elongación en ninguno de los dos tipos de ratones.

El análisis de los citoplasmas de las espermátidas de ratones silvestres ha revelado que la dinámica de expresión de sp56 es constante, menos en el comienzo de la espermiogénesis entre los tipos S5 a S9, donde la concentración de sp56 disminuye. Localizamos esta proteína tanto en el aparato de Golgi, como distribuida por todo el citoplasma. Esta distribución periférica sugiere que sp56 comienza a traducirse en los ribosomas mientras se introduce en el retículo endoplásmico rugoso (rER), donde se glucosila y forman los puentes disulfuro (Alberts *et al.*, 2007; Karp, 2011). A continuación, sp56 sería transportada al aparato de Golgi y desde aquí, empaquetada en vesículas para ser enviada al acrosoma en formación. Sin embargo, esta vía de transporte de sp56 no explica la amplia distribución que hemos observado por todo el citoplasma. La hipótesis que barajamos es que sp56, después de madurar en el aparato de Golgi, es empaquetada en vesículas que son almacenadas en el citoplasma hasta que son requeridas para formar el acrosoma. Esta hipótesis la sustentamos en que se ha postulado una vía de formación del acrosoma desde la vía lisosómica, que se compaginaría con la vía de transporte de vesículas pre-acrosómicas directas desde el aparato de Golgi. Esta hipótesis señala que el acrosoma es una vesícula similar a los lisosomas (LRO), formada a partir de una vesícula principal desde donde se forman las

vesículas pre-acrosómicas (revisado en Berruti y Paiardi, 2011). También se ha localizado en el acrosoma ya formado la bomba de protones específica de testículo (Sun-Wada *et al.*, 2004) y USP/UBP γ con su receptor de membrana MET, proteínas de membrana de vesículas pertenecientes a la vía endocítica (Berruti y Paiardi, 2015). Incluso las proteínas KIFC1 y Rab27a, sobre las cuales se ha hablado anteriormente, se han visto asociadas a vesículas relacionadas con los lisosomas (Raposo *et al.*, 2007; Mukhopadhyay *et al.*, 2011). Moreno *et al.*, (2000b) también han observado que, además del aparato de Golgi y del acrosoma en formación, cerca de la región acrosómica hay otras vesículas con pH ácido, característica de los lisosomas, y también han localizado en las vesículas pre-acrosómicas, proteínas que están relacionadas con esta vía de transporte de vesículas intracelulares, como por ejemplo la clatrina, COP (Moreno *et al.*, 2000a), y las SNARE (Ramalho-Santos *et al.*, 2001). Las proteínas COP y clatrininas son señalizadoras para transporte de vesículas, y las de la familia SNARE de fusión de membranas (Karp, 2011). Sin embargo, se ha visto que algunas proteínas específicas de esta vía son retiradas del acrosoma a medida que la espermátida redonda se va diferenciando, mediante un transporte retrógrado de vesículas hacia la vía lisosómica, probablemente para su eliminación (Moreno *et al.*, 2000a).

Aunque el acrosoma sea un orgánulo tan especializado, es lógico que las proteínas de transporte y fusión de la vía lisosómica estén presentes en las vesículas pre-acrosómicas, debido a que estos mecanismos están muy conservados en todos los tipos celulares. Sin embargo, en nuestro análisis mediante TEM no hemos visualizado sp56 asociada a vesículas en el citoplasma ya que el contraste con osmio es incompatible con la inmunocitoquímica con oro, por lo que no permite ver todas las estructuras intracelulares. Aunque nuestros resultados apuntan que no todas las proteínas siguen el mismo patrón de transporte hacia el acrosoma, no podemos concluir que el transporte de sp56 hacia el acrosoma se realice en vesículas tipo lisosoma.

En relación con el epitelio seminífero de los ratones *Gopc*^{-/-}, la concentración de sp56 en los citoplasmas de las espermátidas aumentó notablemente entre los tipos S5 a S13, pero en comparación con los ratones silvestres, hay menor expresión de sp56 en los citoplasmas de espermátidas S5 y mayor en S15, este último coincidiendo con su pico de concentración en los pseudoacrosomas. En la espermiación de los ratones *Gopc*^{-/-} el exceso de citoplasma no se elimina de forma correcta ya que uniones celulares con las células de Sertoli, como las especializaciones ectoplásmicas, no se encuentran bien formadas (Ito *et*

al., 2004, Lu *et al.*, 2015), al igual que en los ratones *Zbp1*^{-/-} (Lin *et al.*, 2007). Por este motivo, las espermátidas globozoospérmicas aun tienen los restos citoplasmáticos adheridos, mientras que en las espermátidas silvestres ya se han eliminado. El aumento de la expresión de sp56 podría ser debido a que las espermátidas globozoospérmicas maduras tienen tanta cantidad de citoplasma como las espermátidas de estadios anteriores, por lo que las señales celulares que reciben son pertenecientes a los tipos celulares anteriores, lo que provoca que la traducción de esta proteína aún este activa (Greenbaum *et al.*, 2003).

En resumen, la síntesis de sp56 en la espermiogénesis es posible que comience en los ribosomas mientras entra en el rER para la síntesis, configuración y glucosilación de la proteína y desde aquí sea transportada al aparato de Golgi para ser empaquetada y almacenada en vesículas pertenecientes a la vía lisosómica. Igualmente, en los ratones *Gopc*^{-/-} la expresión de esta proteína es mayor ya que las uniones de las espermátidas globozoospérmicas con las células de Sertoli no están bien formadas, por lo que el exceso de citoplasma no se elimina correctamente y la proteína continúa expresándose en los restos citoplasmáticos aún adheridos a la espermátida.

4. LA ESPERMIOGÉNESIS EN RATONES TRAS MICROINYECCIÓN INTRATESTICULAR DE ANTI-GOPC

En las células germinales masculinas, la proteína GOPC, como ya se ha comentado, está localizada en la región *trans*-Golgi y forma parte del transporte de las vesículas pre-acrosómicas desde el aparato de Golgi hacia la región perinuclear para la formación del acrosoma. Cuando GOPC está ausente, este transporte no se produce y las vesículas pre-acrosómicas no se fusionan, lo que provoca la aparición de los pseudoacrosomas (Ito *et al.*, 2004; Kierszenbaum *et al.* 2004; Chemes y Álvarez-Sedo, 2012). GOPC también tiene funciones importantes en células somáticas (Chares *et al.* 2001; Neudauer *et al.* 2001; Cheng *et al.* 2002), por lo que los ratones *knockout* para esta proteína tienen varios problemas sistémicos, dificultades para procrear y baja tasa de supervivencia.

La técnica de microinyección intratesticular es ampliamente utilizada en estudios de fertilidad masculina, en los cuales durante el llenado de los túbulos seminíferos se utiliza Azul tripán (Ogawa *et al.*, 1997; Lu *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2009; Hermman *et al.*, 2012; Medrano *et al.*, 2014). En nuestro caso, hemos microinyectado un anticuerpo que bloquea la acción de la proteína GOPC *in vivo*, para obtener espermátidas globozoospermicas, junto con el colorante Azul de bromofenol. Este colorante también ha sido microinyectado en solitario para ser utilizado como control negativo y hemos observado que el Azul de bromofenol no provoca efectos secundarios ni afecta al correcto desarrollo de la espermiogénesis.

Nuestros resultados muestran que la estructura del epitelio seminífero de los ratones tras microinyección intratesticular de anti-GOPC, analizada mediante microscopía óptica, se mostraba rota en algunos de los túbulos, de manera que era difícil diferenciar los compartimentos basal y adluminal de los túbulos. En uno de los primeros trabajos en los que se utilizó la microinyección intratesticular para estudiar la espermatogénesis observaron que esta técnica provocaba una inflamación del tejido, así como la infiltración de monocitos y leucocitos en el epitelio seminífero (Mancini *et al.*, 1974). Nosotros no hemos encontrado infiltraciones de células del sistema inmune en el epitelio seminífero y las células de Sertoli mostraron una morfología normal, lo que sugiere que la Barrera Hemato-testicular no ha resultado afectada. Otro estudio similar al nuestro es el de Primakoff *et al.* (1997) en el que inyectaron un anticuerpo anti-PH-20, contra una proteína del acrosoma y provocaron infertilidad reversible en cobayas

macho, aunque también observaron inflamación en el tejido y ausencia de espermatozoides en el epidídimo (Tung *et al.*, 1997). Sin embargo, en estudios posteriores, en los que se introdujeron tanto anticuerpos para bloquear una proteína específica, como células germinales que migraban hasta el compartimento basal del epitelio seminífero donde conseguían diferenciarse a espermátidas alargadas, no se describen estas afecciones (Brinster y Avarbrok, 1994; Brinster y Zimmerman, 1994; Ogawa *et al.*, 1997; Hermann *et al.*, 2012; Medrano *et al.*, 2014). Esta forma de utilizar la técnica de la microinyección intratesticular para introducir células germinales y repoblar los túbulos seminíferos se podría utilizar en pacientes con cáncer o afecciones de testículo, para recobrar la producción espermática. Incluso podría utilizarse para crear un modelo experimental en el cual se introduzcan en el testículo de individuos de genotipo silvestre células germinales modificadas genéticamente (Lu *et al.*, 2006; Medrano *et al.*, 2014).

En este trabajo, hemos analizado distintos aspectos relacionados con la biogénesis del acrosoma. Con la tinción PAS se observó que la localización de glicoproteínas, así como su distribución en los ratones microinyectados con anti-GOPC, era similar a la de los ratones *Gopc*^{-/-}. Las espermátidas en proceso de elongación en ambos tipos de ratones tenían una estructura irregular semejante, aunque algunas de las espermátidas entre los tipos S11-S16 de los ratones con anti-GOPC mostraron morfología alargada, lo que hace suponer que habían pasado por un proceso normal de espermiogénesis. Así, se observaron espermátidas entre los tipos S13 a S16 con morfología variada, tanto alargadas como con forma globular cerca de la luz de los túbulos seminíferos. Este hecho indica que la microinyección de anti-GOPC en estas condiciones ha provocado una globozoospermia parcial.

Por su parte, la inmunolocalización de las proteínas acrosómicas Acrosina, GCNF y sp56 también nos ha permitido observar la acción de la microinyección intratesticular de anti-GOPC durante la espermatogénesis. Los acrosomas de las espermátidas de los estadios V y VIII, representativos de las fases de casquete y acrosómica de la espermatogénesis, mostraron morfologías diferentes dentro del mismo tubo seminífero. La morfología de algunos de los acrosomas fue semejante a la de los ratones *Gopc*^{-/-}, con un pseudoacrosoma sin recubrir la parte anterior del núcleo, mientras que otros tenían morfología alargada, parecida a la de los ratones silvestres. Esto contrasta con lo descrito por Li *et al.*, (2009). En este trabajo microinyectaron anti-DYDC1 en los túbulos seminíferos de ratones y lograron bloquear la formación del acrosoma en más de un 50% de las

espermátidas analizadas. Es posible que nuestra concentración de anti-GOPC utilizada en la microinyección sea demasiado baja para provocar el bloqueo de la biogénesis del acrosoma en todas las espermátidas.

El análisis de la espermiogénesis, entre los estadios IX-XII del ciclo del túbulo seminífero nos ha permitido observar la acción de anti-GOPC en la elongación de las espermátidas redondas en los ratones tras microinyección intratesticular de anti-GOPC. La distribución de las proteínas GCNF y sp56 fue similar a lo observado en los ratones *Gopc*^{-/-}, cuyo análisis se ha realizado en los puntos 2 y 3 de esta Discusión.

El análisis ultraestructural de las células del epitelio seminífero tras microinyección de anti-GOPC mostró más evidencias en las similitudes con el fenotipo globozoospermico. En primer lugar, se observó que las espermatogonias tenían morfología normal y los espermatocitos presentaban el núcleo más grande de lo habitual, sin las cisternas citoplasmáticas descritas por Toyama *et al.*, (2013). No obstante, estas cisternas las observaron a las cuatro horas de realizar la microinyección y en nuestro estudio se ha esperado 35 días para analizar la ultraestructura del epitelio seminífero. Igualmente, se observan los acrosomas elongados aunque irregulares y los núcleos con invaginaciones no habituales, lo que provoca que los acroplaxomas no se encuentren unidos a ellos, similar a lo descrito por Kierszenbaum *et al.*(2004), Ito *et al.* (2004) e Ito *et al.* (2009). La *manchette* también se visualizó localizada de forma ectópica o invaginada en el núcleo de algunas de las espermátidas en elongación, como ocurre en las espermátidas globozoospermicas (Ito *et al.* 2004).

En este estudio se ha seleccionado la proteína GOPC como diana para impedir el correcto desarrollo de las espermátidas. Aun así, en la bibliografía hay descritas varias proteínas que se consideran buenas dianas para este tipo de estudios. Entre estas proteínas se encuentran SP-10 (Coonrod *et al.*, 1996), Ecuatorina (Yoshinaga *et al.*, 2001), Izumo (Naz, 2014), o incluso sp56 (Hardy y Mobbs, 1999; Hardy *et al.*, 2004), entre otras. No obstante, el bloqueo mediante anticuerpos de estas proteínas espermáticas se ha realizado con espermatozoides ya maduros *in vitro*, y en modelos experimentales hembra, provocando una respuesta inmune en el organismo que se activa cuando los espermatozoides ya se encuentran en el tracto reproductor femenino, con el objetivo de impedir la fecundación del ovocito.

Por otro lado, hay otros ejemplos de respuesta inmunitaria en modelos experimentales macho teniendo como diana una proteína de espermatozoides. Por ejemplo, en un trabajo inmunizaron a los animales del estudio contra la proteína Eppin, la cual quedó bloqueada (O'Rand *et al.*, 2004; Yan *et al.*, 2015; O'Rand *et al.*, 2016). También bloquearon una glicoproteína, denominada en los estudios 80kDa HSA, cuya unión a anticuerpos específicos provoca pérdida de motilidad y aglutinación de los espermatozoides en el epidídimo (Bandivdekar *et al.*, 2005; Khobarekar *et al.*, 2008). Pero no solo se están realizando estudios dirigidos al bloqueo de proteínas acrosómicas, sino también hacia proteínas de la Barrera Hemato-testicular (Chung *et al.*, 2001; Siu y Cheng, 2004; Siuet *et al.*, 2005; Toyama *et al.*, 2008), para evitar que se formen las uniones entre las células de Sertoli y las células germinales, y así interrumpir la espermatogénesis.

Aunque se acaban de describir varios ejemplos de estudios de inhibición de la fertilidad, la mayoría de estos trabajos se centran en el bloqueo de proteínas espermáticas de espermatozoides tanto *in vitro*, como en hembras. Pero son pocas las investigaciones centradas en desarrollar nuevos métodos anticonceptivos para el hombre que sean no hormonales, eficaces, reversibles y sin efectos secundarios. Además, ningún método actualmente en desarrollo ha sido probado en humanos (Amory, 2016), y si nos centramos en el bloqueo de la espermatogénesis, los trabajos se centran en romper la Barrera Hemato-testicular, una forma indirecta de impedir la correcta espermatogénesis. Los resultados preliminares obtenidos en este trabajo, junto con la bibliografía citada en este punto, dejan entrever que el bloqueo de la espermiogénesis *in vivo* es una vía de investigación con la que se pueden lograr resultados muy prometedores.

Resumiendo, podemos señalar que la microinyección intratesticular de anti-GOPC en ratones de genotipo silvestre provoca la formación de pseudoacrosomas en algunas espermátidas, aunque otras presentan el acrosoma cubriendo la parte anterior del núcleo pero sin estar totalmente anclado, debido a que el acroplaxoma no se encuentra bien localizado. La *manchette* también se ha podido observar invaginada en el núcleo o localizada ectópicamente. Sin embargo, algunas de las espermátidas han pasado por un proceso normal de espermiogénesis por lo que se ha obtenido una globozoospermia parcial.

VI. CONCLUSIONES

1. La proteína GCNF se localiza en el núcleo de todas las células espermatogénicas y en el acrosoma y la *manchette* de todas las espermátidas. Se transporta por la *manchette* hacia el núcleo y hacia el axonema. En ausencia de GOPC, GCNF se acumula en la *manchette*.
2. La proteína sp56 se localiza exclusivamente en los acrosomas en formación y en el citoplasma de las espermátidas, lo que sugiere que sp56 se empaqueta y almacena en vesículas que contribuyen a formar el acrosoma por la vía lisosómica. En ausencia de GOPC, sp56 se acumula en los restos citoplasmáticos adheridos a las espermátidas globozoospermicas.
3. En ratones globozoospermicos *Gopc*^{-/-}, el transporte de las vesículas pre-acrosómicas entre el aparato de Golgi y la región perinuclear y el transporte proteico intramanchette están afectados, lo cual puede deberse a que GOPC interacciona con la proteína motora miosina-Va.
4. La ausencia de GOPC produce la deslocalización del complejo acrosoma-acroplaxoma-manchette durante su formación, lo que conlleva un fallo en la polaridad de las espermátidas.
5. La microinyección intratesticular de 1µg del anticuerpo anti-GOPC provoca una globozoospermia parcial, ya que se observan espermátidas normales y globozoospermicas. Este bloqueo de GOPC *in vivo* provoca fallos en la formación del acroplaxoma y la localización de la *manchette*, así como una condensación nuclear defectuosa de algunas de las células espermiogénicas.
6. La distribución de las proteínas GCNF y sp56 en las células espermatogénicas de ratones con microinyección intratesticular de anti-GOPC es similar a la de los ratones *Gopc*^{-/-}.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Abou-Haila A, Tulsiani DR. *Mammalian sperm acrosome: formation, contents, and function*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2000; 379(2):173-182.
- Adamali HI, Somani IH, Huang JQ. *Abnormalities in cells of the testis, efferent ducts, and epididymis in juvenile and adult mice with beta-hexosaminidase A and B deficiency*. Journal of Andrology, 1999; 20:779-802.
- Agarwal A, Mulgund A, Hamada A, Chyatte MR. *A unique view on male infertility around the globe*. Reproductive Biology and Endocrinology, 2015.
- Agoulnika IY, Chob Y, Niederberger C, Kiebacka DG, Cooney AJ. *Cloning, expression analysis and chromosomal localization of the human nuclear receptor gene GCNF*. Federation of European Biochemical Societies Letters, 1998; 424:73-78.
- Albets B, Bray D, Hopkin K, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Compartimentos y transporte intracelular*. En: *Introducción a la Biología Celular*, Albets B, Bray D, editores, Editorial Médica Panamericana, 2007; pp. 497-533.
- Allen MJ, Lee C, Lee IV JD, Pogany GC, Balooch M, Siekhaus WJ. *Atomic force microscopy of mammalian sperm chromatin*. Chromosoma. 1993; 102:623-630.
- Altman LG, Schneider BG, Papermaster DS. *Rapid embedding of tissues in Lowicryl K4M for immunoelectron microscopy*. Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 1984; 32(11):1217-1223.
- Alvarez JG, Storey BT. *Spontaneous lipid peroxidation in rabbit epididymal spermatozoa: Its effects on sperm motility*. Biology of Reproduction, 1982; 27:1102-1108.
- Anakwe OO, Sharma S, Hoff HB, Hardy DM, Gerton GL. *Maturation of guinea pig sperm in the epididymis involves the modification of proacrosin oligosaccharide side chains*. Molecular Reproduction and Development, 1991; 29: 294-301.
- Anton-Lamprecht I, Kotzur B, Schopf E. *Round headed human spermatozoa*. Fertility and Sterility, 1976; 27: 685-693.
- Baba T, Niida Y, Michikawa Y, Kashiwabara SI, Kodaira K, Takenaka M, Kohno N, Gerton GL, Arai Y. *An acrosomal protein, sp32, in mammalian sperm is a binding protein specific for two proacrosins and an acrosin intermediate*. The Journal of Biological Chemistry, 1994; 269:10133-10140.
- Baccetti B, Renieri T, Rosati F, Selmi MG, Casanova S. *Further observations on the morphogenesis of the round headed human spermatozoa*. Andrologia, 1977; 9:255-264.
- Balhorn R, Brewer L, Corzett M. *DNA condensation by protamine and arginine-rich peptides: analysis of toroid stability using single DNA molecules*. Molecular Reproduction and Development, 2000; 56:230-234.
- Bandivdekar AH, Vernekar VJ, Kamada M, Raghava VP. *Antifertility effect of passive administration of antibodies to 80kDa human sperm antigen and its synthetic peptides in male and female rats*. American Journal of Reproductive Immunology, 2005; 54:332-341.
- Bauer UM, Schneider-Hirscha S, Reinhardt S, Benaventeb R, Maelicke A. *The murine nuclear orphan receptor GCNF is expressed in the XY body of primary spermatocytes*. Federation of European Biochemical Societies Letters, 1998; 208:208-214.
- Bellvé AR, O'Brien DA. *The mammalian spermatozoon: structure and temporal assembly*. En: *Mechanism and control of animal fertilization*. Hartmann JF, editores, Academic Press Inc., New York, 1983; pp. 55-137.

- Benoit J. *Recherches anatomiques, cytologiques et histophysiologiques sur les voies excrétrices du testicule chez les mammifères*. Archives d'anatomie, d'histologie et d'embryologie, 1926; 5:173–412.
- Bermudez D, Escalier D, Gallo JM, Viellefond A, Rius F, Perez de Vargas I, Schrevel J. *Proacrosin as a marker of meiotic and post-meiotic germ cell differentiation: Quantitative assessment of human spermatogenesis with a monoclonal antibody*. Journal of Reproduction and Fertility, 1994; 100:567–575.
- Berruti G, Paiardi C. *Acrosome biogenesis. Revisiting old questions to yield new insights*. Landes Biosciences, Spermatogenesis, 2011; 1:95-98.
- Berruti G, Paiardi C. *USP8/UBPy-regulated sorting and the development of sperm acrosome: the recruitment of MET*. Reproduction, 2015; 149:633-644.
- Bleil JD, Wassarman PM. *Identification of a ZP3 binding protein on acrosome intact mouse sperm by photoaffinity crosslinking*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1990; 87:5563–5567.
- Bookbinder LH, Cheng A, Bleil JD. *Tissue- and species-specific expression of sp56, a mouse sperm fertilization protein*. Science, 1995; 269:86–89.
- Bose R, Manku G, Culty M, Wing SS. Ubiquitin–proteasome system in spermatogenesis. En: *Posttranslational protein modifications in the Reproductive System*. Sutovsky P, editores, Springer, New York, 2014; pp. 181-213.
- Braun RE. *Packaging paternal chromosomes with protamine*. Nature Genetics, 2001; 28:10–12.
- Brinster RL, Avarbock MR. *Germline transmission of donor haplotype following spermatogonial transplantation*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1994; 91:11303-11307.
- Brinster RL, Zimmermann JW. *Spermatogenesis following male germ-cell transplantation*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1994; 91:11298-11302.
- Buffone MG, Foster JA, Gerton GL. *The role of the acrosomal matrix in fertilization*. The International Journal of Developmental Biology, 2008; 52:511–522.
- Buffone MG, Kim KS, Doak BJ, Rodriguez-Miranda E, Gerton GL. *Functional consequences of cleavage, dissociation and exocytotic release of ZP3R, a C4BP-related protein, from the mouse sperm acrosomal matrix*. Journal of Cell Science, 2009; 122(17):3153-3160.
- Cates W, Farley TM, Rowe PJ. *Worldwide patterns of infertility: is Africa different?* The Lancet, 1985; 326:596-598.
- Clermont Y. *Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal*. Physiological Reviews, 1972; 52: 345–354.
- Chalmel F, Lardenois A, Evrard B, Mathieu R, Feig C, Demougin P, Gattiker A, Schulze W, Jégou B, Kirchhoff C, Primig M. *Global human tissue profiling and distinct levels of transcriptional germline-specificity and identifies target genes for male infertility*. Human Reproduction, 2012; 27(11):3233-3248.
- Chang MC. *Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes*. Nature, 1951; 168:697-698.
- Chao J, Page ST, Anderson RA. *Male contraception*. Best Practice and Research Clinical Obstetrics and Gynaecology, 2014; 28:845-857.
- Charest A, Lane K, McMahon K, Housman DE. *Association of a novel PDZ domain-containing peripheral Golgi protein with the Q-SNARE (Q-soluble N-*

- Ethylmaleimide-sensitive fusion protein (NSF) attachment protein receptor) protein syntaxin-6*. Journal of Biological Chemistry, 2001; 276(31):29456–29465.
- Chemes HE, Álvarez-Sedo C. *Tales of the tail and sperm headaches. Changing concepts on the prognostic significance of sperm pathologies affecting the head, neck and tail*. Asian Journal of Andrology, 2012; 14:14-23.
- Chen F, Cooney AJ, Wang Y, Law SW, O'Malley BW. *Cloning of a novel orphan receptor (GCNF) expressed during germ cell development*. Molecular Endocrinology, 1994; 8:1434-1444.
- Cheng A, Le T, Palacios M, Bookbinder LH, Wassarman PM, Suzuki F, Bleil JD. *Sperm-egg recognition in the mouse: characterization of sp56, a sperm protein having specific affinity for ZP3*. Journal of Cell Biology, 1994; 125:867–878.
- Cheng CY, Mruk DD. *Cell junction dynamics in the testis: Sertoli-germ cell interactions and male contraceptive development*. Physiological Reviews, 2002; 82:825-874.
- Cheng J, Moyers BD, Milewski M, Loffing J, Ikeda M, Mickel JE, Cutting GR, Li M, Stanton BA, Guggino WB. *A Golgi-associated PDZ domain protein modulates cystic fibrosis transmembrane regulator plasma membrane expression*. Journal of Biological Chemistry, 2002; 277:3520–3529.
- Cheng J, Wang H, Guggino WB. *Modulation of mature cystic fibrosis transmembrane regulator protein by the PDZ domain protein CAL*. The Journal of Biological Chemistry, 2004; 279:1892-1898.
- Cheng J, Wang H, Guggino WB. *Regulation of cystic fibrosis transmembrane regulator trafficking and protein expression by a Rho Family small GTPase TC10*. The Journal of Biological Chemistry, 2005; 280:3731-3739.
- Chung NPY, Mruk D, Mo M, Lee WM, Cheng CY. *A 22-Amino acid synthetic peptide corresponding to the second extracellular loop of rat occludin perturbs the Blood-Testis Barrier and disrupts spermatogenesis reversibly in vivo*. Biology of Reproduction, 2001; 65:1340-1351.
- Chung AC, Katz D, Pereira FA, Jackson KJ, DeMayo FJ. *Loss of orphan receptor germ cell nuclear factor function results in ectopic development of the tail bud and a novel posterior truncation*. Molecular and Cellular Biology, 2001; 21: 663–677.
- Christensen GL, Ivanov IP, Atkins JF, Campbell B, Carrel DT. *Identification of polymorphisms in the Hrb, Gopc and Csnk2a2 genes in two men with globozoospermia*. Journal of Andrology, 2006; 27:11-15.
- Cohen N, Wassarman PM. *Association of egg zona pellucida glycoprotein mZP3 with sperm protein sp56 during fertilization in mice*. The International Journal of Developmental Biology, 2001; 45: 569-576.
- Coonrod SA, Herr JC, Westhusin ME. *Inhibition of bovine fertilization in vitro by antibodies to SP-10*. Journal of Reproduction and Fertility, 1996; 107:287-297.
- Courtens JL, Courot M, Fléchon JE. *The perinuclear substance of boar, bull, rams and rabbit spermatozoa*. Journal of Ultrastructure Research, 1976; 57:54-64.
- Coutton C, Escoffier J, Martinez G, Arnoult C, Ray PF. *Teratozoospermia: spotlight on the main genetic actors in the human*. Human Reproduction Update, 2015; 1:1-35.
- Dacheux JL, Castella S, Gatti LJ, Dacheux F. *Epididymal cell secretory activities and the role of the proteins in boar sperm epididymis*. Theriogenology, 2005; 63(2)319-341.
- Dam AH, Feenstra I, Westphal JR, Ramos L, Van Golde RJ, Kremer JA. *Globozoospermia revisited*. Human Reproduction Update, 2007; 13:63-75.

- Dam AH, Kosciński I, Kremer JA, Moutou C, Jaeger AS, Oudakker AR, Tournaye H, Charlet N, Lagier-Tourenne C, van Bokhoven H. *Homozygous mutation in SPATA16 is associated with male infertility in human globozoospermia*. American Journal of Human Genetics, 2007; 81:813–820.
- Dam AH, Ramos L, Dijkman HB, Woestenenk R, Robben H, Van den Hoven L, Kremer JA. *Morphology of partial globozoospermia*. Journal of Andrology, 2011; 32: 199-206.
- Davidoff MS, Breucker H, Holstein AF, Seidl K. *Cellular architecture of the lamina propria of human seminiferous tubules*. Cell and Tissue Research, 1990; 262:253-261.
- De Braekeleer M, Nguyen MH, Morel F, Perrin A. *Genetic aspect of monomorphic teratozoospermia: a review*. Journal of Assisted Reproduction and Genetics, 2015; 32:615-623.
- De Kretser DM, Kerr JB. The cytology of the testis. En: *The Physiology of Reproduction*, Knobil E, Neill JD, editores, Raven Press Ltd. (New York), 1988; pp. 837-932.
- De Lamirande E, Gagnon C. Reactive oxygen species and human spermatozoa. *Effects on the motility of intact spermatozoa and on sperm axonemes*. Journal of Andrology, 1992; 13:368–378.
- De Paul AL, Mukdsi JH, Petiti JP, Gutiérrez S, Quintar AA, Maldonado CA, Torres AI. Immunoelectron Microscopy: A Reliable Tool for the Analysis of Cellular Processes. En: *Applications of immunocytochemistry*, Dehghani H, editores, InTech, 2012; pp. 65-96.
- Duarte J, Perriere G, Laudet V, Robinson-Rechavi M. *NUREBASE: Database of nuclear hormone receptors*. Nucleic Acids Research, 2002; 30:364–368.
- Eddy EM. The spermatozoon. En: *The physiology of reproduction*, Knobil E, Neill J, editores, Raven Press (New York); 2006. pp. 3–54.
- Escalier D. *Failure of differentiation of the nuclear-perinuclear skeletal complex in the round-headed human spermatozoa*. International Journal of Developmental Biology, 1990; 34:287-297.
- Escalier D, Gallo JM, Albert M, Meduri G, Bermudez D, David G, Schrevel J. *Human acrosome biogenesis: immunodetection of proacrosin in primary spermatocytes and of its partitioning pattern during meiosis*. Development, 1991; 113:779–788.
- Esteban-Ruiz FJ, Calvo-González A, Montuenga-Badía L. Técnicas citoquímicas e histoquímicas. En: *Técnicas en Histología y Biología celular*, Esteban-Ruiz FJ, Calvo-González A, Montuenga-Badía L, editores, Elsevier Masson, 2009; pp. 95-117.
- Fawcett DW, Ito S, Slutterback D. *The occurrence of intercellular bridges in groups of cells exhibiting synchronous differentiation*. Journal of Biophysics Biochemical Cytology, 1959; 5(3):453-460.
- Fawcett DW. *A comparative view of sperm ultrastructure*. Biology of Reproduction, 1970; 2(Suppl.):90-127.
- Fawcett DW. *The mammalian spermatozoon*. Developmental Biology, 1975; 44:394–436.
- Ferrer M, Rodriguez H, Zara L, Yu Y, Xu W, Oko R. *MMP2 and acrosin are major proteinases associated with the inner acrosomal membrane and may cooperate in sperm penetration of the zona pellucida during fertilization*. Cell and Tissue Research, 2012; 349:881–895.

- Feng HL. *Molecular biology of male infertility*. Archives of Andrology, 2003; 49(1):19-27.
- Frenkenthaler F, Windschüttl S, Fröhlich T, Schwarzer JU, Mayerhofer A, Arnold GJ. *Secretome analysis of testicular peritubular cells: a window into the human testicular microenvironment and the spermatogonial stem cell niche in man*. Journal of Proteome Research, 2014; 13:1259-1269.
- Fuhrmann G, Chung AC, Jackson KJ, Hummelke G, Baniahmad A, Sutter J, Sylvester I, Schöler HR, Cooney AJ. *Mouse germline restriction of Oct4 expression by germ cell nuclear factor*. Developmental Cell, 2001; 1(3):377-387.
- Garrido G, Rabasa A, Sánchez B, López MV, Blanco R, López A, Hernández DR, Pérez R, Fernández LE. *Induction of immunogenic apoptosis blockade of Epidermal Growth Factor Receptor activation with a specific antibody*. The Journal of Immunology, 2011; 187:4954-4966.
- Gentzsch M, Chang XB, Cui L, Wu Y, Ozols VV, Choudhury A, RE Pagano, Riordan JR. *Endocytic trafficking routes of wild type and $\Delta F508$ cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*. Molecular Biology of the Cell, 2004; 15:2684-2696.
- Greenbaum D, Colangelo C, Williams K, Gerstein M. *Comparing protein abundance and mRNA expression levels on a genomic scale*. Genome Biology, 2003; 4(9):117.1-117.8
- Grell RF, Oakberg EF, Generoso EE. *Synaptonemal complexes at premeiotic interphase in the mouse spermatocyte*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1980; 77(11):6720-6723.
- Göb E, Schmitt J, Benavente R, Alsheimer M. *Mammalian sperm head formation involves different polarization of two novel LINC complexes*. Plos One, 2010; 5(8):e12072.
- Gu P, Xu X, Le Menuet D, Chung AC, Cooney AJ. *Differential recruitment of methyl CpG-binding domain factors and DNA methyltransferases by the orphan receptor germ cell nuclear factor initiates the repression and silencing of Oct4*. Stem Cells, 2011; 29(7):1041-1051.
- Gudi R, Zou C, Li J, Gao Q. *Centrobin-tubulin interaction is required for centriole elongation and stability*. The Journal of cell biology, 2011; 193:711-725.
- Guembe-Echarri L. Técnicas Inmunohistoquímicas. En: *Técnicas en Histología y Biología celular*, Esteban-Ruiz FJ, Calvo-González A, Montuenga-Badía L, editores, Elsevier Masson, 2009; pp. 119-148.
- Guttman JA, Takai Y, Vogl AW. *Evidence that tubulobulbar complexes in the seminiferous epithelium are involved with internalization of adhesion junctions*. Biology of Reproduction, 2004; 71:548-559.
- Guyonnet B, Zabet-Moghaddam M, San Francisco S, Cornwall GA. *Isolation and proteomic characterization of the mouse sperm acrosomal matrix*. Molecular and Cellular Proteomics, 2012; 11:758-774.
- Hardy CM, Mobbs KJ. *Expression on recombinant mouse sperm protein sp56 and assessment of its potential for use as an antigen in an immun contraceptive vaccine*. Molecular Reproduction and Development, 1999; 52:216-224.
- Hardy CM, Clydesdale G, Mobbs KJ. *Development of mouse-specific contraceptive vaccines: infertility in mice immunized with peptide and polypeptide antigens*. Reproduction, 2004; 128:295-407.
- Harris KP, Littleton JT. *Vesicle trafficking: a Rab family profile*. Current Biology, 2011; 21(20):R841-R843.

- Harris GL, Creason MB, Brulte GB, Herr DR. *In Vitro and In Vivo antagonism of a G Protein-Coupled Receptor (S1P3) with a novel blocking monoclonal antibody*. PLoS One, 2012; 7(4):e35129.
- Hayasaka S, Terada Y, Suzuki K, Murakawa H, Tachinaba I, Sankai T, Murakami T, Yaegashi N, Okamura K. *Intramanchette transport during primate spermiogenesis: expression of dynein, myosin Va, motor recruiter myosin Va, VII-Rab27a/b interacting protein and Rab27b in the manchette during human and monkey spermiogenesis*. Asian Journal of Andrology, 2008; 10:561-568.
- Hedger MP. *Immunophysiology and pathology of inflammation in the testis and epididymis*. Journal of Andrology, 2011; 32:625-640.
- Hermann BP, Sukhwani M, Winkler F, Pascarella JN, Peters KA, Sheng Y. *Spermatogonial Stem Cell Transplantation into Rhesus Testes Regenerates Spermatogenesis Producing Functional Sperm*. Cell Stem Cell, Clinical Progress, 2012; 11:715-726.
- Hermo L, Chong DL, Moffat P, Sly WS, Waheed A, Smith CE. *Region- and cell-specific differences in the distribution of carbonic anhydrases II, III, XII, and XIV in the adult rat epididymis*. The Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 2005; 56(6):699-713.
- Hermo L, Pelletier RM, Cyr DG, Smith CE. *Surfing the wave, cycle, life history, and genes/proteins expressed by testicular germ cells. part 2: changes in spermatid organelles associated with development of spermatozoa*. Microscopy Research and Technique, 2010; 73:279-319.
- Holstein AF, Schirren CG, Schirren C, Mauss J. *Round headed spermatozoa: a cause of male infertility*. Deutsche Medizinische Wochenschrift, 1973; 98:61-62.
- Howards SS, Jessee SJ, Johnson AL. *Micropuncture studies of the blood-seminiferous tubule barrier*. Biology of Reproduction, 1976; 14:264-269.
- Huckins C. *Spermatogonial intercellular bridges in whole-mounted seminiferous tubules from normal and irradiated rodent testes*. American Journal of Anatomy, 1978; 153:97-121.
- Hummelke GC, Cooney AJ. *Germ cell nuclear factor is a transcriptional repressor essential for embryonic development*. Frontiers in Bioscience, 2001; 6:1186-1191.
- Inaba K. *Sperm flagella: comparative and phylogenetic perspectives of protein components*. Molecular Human Reproduction, 2011; 17(8):524-538.
- Ito C, Suzuki-Toyota F, Maekawa M, Toyama Y, Yao R, Noda T, Toshimori K. *Failure to assemble the perinuclear structures in GOPC deficient spermatids as found in round-headed spermatozoa*. Archives of Histology and Cytology, 2004; 67:349-360.
- Ito C, Akutsu H, Yao R, Kyono K, Suzuki-Toyota F, Toyama Y, Maekawa M, Noda T, Toshimori K. *Oocyte activation ability correlates with head flatness and presence of perinuclear theca substance in human and mouse sperm*. Human Reproduction, 2009; 24(10):2588-2595.
- Jamsai D, O'Bryan MK. *Mouse models as tools in fertility research and male-based contraceptive development*. En: *Fertility Control, Handbook of Experimental Pharmacology*, Habenicht UF, Aitken RJ, editores, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2010; pp. 179-194.
- Jan SZ, Hamer G, Repping S, de Rooij DG, van Pelt AMM, Vormer TL. *Molecular control of rodent spermatogenesis*. Biochimica et Biophysica Acta, 2012; 1822:1838-1850.

- Kang-Decker N, Mantchev GT, Juneja SC, McNiven MA, van Deursen JMA. *Lack of acrosome formation in Hrb-deficient mice*. Science, 2001; 294:1531-1533.
- Karp G. Sistemas de membrana citoplásmica: estructura, función y tránsito en la membrana. En: *Biología Celular y Molecular: conceptos y experimentos*. McGraw-Hill, 2011; pp. 264-318.
- Kavarthapu R, Dufau ML. *Germ Cell Nuclear Factor (GCNF/RTR) regulates transcription of Gonadotropin-Regulated Testicular RNA Helicase (GRTH/DDX25) in testicular germ cells*. The Androgen Connection, 2015, 29:1792–1804.
- Khobarekar BG, Vernekar V, Raghavan V, Kamada M, Maegawa M, Bandivdekar AH. *Evaluation of the potential of synthetic peptides of 80 kDa human sperm antigen (80 kDaHSA) for the development of contraceptive vaccine for male*. Vaccine, 2008; 26:3711-3718.
- Kierszenbaum AL. *Transition nuclear proteins during spermiogenesis: unrepaired DNA breaks not allowed*. Molecular Reproduction and Development, 2001; 58:357–358.
- Kierszenbaum AL, Gil M, Rivkin E, Tres LL. *Ran, a GTP-binding protein involved in nucleocytoplasmic transport and microtubule nucleation, relocates from the manchette to the centrosome region during rat spermiogenesis*. Molecular Reproduction and Development, 2002; 63:131-140.
- Kierszenbaum AL. *Intramachette transport: managing the making of the spermatid head, centrosome and tail*. Molecular Reproduction and Development, 2002; 63:1-4.
- Kierszenbaum AL, Rivkin E, Tres LL. *Acroplaxome, an F-actin-keratin-containing plate, anchors the acrosome to the nucleus during shaping of the spermatid head*. Molecular Biology of the Cell, 2003; 14:4628–4640.
- Kierszenbaum AL, Tres LL. *The acrosome-acroplaxome-manchette complex and the shaping of the spermatid head*. Archives of Histology and Cytology, 2004; 67:271-284.
- Kierszenbaum AL, Tres LL, Rivkin E, Kang-Decker N, van Deursen JM. *The acroplaxome is the docking site of Golgi-derived myosin Va/Rab27a/b-containing proacrosomal vesicles in wild-type and Hrb mutant mouse spermatids*. Biology of Reproduction, 2004; 70:1400-1410.
- Kierszenbaum AL, Rivkin E, Tres LL. *Molecular biology of sperm head shaping*. Spermatology, 2007; 65:33-43.
- Kierszenbaum AL, Rivkin E, Tres LL. *Cytoskeletal track selection during cargo transport in spermatids is relevant to male fertility*. Spermatogenesis, 2011; 1:221–230.
- Kierszenbaum AL, Rivkin E, Tres LL, Yoder BK, Haycraft CJ, Bornens M, Rios RM. *GMAP210 and IFT88 are present in the spermatid Golgi apparatus and participate in the development of the acrosome–acroplaxome complex, head–tail coupling apparatus and tail*. Developmental Dynamics, 2011; 240:723–736.
- Kierszenbaum AL, Tres LL. Espermatogénesis. En: *Histología y Biología celular, Introducción a la anatomía patológica*. 4ª edición, Elsevier, 2016; pp. 611-663.
- Kim KS, Cha MC, Gerton GL. *Mouse sperm protein is a component of the acrosomal matrix*. Biology of Reproduction, 2001; 64:36-43.
- Kimport K. *Talking about male body-based contraceptives: The counseling visit and the feminization of contraception*. Social Science and Medicine, 2018; 201:44-50.
- Kohno N, Yamagata K, Yamada S, Kashiwabara S, Sakai Y, Baba T. *Two novel testicular serine proteases, TESP1 and TESP2, are present in the mouse sperm*

- acrosome. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1998; 245:658–665.
- Kuo SR, Tahir SA, Park S, Thompson TC, Coffield S, Frankel AE, Liu JS. *Anti-caveolin-1 antibodies as anti-prostate cancer therapeutics*. *Hybridoma*, 2012; 31(2):77-86.
- Lan ZJ, Gu P, Xu X, Cooney AJ. *Expression of the orphan nuclear receptor, Germ Cell Nuclear Factor, in mouse gonads and preimplantation embryos*. *Biology of Reproduction*, 2003; 68:282–289.
- Lan ZJ, Xu X, Chung ACK, Cooney AJ. *Extra-germ cell expression of mouse Nuclear Receptor Subfamily 6, Group A, Member 1 (NR6A1)*. *Biology of Reproduction* 2009, 80: 905–912.
- Lecuyer C, Dacheux JL, Hermand E, Mazeman E, Rousseaux J, Rousseaux-Prevost R. *Actin-binding properties and colocalization with actin during spermiogenesis of mammalian sperm calicin*. *Biology of Reproduction*, 2000; 63:1801–1810.
- Lehti MS, Sironen A. *Formation and function of the manchette and flagellum during spermatogenesis*. *Reproduction*, 2016; 151:43-54.
- Li X, Zhang J, Cao Z, Wu J, Shi Y. *Solution structure of GOPC PDZ domain and its interaction with the C-terminal motif of neuroglin*. *Protein Science*, 2006; 15:2149-2158.
- Li S, Qiao Y, Di Q, Le X, Zhang L, Zhang X, Zhang C, Cheng J, Zong S, Koide SS, Miao S, Wang L. *Interaction of SH3P13 and DYDC1 protein: a germ cell component that regulates acrosome biogenesis during spermiogenesis*. *European Journal of Cell Biology*, 2009; (88):509-520.
- Lin Y, Roy A, Yan W, Burns KH, Matzuk MM. *Loss of zona pellucida binding proteins in the acrosomal matrix disrupts acrosome biogenesis and sperm morphogenesis*. *Molecular and Cellular Biology*, 2007; 27:6794–6805.
- Liska F. *Selected genetic aspects of male infertility: what animal models tell us*. *Folia Biologica*, 2003; 49:129-141 .
- Liska F, Gosele C, Rivkin E, Tres L, Cardoso MC, Domaing P, Krejci E, Snajdr P, Lee-Kirsch MA, de Rooij DG, Kren V, Krenova D, Kierszenbaum AL, Hubner N. *Rat hd mutation reveals an essential role of centrobilin in spermatid head shaping and assembly of the head-tail coupling apparatus*. *Biology of Reproduction*, 2009; 81:1196-1205.
- Liu G, Shi QW, Lu GX. *A newly discovered mutation in PICK1 in a human with Globozoospermia*. *Asian Journal of Andrology*, 2010; 12:556–560.
- Lo Y, Zhu Q, Marasco WA. *Intracellular antibodies and their therapeutic potential*. En: *Therapeutic Antibodies Handbook of Experimental Pharmacology 181*, Chernajovsky Y, Nissim A, editores, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2008; pp. 344-366.
- Longo FJ, Krolme G, Franke WW. *Basic proteins of the perinuclear theca of mammalian spermatozoa and spermatids: a novel class of cytoskeletal elements*. *The Journal of Cell Biology*, 1987; 105:1105-1120.
- Lu L, Lin M, Xu M, Zhou ZM, Sha JH. *Gene functional research using polyethylenimine-mediated in vivo gene transfection into mouse spermatogenic cells*. *Asian Journal of Andrology*, 2006; 8(1): 53-59.
- Lu R, Stewart L, Wilson JM. *Scaffolding protein GOPC regulates tight junction structure*. *Cell and Tissue Research*, 2015; 360:321-332.

- Mancini RE, Fainboim L, Alonso A. *Effect of intratesticular injection of antisperm serum*. The Journal of Allergy and Clinical Immunology, 1974; 64(8):69-76.
- Marasco WA, Haseltine WA, Chen SY. *Design, intracellular expression and activity of a human anti-human immunodeficiency virus type 1 gp120 single-chain antibody*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1993; 90:7889-7893.
- Marchev N, Gosset S, Viville S. Chromosome abnormalities in sperm from infertile men with normal somatic karyotypes: teratozoospermia. Cytogenetic and Genomic Research, 2005; 111:352-357.
- Martinez de Ubago M, Alonso E, Gómez-Santos L, Madrid JF, Noda T, Saez FJ. Partial loss of glycoconjugate content during acrosome biogenesis in a sterile Gopc deficient mouse. En: *Histology and Histopathology*, 2013; 28(S1):84.
- Martínez-González MA, Martín-Calvo N, Toledo JB. Comparación de k medias (tres o más grupos). En: *Bioestadística Amigable*, Martínez-González MA, Sánchez-Villegas A, Toledo-Atucha EA, Faulin-Fajardo J, editores, 3° edición, Elsevier, 2014; pp. 213-238.
- Mascarenhas MN, Flaxman SR, Boerma T, Vanderpoel S, Stevens GA. *National, regional, and global trends in infertility prevalence since 1990: a systematic analysis of 277 health surveys*. PLoS Medicine, 2012; 9: e1001356.
- Massart A, Lissens W, Tournaye H, Stouffs K. *Genetics causes of spermatogenic failure*. Asian Journal of Andrology, 2012; 14:40-48.
- Matzuk MM, Lamb DJ. *Genetic dissection of mammalian fertility pathways*. Nature Cell Biology, 2002; 4:S41-S49.
- Medrano JV, Martínez-Arroyo AM, Sukhwani M, Noguera I, Quiñonero A, Martínez-Jabaloyas JM, Pellicer A, Remohí J, Orwig KE, Simón C. *Germ cell transplantation into mouse testes procedure*. Fertility and Sterility, 2014; 102(4):e11-e12.
- Meistrich ML y Hess RA. Assessment of spermatogenesis through staging of seminiferous tubules. En: *Spermatogenesis: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, vol. 927*. Carrell DT, Aston KI, editores, Springer Science and Business Media, 2013; pp. 299-307.
- Mendes K, Kodaek T. *PDZ dimerization brings proteins together*. Chemistry and Biology, 2011; 18:1071-1072.
- Mital P, Hinton BT, Dufour JM. *The Blood-testis and Blood epididymis barriers are more than just their tight junctions*. Biology of Reproduction, 2011; 84:851-858.
- Mruk DD, Cheng CY. *Sertoli-Sertoli and Sertoli-germ cell interactions and their significance in germ cell movement in the seminiferous epithelium during spermatogenesis*. Endocrine Reviews, 2004; 25(5):747-806.
- Mochida K, Tres LL, Kierszenbaum AL. *Structural features of the 26S proteasome complex isolated from rat testis and sperm tail*. Molecular Reproduction and Development, 2000; 57:176-184.
- Moreno RD, Schatten G. *Microtubule configurations and post-translational α -tubulin modifications during mammalian spermatogenesis*. Cell Motility and the Cytoskeleton, 2000; 46:235-246.
- Moreno RD, Ramalho-Santos J, Sutovsky P, Chan EKL, Schatten G. *Vesicular traffic and Golgi apparatus dynamics during mammalian spermatogenesis: implications for acrosome architecture*. Biology of Reproduction, 2000a; 63:89-98.

- Moreno RD, Ramalho-Santos J, Chan EKL, Wessel GM, Schatten G. *The Golgi apparatus segregates from the lysosomal/acrosomal vesicle during Rhesus spermiogenesis: structural alterations*. *Developmental Biology*, 2000b; 219:334-349.
- Mukhopadhyay A, Nieves E, Che FY, Wang J, Jin L, Murray JW. *Proteomic analysis of endocytic vesicles: Rab1a regulates motility of early endocytic vesicles*. *Journal of Cell Science*, 2011; 124:765-775.
- Murdoch FE, Goldberg E. *Male contraception: another holy grail*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 2014; 24:419-424.
- Nakamura N. *Ubiquitination regulates the morphogenesis and function of sperm organelles*. *Cells*, 2013; 2:732-750.
- Nayernia K, Nieter S, Kremling H, Oberwinkler H, Engel W. *Functional and molecular characterization of the transcriptional regulatory region of the Proacrosin gene*. *The Journal of Biological Chemistry*, 1994; 269(51):32181-32186.
- Naz RK. *Vaccine for human contraception targeting sperm Izumo Protein and YLP₁₂ dodecamer peptide*. *Protein Science*, 2014; 23:857-868.
- Neudauer CL, Joberty G, Macara IG. *PIST: a novel PDZ/coiled-coil domain binding partner for the Rho-family GTPase TC10*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2001; 280:541-547.
- O'Bryan MK, de Kretser D. *Mouse models for genes involved in impaired spermatogenesis*. *International Journal of Andrology*, 2006; 29:76-89.
- O'Donnell L, Nicholls PK, O'Bryan MK, McLachlan RI, Stanton PG. *Spermiation: the process of sperm release*. *Spermatogenesis*, 2011; 1(1):14-35.
- O'Donnell L y O'Bryan MK. *Microtubules and spermatogenesis*. *Seminars in cell and developmental biology*. 2014. 30:45-54.
- O'Rand MG, Widgren EE, Sivashanmugam P, Richardson RT, Hall SH, French FS, VandeVoort CA, Ramachandra G, Ramesh V, Jagannadha Rao A. *Reversible immunocontraception in male monkeys immunized with Eppin*. *Science*, 2004; 306:1189-1190.
- O'Rand MG, Silva EJR, Hamil KG. *Non-hormonal male contraception and development of an Eppin based contraceptive*. *Pharmacology and Therapeutics*, 2016; 157:105-111.
- O'Shaughnessy P. Testicular Development. En: *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*, Knobil E, Neill J, editores, 4ª edición, Elsevier, 2015; pp. 567-594.
- Oakberg EF. *A description of spermiogenesis in the mouse and its use in analysis of the cycle of the seminiferous epithelium and germ cell renewal*. *American Journal of Anatomy*, 1956; 99(3):391-413.
- Oakberg EF. *Duration of spermatogenesis in the mouse and timing of stages of the cycle of the seminiferous epithelium*. *American Journal of Anatomy*, 1956; 99(3):507-516.
- Ogawa T, Arechaga JM, Avarbock MR, Brinster RL. *Transplantation of testis germinal cells into mouse seminiferous tubules*. *The International Journal of Developmental Biology*, 1997; 41:111-122.
- Oko R, Morales CR. *A novel testicular protein, with sequence similarities to a family of lipid binding proteins, is a major component of the rat sperm perinuclear theca*. *Developmental Biology*, 1994; 166:235-245.

- Oko R, Sutovsky P. *Biogenesis of sperm perinuclear theca and its role in sperm functional competence and fertilization*. Journal of Reproductive Immunology, 2009; 83:2-7.
- Paganetti P, Calanca V, Galli C, Stefani M, Molinari M. *β -site specific intrabodies to decrease and prevent generation of Alzheimer's A β peptide*. Journal of Cell Biology, 2005; 168(6):863-868.
- Payne AH, Wong KL, Vega MM. *Differential effects of single and repeated administrations of gonadotropins on luteinizing hormone receptors and testosterone synthesis in two populations of Leydig cells*. Journal of Biological Chemistry. 1980; 255:7118-7122.
- Petersen C, Fuzesi L, Hoyer-Fender S. *Outer dense fibre proteins from human sperm tail: molecular cloning and expression analyses of two cDNA transcripts encoding proteins of approximately 70 kDa*. Molecular Human Reproduction, 1999; 5:627-635.
- Petry S, Groen AC, Ishihara K, Mitchison TJ, Vale RD. *Branching microtubule nucleation in Xenopus egg extracts mediated by augmin and TPX2*. Cell, 2013; 152:768-777.
- Primakoff P, Woolman-Gamer L, Tung KSK, Myles DG. *Reversible contraceptive effect of PH-20 immunization in male guinea pigs*. Biology of Reproduction, 1997; 56:1142-1146.
- Rajkovic M, Iwen KA, Hofmann PJ, Harneit A, Weitzel JM. *Functional cooperation between CREM and GCNF directs gene expression in haploid male germ cells*. Nucleic Acids Research, 2010; 38(7):2268-2278.
- Ramalho-Santos J, Moreno RD, Wessel GM, Chan EK, Schatten G. *Membrane trafficking machinery components associated with the mammalian acrosome during spermiogenesis*. Experimental Cell Research, 2001; 267:45-60.
- Ramalho-Santos J, Schatten G, Moreno RD. *Control of membrane fusion during spermiogenesis and the acrosome reaction*. Biology of Reproduction, 2002; 67:1043-1051.
- Rao B, Soufir JC, Martin M, David G. *Lipid peroxidation in human spermatozoa as related to midpiece abnormalities and motility*. Gamete Research, 1989; 24:127-34.
- Raposo G, Marks MS, Cutler DF. *Lysosome-related organelles: driving post-Golgi compartments into specialisation*. Current Opinion in Cell Biology, 2007; 19:394-401.
- Robaire B, Syntin P, Jervis K. The coming of age of the epididymis. En: *Testis, Epididymis and Technologies in the Year 2000*, Jégou B, Pineau C, Saez J, editores, Springer-Verlag, 2000; pp. 229-262.
- Robaire B, Hinton B, Orgebin-Crist MC. The epididymis. En: *Physiology of Reproduction*, Knobil E, Neill J, Eds, Elsevier, 2006; pp. 1071-1148.
- Robaire B, Hinton B. The Epididymis. En: *Knobil's and Neill's Physiology of Reproduction*, Knobil E, Neill J, Eds, 4ª edición, Elsevier, 2015; pp. 261-771.
- Ross M, Pawlina W. Sistema genital masculino. *Histología, texto y atlas en color con Biología Celular y Molecular*. 6ª edición, Editorial Médica Panamericana, 2012; pp. 784-829.
- Roy A, Matzuk M. *Deconstructing mammalian reproduction: using knockouts to define fertility pathways*. Reproduction, 2006; 131:207-219.

- Roy A, Lin YN, Agno JE, DeMayo FJ, Matzuk MM. *Absence of tektin 4 causes asthenozoospermia and subfertility in male mice*. The Federation of American Societies for Experimental Biology Journal, 2007; 21:1013-1025.
- Russell LD, Ettlín R, Sinha-Hikim AP, Clegg ED. Staging for laboratory species. En: *Histological and Histopathological Evaluation of the Testis*. 1° edición, Cache River Press, (Clearwater, FL), 1990; pp. 62-195.
- Russell LD, Russell JA, MacGregor GR, Meistrich ML. *Linkage of manchette microtubules to the nuclear envelope and observations of the role of the manchette in nuclear shaping during spermiogenesis in rodents*. The American Journal of Anatomy, 1991; 192:97-120.
- Russell L. Role in spermiation. En: *The Sertoli cell*. Russell LD, Griswold MD, editores Clearwater FL: Cache River Press, 1993; pp. 269-302.
- Sayón-Orea C, Toledo E, Núñez-Córdoba JM, Martínez-González MA. ANOVA factorial, modelos lineales generalizados y ANCOVA. En: *Bioestadística Amigable*, Martínez-González MA, Sánchez-Villegas A, Toledo-Atucha EA, Faulín-Fajardo J, editores, 3° edición, Elsevier, 2014; pp. 241-267.
- Schmittgen TD, Livak KJ. *Analyzing real-time PCR data by the comparative C_T method*. Nature Protocols, 2008; 3(6):1101-1108
- Seabra MC, Mules EH, Hume AN. *Rab GTPases, intracellular traffic and disease*. TRENDS in Molecular Medicine, 2002; 8(1):23-30.
- Sharlip ID, Jarow JP, Belker AM, Lipshultz LI, Sigman M, Thomas AJ. *Best practice policies for male infertility*. Fertility and Sterility, 2002; 77:873-882.
- Sharma S, Birchmeier C, Nikawa J, O'Neill K, Rodgers L, Wigler M. *Characterization of the ros1-gene products expressed in human glioblastoma cell lines*. Oncogene Research, 1989; 5(2):91-100.
- Sharma R, Agarwal A. Spermatogenesis: An Overview. En: *Sperm Chromatin: Biological and Clinical Applications in Male Infertility and Assisted Reproduction*, Zini A, Agarwal A, editores, Springer Science, 2011; pp. 19-44.
- Shin W, Yu NK, Kaang BK, Rhee K. *The microtubule nucleation activity of centrobín in both the centrosome and cytoplasm*. Cell cycle (Georgetown, Tex.), 2015; 14:1925-1931.
- Siu MKY, Cheng CY. *Interactions of proteases, protease inhibitors, and the β 1-integrin/laminin γ 3 protein complex in the regulation of ectoplasmic specialization dynamics in the rat testis*. Biology of Reproduction, 2004; 70:945-964.
- Siu MKY, Wong C, Lee WM, Cheng CY. *Sertoli-germ cell anchoring junction dynamics in the testis are regulated by an interplay of lipid and protein kinases*. The Journal of Biological Chemistry, 2005; 280(26): 25029-25047.
- Smith BE, Braun RE. *Germ cell migration across Sertoli cell tight junctions*. Science, 2012; 338:798-802.
- Strebe N, Schüngel M. Phenotypic knockdown with intrabodies. En: *Antibody Engineering Vol. 2*, Kontermann R, Dübel S, editores, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2010; pp. 173-180.
- Sugita S, Kawazoe Y, Imai A, Yamada Y, Horie S, Mochizuki M. *Inhibition of Th17 differentiation by anti-TNF- α therapy in uveitis patients with Behçet's disease*. Arthritis Research and Therapy, 2012; 14(3):R99.
- Sun-Wada GH, Wada Y, Futai M. *Diverse and essential roles of mammalian vacuolar-type proton pump ATPase: Toward the physiological understanding of inside acidic compartments*. Biochemical and Biophysical Acta; 2004; 1658:106-114.

- Sutovsky P, Moreno R, Ramalho-Santos J, Dominko T, Thompson WE, Schatten G. *A putative, ubiquitin-dependent mechanism for the recognition and elimination of defective spermatozoa in the mammalian epididymis*. *Journal of Cell Science*, 2001; 114:1665–1675.
- Sutovsky P, Manandhar G, Wu A, Oko R. *Interactions of sperm perinuclear theca with the oocyte: implications for oocyte activation, anti-polyspermy defense, and assisted reproduction*. *Microscopy Research and Technique*, 2003; 61:362–378.
- Suzuki K, Drevet J, Hinton BT, Huhtaniemi I, Lareyere JJ, Matusik RJ, Pons E, Poutanen M, Sipila P, Orgebin-Christ MC. *Epididymis-specific promoter-driven gene targeting: a new approach to control epididymal function?* *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2004; 216(1-2):15-22.
- Suzuki-Toyota F, Maekawa M, Cheng A, Bleil JD. *Immuno-colloidal gold labeled surface replica, and its application to detect sp56, the egg recognition and binding protein, on the mouse spermatozoon*. *Journal of Electron Microscopy* (Tokyo), 1995; 44(3):135-139.
- Suzuki-Toyota F, Ito C, Toyama Y, Maekawa M, Yao R, Noda T, Toshimori K. *The coiled tail of the round-headed spermatozoa appears during epididymal passage in GOPC-deficient mice*. *Archives of Histology and Cytology*, 2004; 67(4): 361-371.
- Tanii I, Toshimori SA, Oura C. *Extra-Golgi pathway of an acrosomal antigen during spermiogenesis in rat*. *Cell and Tissue Research*, 1992; 270:451-457.
- Toledo E, López del Burgo C, Sayón-Orea C, Martínez-González MA. Comparación de medias entre dos grupos. En: *Bioestadística Amigable*, Martínez-González MA, Sánchez-Villegas A, Toledo-Atucha EA, Faulin-Fajardo J, editores, 3^o edición, Elsevier, 2014; pp. 175-197.
- Tomsig JL, Usanovic S, Turner TT. *Growth factor-stimulated mitogen-activated kinase (MAPK) phosphorylation in the rat epididymis is limited by segmental boundaries*. *Biology of Reproduction*, 2006; 75:598–604.
- Toshimori K, Tanii I, Araki S, Oura C. *Characterization of the antigen recognized by a monoclonal antibody MN9: unique transport pathway to the equatorial segment of sperm head during spermiogenesis*. *Cell and Tissue Research*, 1992; 270:459-468.
- Toshimori K. *Biology of spermatozoa maturation: an overview with an introduction to this issue*. *Microscopy Research and Technique*, 2003; 61:1-6.
- Toshimori K, Ito C, Maekawa M, Toyama Y, Suzuki-Toyota F, Saxena DK. *Impairment of spermatogenesis leading to infertility*. *Anatomical Science International*, 2004; 79:101–111.
- Toshimori K. *Dynamics of the mammalian sperm membrane modification leading to fertilization: a cytological study*. *Journal of Electron Microscopy*, 2011; 60:31-42.
- Toshimori K, Eddy EM. The spermatozoon. En: *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*, Knobil E, Neill J, editores, 4^o edición, Elsevier, 2015; pp. 99–148.
- Toure A, Rode B, Hunnicutt GR, Escalier D, Gacon G. *Septins at the annulus of mammalian sperm*. *Biological Chemistry*, 2011; 392:799–803.
- Toyama Y, Suzuki-Toyota F, Maekawa M, Ito C, Toshimori K. *Disruption of ectoplasmic specializations between Sertoli cells and maturing spermatids by anti-nectin-2 and anti-nectin-3 antibodies*. *Asian Journal of Andrology*, 2008; 10:577–584.

- Toyama Y, Chen C, Yamatoya K, Maekawa M, Ito C, Toshimori K. *Unique structures of organelles observed in primary spermatocytes after micro-injection of protein solutions such as immunoglobulin into the lumen of the seminiferous tubules in mice and rats*. *Andrologia*, 2013; 45:402-408.
- Tung KSK, Primakoff P, Woolman-Gamer L, Myles DG. *Mechanism of infertility in male guinea pigs immunized with sperm PH-20*. *Biology of Reproduction*, 1997; 56:1133-1141.
- Turner TT, Bomgardner D, Jacobs JP, Nguyen QA. *Association of segmentation of the epididymal interstitium with segmented tubule function in rats and mice*. *Reproduction*, 2003; 125:871-878.
- Turner TT, Johnston DS, Jelinsky SA, Tomsig JL, Finger JN. *Segment boundaries of the adult rat epididymis limit interstitial signaling by potential paracrine factors and segments lose differential gene expression after efferent duct ligation*. *Asian Journal of Andrology*, 2007; 9:565-573.
- Vinson CR, Conover S, Adler PN. *A Drosophila tissue polarity locus encodes a protein containing seven potential transmembrane domains*. *Nature*, 1989; 338:263-264.
- Vogl AW, Pfeiffer DC, Mulholland D, Kimel G, Guttman J. *Unique and multifunctional adhesion junctions in the testis: ectoplasmic specializations*. *Archives of Histology and Cytology*, 2000; 63:1-15.
- Von Horsten HH, Johnson SS, San Francisco SK, Hastert MC, Whelley SM, Cornwall GA. *Oligomerization and transglutaminase cross-linking of the cystatin CRES in the mouse epididymal lumen: potential mechanism of extracellular quality control*. *The Journal of Biological Chemistry*, 2007; 282(45):32912-32923.
- Wassarman PM. *Mammalian fertilization: the strange case of sperm protein sp56*. *BioEssays*, 2009; 31:153-158.
- Weikum ER, Tuntland ML, Murphy MN, Ortlund EA. *A structural investigation into Oct4 regulation by orphan nuclear receptors, Germ Cell Nuclear Factor (GCNF) and Liver Receptor Homolog-1 (LRH-1)*. *Journal of Molecular Biology*, 2016; 428:4981-4992.
- Whittemore LA, Song K, Li X, Aghajanian J, Davies M, Girgenrath S, Hill JJ, Jalenak M, Kelley P, Knight A, Maylor R, O'Hara D, Pearson A, Quazi A, Ryerson S, Tan XY, Tomkinson KN, Veldman GM, Widom A, Wright JF, Wudyka S, Zhao L, Wolfman NM. *Inhibition of myostatin in adult mice increases skeletal muscle mass and strength*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2003; 300:965-971.
- Williams RM, Jones R. *Specificity of binding of zona pellucida glycoproteins to sperm proacrosin and related proteins*. *Journal of Experimental Zoology*, 1993; 266:65-73.
- Wolosewicz JJ, Bryan JH. *Ultrastructural characterization of the manchette microtubules in the seminiferous epithelium of the mouse*. *American Journal of Anatomy*, 1977; 150:301-331.
- Wong E, Mruk D, Cheng Y. *Biology and regulation of ectoplasmic specialization, an atypical adherens junction type, in the testis*. *Biochimica and Biophysica Acta*, 2008; 1778:692-708.
- Wu A, Sutovsky P, Xu W, van der Spoel AC, Platt FM, Oko R. *The postacrosomal assembly of sperm head protein, PAWP, is independent of acrosome formation*

- and dependent on microtubular manchette transport. *Developmental Biology*, 2007; 312:471–483.
- Xiao N, Kam C, Shen C, Jin W, Wang J, Lee KM, Jiang L, Xia J. *PICK1 deficiency causes male infertility in mice by disrupting acrosome formation*. *Journal of Clinical Investigation*, 2009; 119:802–812.
- Xu X, Toselli PA, Russell LD, Seldin DC. *Globozoospermia in mice lacking the casein kinase II alpha' catalytic subunit*. *Nature Genetics*, 1999; 23:118–121.
- Xu C, Zhou ZY, Guo QS, Wang YF. *Expression of Germ Cell Nuclear Factor in mouse germ cells and sperm during postnatal period*. *Asian Journal of Andrology*, 2004; 6:217–222.
- Yan ZH, Medvedev A, Hirose T, Gotoh H, Jetten AM. *Characterization of the response element and DNA binding properties of the nuclear orphan receptor germ cell nuclear factor/retinoid receptor-related testis-associated receptor*. *Journal of Biological Chemistry*, 1997; 272:10565–10572.
- Yan W. *Male infertility caused by spermiogenic defects: Lessons from gene knockouts*. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2009; 306:24–32.
- Yan P, He W, Wu Y, Chen Z, He H, Ni B, Zhang J, Yang X, Shen Z, Fu X, Liang Z, Li J. *Enhanced suppression of fertility can be achieved by priming with FSHR and Eppin and further boosting with their B-cell epitope peptides*. *American Journal of Reproductive Immunology*, 2015; 74:156–168.
- Yanagimachi, R. Mammalian fertilization. En: *The Physiology of Reproduction*, Knobil E, Neill J, editores, Raven Press Ltd. (New York), 1994.
- Yang G, Zhang YL, Buchold GM, Jetten AM, O'Brien DA. *Analysis of germ cell nuclear factor transcripts and protein expression during spermatogenesis*. *Biology of Reproduction*, 2003; 68:1620–1630.
- Yang WX, Sperry AO. *C-Terminal Kinesin Motor KIFC1 Participates in Acrosome Biogenesis and Vesicle Transport*. *Biology of Reproduction*, 2003; 69:1719–1729.
- Yang WX, Jefferson H, Sperry AO. *The molecular motor KIFC1 associates with a complex containing nucleoporin NUP62 that is regulated during development and by the small GTPase Ran*. *Biology of Reproduction*, 2006; 74:684–690.
- Yao R, Maeda T, Takada S, Noda T. *Identification of a PDZ domain-containing Golgi protein, GOPC, as an interaction partner of frizzled*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2001; 286:771–778.
- Yao R, Ito C, Natsume Y, Sugitani Y, Yamanaka H, Kuretake S, Yanagida K, Sato A, Toshimori K, Noda T. *Lack of acrosome formation in mice lacking a Golgi protein, GOPC*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2002; 99(17):11211–11216.
- Yoshida M, Kawano N, Yoshida K. *Control of sperm motility and fertility: diverse factors and common mechanism*. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2008; 65:3446–3457.
- Yoshinaga K, Saxena DK, Oh-oka T, Tanii I, Toshimori K. *Inhibition of mouse fertilization in vivo by intra-oviductal injection of an anti-equatorin monoclonal antibody*. *Reproduction*, 2001; 122:649–655.
- Yoshinaga K, Toshimori K. *Organization and modifications of the sperm acrosomal molecules during spermatogenesis and epididymal maturation*. *Microscopy Research and Technique*, 2003; 61(1)39–45.
- Young B, Heath JW. El Aparato genital masculino. En: *Wheater's histología funcional*, Young B, Heath JW, editores, Elsevier, 2000; pp. 328–332.

- Zechel C. *The Germ Cell Nuclear Factor (GCNF)*. Molecular Reproduction and Development, 2005; 72: 550-556.
- Zegers-Hochschild F, Adamson GD, de Mouzon J, Ishihara O, Mansour R, Nygren K, Sullivan E, van der Poel S, on behalf of ICMART and WHO. *The International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) Revised Glossary on ART Terminology, 2009*. Human Reproduction, 2009; 24(11):2683-2687.
- Zhang Y, Zhong L, Xu B, Yang Y, Ban R, Zhu J, Cooke HJ, Hao QM, Shi Q. *SpermatogenesisOnline 1.0: a resource for spermatogenesis based on manual literature curation and genome-wide data mining*. Nucleic Acids Research, 2013; 41:1055-1062.
- Zhu LL, Tourkova I, Yuen T, Robinson LJ, Bian Z, Zaidi M, Blair HC. *Blocking FSH action attenuates osteoclastogenesis*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2012.

VIII. ANEXO

1. ABREVIATURAS

- ΔC_7 : ciclo de amplificación de qPCR relativizado al control endógeno
- μg : microgramos
- μl : microlitros
- ACR: *Acrosin*
- APS: Persulfato de amonio
- BCA: Ácido bicinconínico
- BSA: *Bovine Serum Albumina*
- CAL: *CFTR-associated ligand*
- cDNA: DNA complementario
- CFTR: *Cistic fibrosis transmembrane regulator*
- CO_2 : Dióxido de carbono
- C_7 : ciclo de amplificación de qPCR
- CuSO_4 : Sulfato de cobre
- DAB: *3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride*
- DNA: Ácido desoxirribonucleico
- dNTPs: Desoxirribonucleótidos
- EGFR: *Epidermal Growth Factor Receptor*
- ES: segmento ecuatorial de la cabeza de la espermátida
- FSH: Hormona Foliculoestimulante
- FIG: *Fused in glioblastoma*
- FIV: Fertilización *in vitro*
- GCNF: *Germ cell nuclear factor*
- GnRH: Hormona liberadora de Gonadotropinas
- GOPC: *Golgi-associated PDZ and coiled-coil motif-containing protein*
- GSTs: *Glutation S-transferasa*
- H_2O_d : agua destilada
- H_2O DEPC: agua con dietil-pirocarbonato
- HCl: Ácido clorhídrico
- HER2: *Human Epidermal Growth Factor Receptor 2*
- HIV: virus de la Inmunodeficiencia Humana
- HRP: *enzimahorseradish peroxidase*
- IAM: Membrana acrosomal interna
- IFT: Transporte Intraflagelar
- IMT: Transporte Intramanchette
- K5: queratina 5
- KCl: Cloruro de potasio
- KDa: Kilodalton
- KIFC1: *Kinesin-like protein KIFC1*
- LH: Hormona Luteinizante
- LINC: *Linker of Nucleoskeleton and Cytoskeleton Complex*
- LRO: *Lysosome-Related Organelle*
- MET: *Tyrosine-protein kinase Met*
- MMP2: *Matrix metalloproteinase 2*

- MTOC: Centro de organización de microtúbulos
- NaCl: Cloruro de sodio
- NaOH: Hidróxido de sodio
- NaHPO₄: Fosfato de sodio
- NGS: *Normal Goat Serum*
- NR6A1: *Nuclear receptor subfamily 6 group A member 1*
- OAM: Membrana acrosomal externa
- *Oct4: Octamer-binding protein 4*
- ODFs: *Outer dense fiber proteins*
- Pa: Pascales
- PAS: Tinción del Ácido Peryódico-Schiff
- PBS: *Phosphate Buffer Saline*
- PBTx: *Phosphate Buffer Saline-Triton100X*
- PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa
- PH-20: *Hyaluronidase PH-20*
- PIST: *PDZ protein interacting specifically with TC10*
- PUFA: Ácidos grasos poli-insaturados
- qPCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa Cuantitativa
- RNA Ácido ribonucleico
- rpm: revoluciones por minuto
- *Rps15: 40S ribosomal protein S15*
- rRE: Retículo endoplásmico rugoso
- RT^a: Temperatura ambiente
- RT-qPCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa Cuantitativa con Transcripción Inversa
- RTR: *Retinoid receptor-related testis-specific receptor*
- Sak57: ortólogo murino de la queratina 5
- SDS: *Sodium Dodecil Sulfate*
- SEM: error estándar de la media
- Spata16: *Spermatogenesis-associated protein 16*
- sp56: *Sperm fertilization protein 56*
- TBS: *Tris Buffer Saline*
- TBS-T: *Tris Buffer Saline-Tween20*
- TEM: Microscopía electrónica de transmisión
- MMPs: metaloproteinasas
- mUBPy: *Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 8*
- VEGF: *Vascular Endothelial Growth Factor*
- WHO: Organización Mundial de la Salud
- ZP3: *Zona pellucida sperm-binding protein 3*
- ZP3R: *Zona pellucida sperm-binding protein 3 receptor*

2. REACTIVOS

2.1. Inmunohistoquímica para microscopía óptica

Fijador de Bouin

- 11ml solución saturada de Ácido pícrico
- 3,5ml Formaldehído
- 0,5ml Ácido acético glacial
- pH 2,2

PBS 10X

- 2g KCl
- 2g H₂PO₄
- 80g NaCl
- 21,6g NaHPO₄
- ajustar pH 7,4 con HCl
- H₂O_d hasta 1L

PBTx 0,1%

- 100ml PBS10X
- 900ml H₂O_d
- 1ml Triton100X

2.2. Inmunohistoquímica para TEM

Glutaraldehído 2%

- 8ml Glutaraldehído al 25%
- 92ml PBS1X

Lowicryl® K4M

- 2,7ml Croslinker A
- 17,3ml Monomer B
- 0,1g Iniciator C

Acetato de uranilo

- 3g Acetato de uranilo
- 100ml H₂O Mili-Q

Citrato de plomo

- 2,66g Nitrato de plomo
- 3,52g Citrato de sodio
- 84ml H₂O_d
- 16ml NaOH 1N
- pH 12

2.3. Western Blot

RIPA Buffer

- 50mM Tris pH 8.0
- 150mM NaCl
- 1.0% IGEPAL® CA-630
- 0.5% desoxicolato sódico
- 0.1% SDS

Protease Inhibitor Cocktail

- 2mM AEBSF
- 0.3μM Aprotinin
- 116μM Bestatin
- 14μM E-64
- 1μM Leupeptin
- 1mM EDTA

SDS-Sample Buffer Morris (4X)

- 2,5ml Tris-HCl 1M (pH 6,8)
- 1g SDS
- 0,8ml 0,1% Azul de Bromofenol
- 4ml glicerina
- 2ml β-mercaptoetanol
- H₂O Mili-Q hasta 10ml

Gel de SDS-Poliacrilamida al 10%

Running Gel

- 5ml Bisacrilamida al 30%
- 3ml Tris-HCL 2M
- 7ml H₂O Mili-Q
- 75µl 20% SDS
- 75µl 10% APS
- 5µl TEMED

Tris-HCl 2M

- 24,14g Tris
- ajustar pH 8,8 con HCl
- H₂O Mili-Q hasta 100ml

Tampón electroforesis 10X

- 30,29g Tris
- 142,263g glicina
- 10g SDS
- 1L H₂O Mili-Q

Rojo Ponceau

- 0,5g Rojo Ponceau
- 1ml Ácido Acético Glacial
- H₂O Mili-Q hasta 100ml

TBS-T

- 50ml TBS 10X
- 500µl Tween20
- 450ml H₂O Mili-Q

Stacking gel

- 1ml Bisacrilamida al 30%
- 750µl Tris-HCL 0,5M
- 5,75ml H₂O Mili-Q
- 37,5µl 20% SDS
- 62,5µl 10% APS
- 6,25µl TEMED

Tris-HCl 0,5M

- 6,06g Tris
- ajustar pH 6,8 con HCl
- H₂O Mili-Q hasta 100ml

Tampón de transferencia 1X

- 700ml Tampón electroforesis 1X
- 200ml metanol

TBS 10X

- 6,06g Tris
- 43,83g NaCl
- ajustar pH 7,4 con HCl
- H₂O Mili-Q hasta 500ml

Tampón de Stripping

- 2,92g NaCl
- 3,75g glicina
- 5ml SDS 20%
- ajustar pH 3 con HCl
- H₂O Mili-Q hasta 500ml

2.4. RT-qPCR

FFPE RNA Purification Kit

- Citrosol
- Etanol 95%
- Proteinasa K
- Digestion Buffer A
- Buffer RL
- DNasa I
- Wash Solution A
- Elution Solution A

iScript™ cDNA Synthesis Kit

- 5x iScript Reaction Mix
- iScript Reverse Transcriptase
- Nuclease-free water

Platinum® Multiplex PCR Master Mix 2X

- Multiplex PCR Master Mix 2x

Power SYBR® Green PCR Master Mix

- Power SYBR® Green PCR Master Mix 2x

3. EQUIPOS

3.1. Inmunohistoquímica para microscopía óptica

- *Shandon Citadel™ 1000 Tissue Processor* (Thermo Scientific)
- *Shandon Histocentre 2 Tissue Embedding Center* (Thermo Scientific)
- *Microtomo Shandon Finesse 325* (Thermo Scientific)
- *Varistain 24-4* (Thermo Scientific)
- Microscopio óptico *Olympus BX50* (Olympus)

3.2. Inmunohistoquímica para TEM

- Ultramicrotomo *Leica Ultracut UCT* (Leica)
- Microscopio electrónico de transmisión *Philips EM208S* (Philips)

3.3. Western Blot

- Sonicador *Sonopuls Ultrasonic homogenizers* (Bandelin)
- Lector de placa *Synergy HT* (BioTek)
- Centrifuga 5415R (Eppendorf)
- *TS1 ThermoShaker* (Biometra)
- *PowerPac Basic™* (BIO-RAD)
- Membrana de nitrocelulosa *Whatman™* (LifeSciences)
- Revelador G:BOX(BioTek).

3.4. RT-qPCR

- Microtomo *Shandon Finesse 325* (Thermo Scientific)
- Eppendorf RNasa-free (Eppendorf)
- *TS1 ThermoShaker* (Biometra)
- Columnas de purificación de RNA (Norgen Biotek Corp.)
- Tubos colectores (Norgen Biotek Corp.)
- Centrifuga 5415R (Eppendorf)
- *Nanodrop Synergy HT* (BioTek)
- Lector de placa *Synergy HT* (BioTek)
- Termociclador *C1000™ Thermal Cyclers* (BIO-RAD)
- Termociclador *CFX96™* (BIO-RAD)

4. MATERIAL DE MICROINYECCIÓN INTRATESTICULAR

Anestesia

- Manta eléctrica
- Bisturí
- Esparadrapo
- Povidona Yodada
- Isoflurano

Procedimiento quirúrgico

- Pinzas y tijeras de cirugía
- Capilares de vidrio de boro-silicato
- Azul de bromofenol
- Micromanipulador *Mk1 Micromanipulator* (Singer Instruments)
- Microinyector *CellTram[®] Air* (Eppendorf)
- Parafilm[®]
- Bastoncillos
- Tijeras de sutura
- Hilo sutura absorbible (Laboratorio Aragón S.L.)
- Hilo sutura no absorbible (Laboratorio Aragón S.L.)

