

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE BIOLOGÍA**

**SILENCIAMIENTO GÉNICO MEDIADO POR *shRNAs* EN
CÉLULAS DEL EPITELIO SEMINÍFERO DE RATÓN**

TESIS DOCTORAL

EMILIO GONZÁLEZ GONZÁLEZ

Madrid, 2006

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA**

**SILENCIAMIENTO GÉNICO MEDIADO POR *shRNAs* EN
CÉLULAS DEL EPITELIO SEMINÍFERO DE RATÓN**

Memoria presentada por

EMILIO GONZÁLEZ GONZÁLEZ

Para optar al grado de doctor en Biología

VºBº Directores de Tesis

VºBº Tutor de Tesis

Doctorando

Fdo. Dr. Jesús del Mazo Martínez

Fdo. Dra. Concepción Romero Martínez

Fdo. Emilio González González

Fdo. Dr. Pedro Pablo López Casas

El trabajo experimental de esta Tesis Doctoral ha sido realizado con financiación del Ministerio de Ciencia y Tecnología (Ref.: BFU 2004-03977) y el V Programa Marco de la Comisión Europea (QLK4-CT-2002-02403)

A mi familia

A Mariafer

AGRADECIMIENTOS

En estas primeras líneas, que también son las últimas, intentaré agradecer a todos los que me han ayudado a lo largo de estos años, aunque son tantos, que probablemente sus nombres no entren en estas letras.

A mi familia. Siempre estuvieron junto a mi, juntos hemos superado, pasito a pasito, todo lo que nos propusimos, ya nos queda menos.

A Jesús, gracias por brindarme la oportunidad de realizar este trabajo, por descubrirme el mundo del silenciamiento.

A Pedro, por tu sinceridad y dedicación, porque sin tu ayuda esto no habría sido posible. Es una lástima que no pueda llevarme conmigo tu cerebro, es la mejor enciclopedia que conozco.

A todos los miembros de mi laboratorio con los que he compartido estos años de trabajo: Fernando (podríamos haber cambiado el mundo, pero si no, ¿de que hablaríamos?), María (Mouchos, coruxas, sapos e bruxas..., espero que esta vez funcione), Francesca (aún está pendiente un viajecito...) y Raquel, y a los vecinos (de la planta no menos noble), gracias por vuestro apoyo.

A Unai, por enseñarme a tocarles los huevos a los ratones y por esa fotito de la rete testis.

A Javier Nogales, por su inestimable ayuda en el análisis estadístico de los datos de expresión génico.

A todos los servicios del CIB, secuenciación, animalario, confocal y en especial, a Pedro y su servicio de citometría; sin él no habría rojo.

En especial, agradezco a todos los PRECARIOS y CAÑEROS, sois muchos (Ursula, Carmen, Asier, Fran, Patricia, Silvia, Jimena, Teresa, Alicia, Mariam, Bart, y demás fdps, Inés, Carmen, Mónica, Fernando, Sergio, Iker, Mercedes, a Alfredo, Javi, David y todos los inmunólogos, y a las niñas Swartzman (gracias Loli y Leonor por el empujoncito final), a los

futboleros, y a los Rubenes, Anita, creo que será difícil encontrar un ambiente similar en otra parte, bueno quizás en “el rey de las tortillas”...

A “las setas”, porque entre nuestras divertidas charlas chaueneras y acalorados debates, siempre hay hueco para la amistad profunda, desde aquí dominamos y cambiamos el mundo, al menos el nuestro. Espero que al guardián de las llaves no se le olvide nunca abrirnos las puertas.

A Ramón, por esas orejitas cansadas de escucharme, pero siempre atentas Y por su indudable apoyo informático. ¿Tendré el ordenador listo ya...?

A mi adita madrina, Chechu, por iniciarme en el mundo científico, porque en tu huequecito pude conocer a mis padrinos en este mundo, Mauri y Marcela, y a Silvia y a Mónica. Gracias, en especial a Mauri, por abrirme los ojos, aún estoy buscando mi hueco.

A Jordi, por apreciar mi trabajo y por enseñarme todo sobre cultivos, a Emilio por sus consejos, y a Fran, Juan Antonio, Dalia y Amira y resto de amigos del Hospital Universitario Reina Sofía de Córdoba.

A Juan Manuel y a Concha, por abrirme las puertas de su casa y mostrarme Córdoba desde una perspectiva apasionada y alegre.

A Gaizka y a Sonia, son muchos años juntos, horas y horas de mil y una anécdotas, pero algún día tendría que pasar ..., NY, París, supongo que siempre habrá algo que recordar y celebrar, en fin, ya nos veremos.

A Mariafer, por compartir el camino y confiar en mí. Porque no conoceré a nadie, nunca, de quién aprender tanto como de ti. Porque estas letras se hacen agradables gracias a ti. Por enseñarme el cultivo de Keratoh. Gracias por llegar conmigo hasta el final.

Gracias a todos

Abreviaturas

α ³² P-dCTP	Citidina trifosfato marcada con ³² P en la posición α .
aa	Aminoácido
AGO	Proteína de la familia Argonauta.
ATP	Del inglés: “Adenosine Triphosphate”, trifosfato de adenosina.
BSA	Del inglés: “Bovine Serum Albumin”, seroalbúmina bovina.
DAPI	Del inglés: “4, 6 DiAmidin-2-Phenyl-Indole”, 4,6 diamidino-2-fenil indol.
dCTP	Del inglés: “deoxiCitidine TriPhosphate”, deoxicitidina trifosfato.
DNA	Del inglés: “DesoxiriboNucleic Acid”, ácido desoxirribonucleico.
cb	Del ingles: “chromatoid body”, cuerpo cromatoide.
cDNA	Del inglés: “complementary DesoxiriboNucleic Acid”, ácido desoxirribonucleico complementario.
DEPC	DiEtil PiroCarbonato.
DMEM	Del inglés: “Dulbecco’s Modified Eagle Medium”, medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco.
dNTP	Del inglés: “deoxiNucleoside Triphosphate”, deoxinucleósido trifosfato.
dpp	días <i>post-partum</i> .
dsRNA	Del ingles: “double stranded RNA”, RNA de doble cadena.
EDTA	Del ingles: “Ethylen-Diamin Tetra-Acetate”, etilén-diamino-tetraacetato.
EGFP	Del inglés: “Enhanced Green Fluorescent Protein”, proteína verde fluorescente potenciada.
EP	Electroporación.
FACS	Del inglés: “Fluorescent Activated Cell Sorting”, separación celular dependiente de fluorescencia.
Ifv	Intensidad de fluorescencia verde.
IPTG	Del inglés: “IsoPropyl-beta-D-ThioGalactoside”, isopropil-beta-D-tiogalactósido.
ITSS	Del inglés: “Insuline-Transferrine-Sodium Selenite”, insulina-transferrina-selenito de sodio.
KO	Del inglés: “Knock Out”, mutante por falta de función.

mbar	milibar.
mjul	miljulio.
miRNA	microRNA.
miRNP	Del inglés: “microRNA RiboNucleoProtein particles”, complejos ribonucleoproteicos de miRNAs.
mRNA	Del inglés: “messenger RiboNucleic Acid”, ácido ribonucleico mensajero.
nt	nucleótido.
PAZ	Dominio presente en las proteínas Piwi, Argonaute y Zwillie.
pb, kb	pares de bases, kilobases.
PBS	Del inglés: “Phosphate Buffered Saline”, tampón fosfota salino.
PBSG	PBS con glucosa.
PCR	Del inglés: “Polymerase Chain Reaction”, reacción en cadena de la polimerasa.
PKR	Del inglés: “Protein Kinase R”, proteína kinasa R (inducida por interferón).
PFA	ParaFormAldehido.
pre-miRNA	precursor de microRNAs.
pri-miRNA	microRNA primario.
RISC	Del inglés: “RNA- Induced Silencing Complex”, complejo silenciador inducido por RNA.
RITS	Del inglés: “RNA- Induced Transcriptional Silencing Complex”, complejo de silenciamiento transcripcional inducido por RNA.
RNA	Del inglés: “RiboNucleic Acid”, ácido ribonucleico.
rpm	revoluciones por minuto.
RT-PCR	Del inglés: “RetroTranscription-Polymerase Chain Reaction”, retrotranscripción- reacción en cadena de la polimerasa.
RNAi	Del inglés: “RNA interference”, interferencia de RNA.
SBF	Suero Bovino Fetal.
SCATs	Del ingles: “Spermatogenic Cell-Altered Transcripts”, transcritos alterados en células espermatoogénicas.
SDS	Del inglés: “Sodium Dodecil Sulfate”, dodecil sulfato sódico.
shRNA	Del inglés: “small hairpin RNA”, pequeño RNA en horquilla.

siRNA	Del inglés: “small interfering RNA”, pequeño RNA interferente.
SSC	Del inglés: “Saline-Sodium Citrate buffer”, tampón citrato sódico salino.
ssRNA	Del inglés: “single stranded RNA”, RNA de cadena sencilla.
TBE	Tris-Borato-EDTA.
TE	Tris-EDTA.
Tnp2	Del inglés: “Transition protein 2”, proteína de transición 2.
TRBP	Del inglés: “HIV-1 TAR RNA Binding Protein”, proteína de unión al RNA TAR del HIV-1.
Tris	Tris-(hidroximetil)-aminometano.
UV	Ultravioleta.
V	Voltios.
X-Gal	Del inglés, “5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactoside”, 5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-galactósido.

1	RESUMEN	1
2	INTRODUCCIÓN	3
2.1	ESPERMATOGÉNESIS	4
2.1.1	Regulación transcripcional	5
1.1.2	La célula de Sertoli	6
2.2	INTERFERENCIA DE RNA (RNAi)	7
2.3	REGULACIÓN DE GENES QUE CODIFICAN PROTEÍNAS IMPLICADAS EN RNAi	13
2.3.1	<i>Drosha (Rnasen). Ribonucleasa III nuclear</i>	13
2.3.2	<i>Dicer</i>	13
2.3.3	Genes de la familia Argonauta (<i>Eif2c 1-4</i> , “ <i>Eukariotic translation initiation factor 1-4</i> ”; <i>Ago 1-4</i>)	14
2.4	RNAi EN TESTÍCULO	16
2.4.1	RNAi en células de Sertoli	18
2.5	METODOLOGÍAS APLICADAS A GENÓMICA FUNCIONAL EN EPITELIO SEMINÍFERO	19
2.5.1	Técnicas de microinyección en el túbulo seminífero	20
2.5.2	Transfección <i>in vivo</i> de las células del epitelio seminífero	20
3	OBJETIVOS	22
4	MATERIALES Y MÉTODOS	24
4.1	MATERIALES	25
4.1.1	Soluciones	25
4.1.2	Medios de cultivo	26
4.1.3	Estirpes bacterianas	26
4.1.4	Líneas celulares	27
4.1.5	Vectores	27
4.1.6	Animales	29
3.1.7	Membranas y filtros	29
3.1.8	Columnas de cromatografía	30
4.1.9	Precursores radiactivos	30
4.1.10	Kits comerciales	30
3.1.11	Programas informáticos	30
4.1.11	Programas estadísticos	32
4.2	MÉTODOS	33
4.2.1	Construcción de pRed	33
4.2.2	Cultivo de la línea NIH-3T3 y transfección	33
4.2.3	Cultivo primario de fibroblastos y transfección	34
4.2.4	Cultivo primario de células de Sertoli	34
4.2.5	Transfección de células de Sertoli	36
4.2.6	Microinyección en rete testis y transfección <i>in vivo</i> de las células del epitelio seminífero mediante electroporación de onda cuadrada	37
4.2.7	Técnicas histológicas	40
4.2.8	Análisis por citometría de flujo	40
4.2.9	Análisis de expresión en testículo de los genes que codifican proteínas implicadas en RNAi	43
5	RESULTADOS	51
5.1	SILENCIAMIENTO DE <i>EGFP</i> EN CULTIVOS CELULARES: EVALUACIÓN DEL FUNCIONAMIENTO DEL VECTOR pGTOR	52
5.2	SILENCIAMIENTO POR RNAi <i>IN VIVO</i> EN EPITELIO SEMINÍFERO DE RATÓN	54
5.3	SILENCIAMIENTO POR RNAi EN CULTIVO PRIMARIO DE CÉLULAS DE SERTOLI	60
5.4	EXPRESIÓN EN TESTÍCULO DE RATÓN DE GENES IMPLICADOS EN RNAi	65
5.4.1	Análisis comparativo de la expresión de los genes <i>Ago 1-4</i> , <i>Drosha</i> y <i>Dicer</i>	80
6	DISCUSIÓN	83
6.1	SILENCIAMIENTO DEL GEN <i>EGFP</i> EN EPITELIO SEMINÍFERO DE RATÓN <i>IN VIVO</i>	86
6.2	SILENCIAMIENTO DEL GEN <i>EGFP</i> EN CÉLULAS DE SERTOLI FM131 EN CULTIVO	89
6.3	REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE GENES QUE CODIFICAN PROTEÍNAS IMPLICADAS EN RNAi	91

7	CONCLUSIONES	98
8	BIBLIOGRAFÍA	100
9	APÉNDICE	115

1 RESUMEN

La espermatogénesis es el proceso de diferenciación terminal que conduce a la formación de los espermatozoides. En la línea germinal masculina, las espermatogonias proliferan y se diferencian a los restantes tipos celulares del epitelio de los túbulos seminíferos del testículo: espermatocitos, espermatidas y espermatozoides. El proceso está coordinado por el componente somático del epitelio seminífero: las células de Sertoli. En este trabajo, se ha evaluado el silenciamiento de la expresión génica mediante interferencia de RNA (RNAi), en los distintos tipos celulares del epitelio seminífero de ratón (*Mus musculus*). En el silenciamiento por RNAi, moléculas de RNA de doble cadena son capaces de promover represión post-transcripcional de un gen diana por complementariedad de secuencia. En las células del epitelio seminífero de ratones transgénicos que expresan el gen *Egfp*, se introdujeron vectores de DNA que permitían la expresión de pequeños RNAs, capaces de constituirse en RNAs de doble cadena en horquilla (shRNAs), con potencialidad de guiar el silenciamiento específico del gen *Egfp*. La transfección de los vectores en las células del epitelio seminífero se llevó a cabo *in vivo*, mediante electroporación por onda cuadrada, e *in vitro*, mediante lipofección. En ambos casos se analizó la eficacia de transfección del vector utilizado y la eficiencia del silenciamiento. También, en este trabajo, se ha llevado a cabo la caracterización, utilizando la técnica de RT-PCR en Tiempo Real, de la expresión de los genes *Drosha*, *Dicer* y *Ago 1-4*; genes que codifican proteínas implicadas en el proceso de interferencia de RNA. El estudio se ha realizado valorando comparativamente los niveles de expresión génica durante el desarrollo postnatal del testículo, en las células aisladas del epitelio seminífero y en diferentes tejidos somáticos adultos. Los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral muestran que, utilizando la metodología de transfección *in vivo* en testículos de ratones adultos, las células de Sertoli son preferentemente transfectadas en el epitelio seminífero. Además, los resultados demuestran que es posible silenciar genes endógenos en células de Sertoli mediante interferencia de RNA, *in vivo* e *in vitro*. Por otro lado, se muestra que los seis genes estudiados presentan diferentes niveles de expresión en los tejidos analizados; permaneciendo corregulados los genes *Drosha*, *Dicer*, *Ago 2* y *3*, mientras el gen *Ago 1* se expresa preponderantemente en el bazo y *Ago 4* en el testículo. La expresión de estos genes está regulada durante el desarrollo testicular hasta adulto, momento en el que *Dicer* y *Ago 2* se expresan mayoritariamente en las células de Sertoli, y *Drosha*, *Ago 3* y *Ago 4* lo hacen en la línea germinal.

2 INTRODUCCIÓN

2.1 Espermatogénesis

La espermatogénesis es el proceso en el que las espermatogonias se diferencian a espermatozoides en una serie de fases sucesivas que podemos clasificar en: i) proliferativa o mitótica, ii) de reducción cromosómica o meiótica, y iii) de diferenciación terminal o espermiogénesis. Durante estas fases se desarrollan los diferentes tipos celulares que constituyen la línea germinal: las espermatogonias en la fase proliferativa; espermátocitos (I y II) en la fase meiótica; y espermátidas (redondas y alargadas) y espermatozoides durante la espermiogénesis. La espermatogénesis en mamíferos tiene lugar en los túbulos seminíferos de los testículos. Comienza en la pubertad y continúa durante toda la vida adulta. Dicha diferenciación es en sentido centripeto hacia el lumen del túbulo seminífero, manteniendo un patrón citológico de los distintos tipos celulares en lo que se define como epitelio seminífero (Fig. 1).

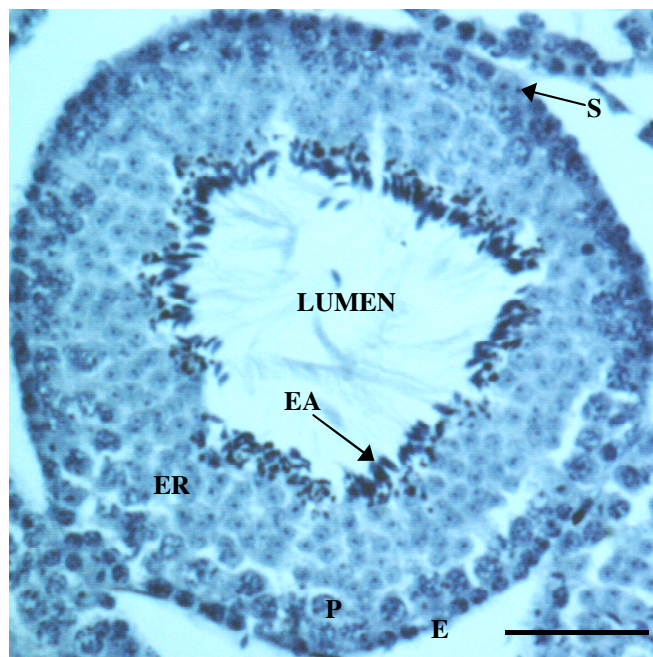


Figura 1: Corte transversal de un túbulo seminífero de ratón teñido con hematoxilina férrica de Weigert. Se pueden apreciar los distintos tipos celulares y su localización en el túbulo: espermatogonias (E), paquitenas (P), espermátidas redondas (ER), espermátidas alargadas (EA) y célula de Sertoli (S). (Barra = 50 μ m)

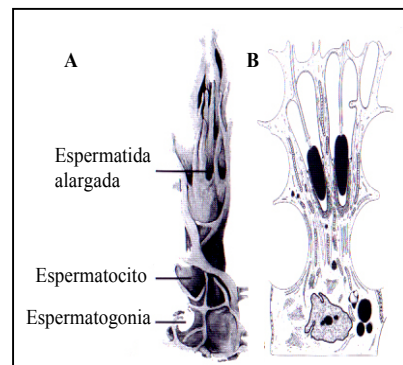
2.1.1 Regulación transcripcional

Durante la diferenciación, las células germinales masculinas sufren grandes cambios bioquímicos y morfológicos que requieren la expresión de genes específicos. En este proceso, las células sufren una remodelación cromatínica específica de espermatogénesis (Sassone-Corsi, 2002; 2005), y un control preciso de la transcripción capaz de gobernar los múltiples cambios en los patrones de expresión génica, promovidos, entre otros, por factores de transcripción y hormonas (Kimmins y col., 2004; Maclean y Wilkinson, 2005). Existen sucesivas fases de activación transcripcional, la primera de las cuales tiene lugar en espermatogonias. Las espermatogonias son células diploides ($2n$), que tienen actividad proliferativa (espermatogonias tipo A) o se diferencian a espermatogonias tipo B antes de entrar en el proceso de meiosis. Sin embargo, los tipos celulares que presentan mayor nivel de activación transcripcional de genes *de novo* son paquitenas y espermátidas redondas (Kleene y col., 1983). Durante la fase de espermiogénesis suceden los cambios morfológicos más destacados: compactación de la cromatina, formación del acrosoma y el flagelo y eliminación del citoplasma residual. En espermátidas redondas es frecuente un retraso de la transcripción a la traducción, algunos transcritos se acumulan en los denominados cuerpos cromatoides hasta que son traducidos en algún momento durante la elongación de las espermátidas (Steger, 2001). En esta fase se reemplazan las histonas por proteínas de transición, y éstas por protaminas. Lo que permite una mayor compactación de la cromatina, que culmina con la parada de la transcripción durante el estadio 9 de la fase de elongación (Kierszenbaum y Tres, 1975).

1.1.2 La célula de Sertoli

Las células de Sertoli son el componente somático del epitelio seminífero y se extienden desde la zona basal hacia el lumen del túbulo seminífero, constituyendo el soporte de las células germinales. Controlan la distribución y movimiento de las células de la línea germinal. Presentan una morfología arborescente con extensiones apicales y laterales donde se alojan las células de la línea germinal en diferentes estados de diferenciación, facilitando interacción y un micro ambiente definido (Fig. 2).

Figura 2: Dibujo de una célula de Sertoli en el que se muestran las criptas donde se alojan las espermatidas en desarrollo y los nichos donde se alojan los espermatocitos y espermatogonias (A). Esquema de una célula de Sertoli con dos espermatidas dentro de las criptas (B). Dibujos obtenidos de Skinner y Griswold, (2005).



La existencia de uniones estrechas entre células de Sertoli; de uniones tipo “gap” y desmosomas entre células de Sertoli y las células de la línea germinal; y de la célula de Sertoli con la lámina basal (Fig. 3) (Lui y Lee, 2006) permiten la compartimentación característica del túbulo seminífero. Las uniones estrechas forman la barrera hemato-testicular que divide el epitelio en un compartimento basal y en un compartimento adluminal. Las gonias se encuentran en la zona basal mientras que el resto de células germinales se encuentran en la zona luminal; siendo las espermatidas alargadas y espermatozoides junto con las células de Sertoli los tipos celulares más expuestos al lumen (Russell y Griswold, 1993).

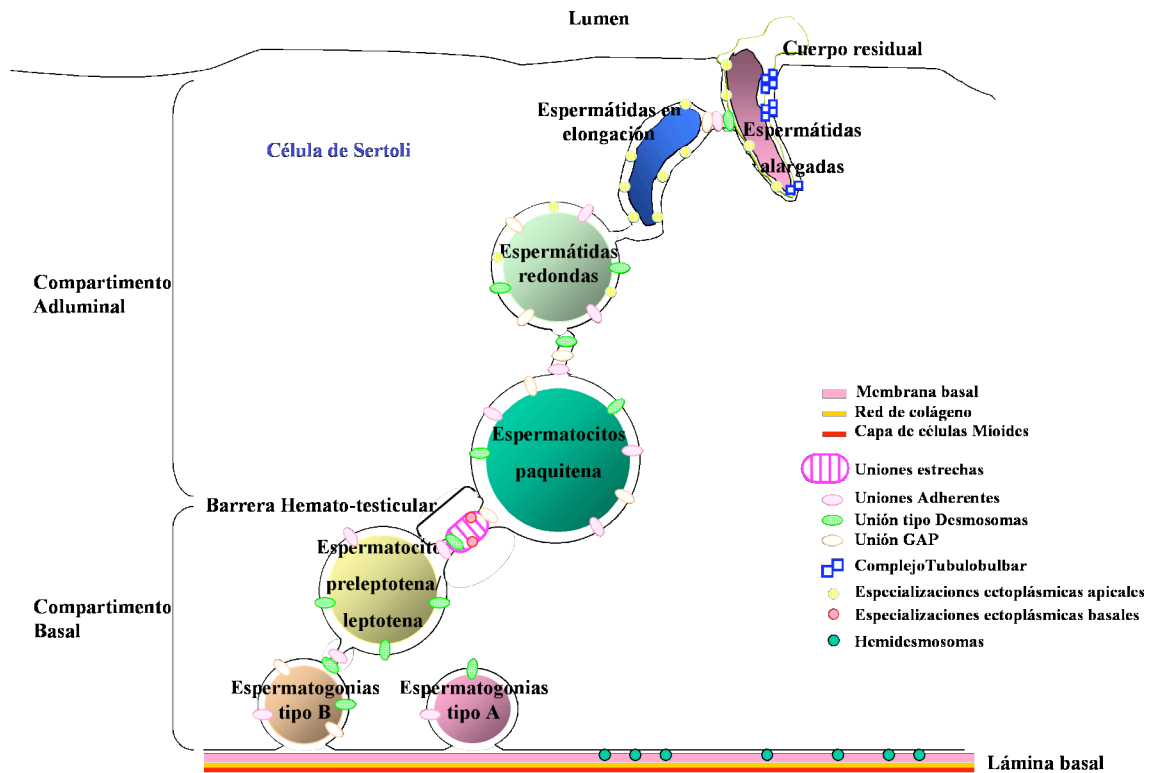


Figura 3: Dibujo esquemático de las uniones intercelulares que tienen lugar en el epitelio seminífero (basado en Lui y Lee, 2006).

2.2 Interferencia de RNA (RNAi)

El silenciamiento génico por RNAi es un proceso biológico, evolutivamente conservado, guiado por RNAs de doble cadena (dsRNA, “double stranded RNA”) que reconocen transcritos diana por complementariedad de secuencia. Este proceso conduce al silenciamiento génico, bien degradando los RNA mensajeros, o bien, impidiendo la traducción de los mismos (Fig. 4). Dentro de este proceso también se incluyen fenómenos de silenciamiento que afectan a regiones de cromatina (Ambros, 2004; Bartel, 2004; Baulcombe, 2004; He y Hannon, 2004; Lippman y Martienssen, 2004; Meister y Tuschl, 2004; Matzke y Birchler, 2005).

Van der Krol y col. (1990) y Napoli y col. (1990), describieron un fenómeno de supresión génica en flores de *Petunia hybrida* que denominaron cosupresión, ya que al intentar sobre expresar un gen concreto mediante la introducción de un transgén, se anulaba

tanto la expresión del transgén, como la del gen endógeno. En 1994, Dougherty observó que la cosupresión actuaba a nivel de RNA; pero fue en 1998 cuando Fire y Mello, basándose en experimentos previos realizados por Guo y Kemphues (1995), caracterizaron el proceso de interferencia de RNA. Inoculaban en el nematodo *Caenorhabditis elegans* RNA bicatenario correspondiente al gen *unc-22*, que ejerce su función a nivel muscular. Pocas moléculas de dsRNA eran suficientes para provocar el silenciamiento del gen. Este mismo efecto lo obtuvieron en casi todos los genes que estudiaron y lo denominaron interferencia de RNA (RNAi).

La utilización de *C. elegans* y *Drosophila melanogaster*, como organismos modelo, ha permitido descubrir genes implicados en los mecanismos de RNAi. Existen peculiaridades específicas en cada especie estudiada pero, en general, el proceso está muy conservado.

En plantas, *C. elegans*, *D. melanogaster* y otros organismos, existe una ruta de silenciamiento por RNA en la que las moléculas efectoras son dsRNA largos que pueden proceder de la síntesis endógena de cadenas complementarias, o pueden tener una procedencia exógena a partir de secuencias virales o por la introducción de moléculas sintetizadas artificialmente (revisado en Filipowicz y col., 2005). Estas moléculas son procesadas por la enzima DICER en moléculas de dsRNA de 21 a 23 pb denominadas pequeños RNA interferentes (siRNA, “small interfering RNA”).

En mamíferos se desconoce si la enzima DICER es capaz de reconocer secuencias de dsRNA largos procedentes de virus o transposones. Sin embargo, se sabe que la introducción de dsRNA largos en células de mamíferos activa rutas de respuesta a interferón, mediadas por las enzimas PKR y 2'5'-oligoadenilato sintetasa (Hunter y col., 1975; Barber, 2001). Esta respuesta se ha descrito como una reacción frente a infecciones virales que culmina con la degradación inespecífica de mRNAs y la inhibición de la síntesis de proteínas (Williams, 1999). Excepcionalmente, se ha conseguido silenciar genes mediante la introducción de

dsRNA largos en algunas líneas celulares troncales o procedentes de carcinomas (Billy y col., 2001; Svoboda y col., 2001; Yang y col., 2001), en oocitos y en embriones antes de su implantación en el útero, donde parece que no causa efectos inespecíficos (Svoboda y col., 2000 y 2001; Wianny y Zernicka-Goetz, 2000), ya que son sistemas que carecen de respuesta a interferón.

Para silenciar artificialmente genes en células somáticas de mamíferos se utilizan dsRNA de 21-23 pb similares a los generados por DICER (Zamore y cols., 2000; Bitko y Barik, 2001, Elbashir y col., 2001), que al ser menores de 30 pb no activan a las proteínas de respuesta a interferón.

En mamíferos también han sido descritos procesos de silenciamiento por RNA mediado por moléculas endógenas de dsRNA denominadas microRNAs (miRNA). El procesamiento de miRNAs parece tener vías comunes con el de algunos siRNAs (Fig. 4) (revisado en Carrington y Ambros, 2003). Los microRNAs primarios (pri-miRNAs, “primary microRNAs”) son moléculas de RNA de cadena sencilla que se transcriben a partir de la RNA polimerasa II (Lee y col., 2004a), con un tamaño comprendido entre varios cientos y varios miles de nucleótidos (nt) (Lee y col., 2002), con varias horquillas intramoleculares consecuencia del apareamiento de bases entre secuencias parcialmente complementarias. Algunas de estas horquillas serán procesadas a precursores de microRNAs (pre-miRNAs, “precursor of microRNAs”) en el núcleo de la célula mediante la ribonucleasa III DROSHA (Lee y col., 2003), que genera un extremo 3' protuberante de dos nt. Esta fase se lleva a cabo en un complejo denominado procesador de miRNAs, en el que también se encuentra una proteína de unión a dsRNA, que DROSHA requiere para procesar los pri-miRNAs, denominada DGCR8 (Fig. 4) (Gregory y col., 2004). Los pre-miRNAs son moléculas pequeñas, de unos 70 nt, que se corresponden con horquillas presentes en el pri-miRNA. Generalmente, las horquillas constan de dos cadenas complementarias, con una secuencia de

4 a 10 nucleótidos no complementarios que forman un lazo en un extremo (Fig. 4). Los pre-microRNAs son transportados al citoplasma por el complejo RanGTP/exportina 5 (EXP 5) (Yi y col., 2003; Lund y col., 2004; Bonhsack y col., 2004). Ya en el citoplasma, los pre-microRNAs son procesados por DICER que corta el pre-miRNA eliminando el lazo y generando una molécula de dsRNA de 21-23 pb con dos nt 3protuberantes en cada extremo, denominada microRNA, en un proceso que en mamíferos es independiente de ATP (Zhang y col., 2002). DICER requiere también de la ayuda de una proteína de unión a dsRNA denominada “HIV-1 TAR RNA binding protein” (TRBP) (Chendrimada y col., 2005; Haase y col., 2005) para que el miRNA sea ensamblado en un complejo ribonucleoproteico (“microRNA ribonucleoprotein particles, miRNP”) que será el encargado de llevar a cabo el silenciamiento, ya sea mediante degradación del RNA mensajero diana o mediante inhibición de la síntesis de proteínas (Fig. 4) (Mourelatos y col., 2002). En algunos casos el miRNP contiene a la proteína argonauta 2 (AGO2), formando un miRNP denominado complejo silenciador inducido por RNA (RISC, “RNA induced silencing complex”). Este complejo, por medio de AGO2, es capaz de producir roturas endonucleolíticas en el RNA mensajero diana (Meister y col., 2004). Los complejos miRNP o RISC son dirigidos por complementariedad de bases de los respectivos RNAs: miRNA/siRNA y mRNA. Sin embargo, parece que existe un RISC específico de miRNAs (miRISC) y un RISC específico de siRNAs (siRISC). La caracterización del complejo RISC y el estudio sobre el acoplamiento del siRNA en el complejo se han llevado a cabo en el siRISC (revisado en Sontheimer y Carthew, 2005), y se supone que el ensamblaje del miRISC debe ser parecido. Las dos cadenas que forman el siRNA se separan durante el ensamblaje del siRISC (Martínez y col., 2002; Pham y col., 2004; Lee y col., 2004b), de manera que una de las cadenas del siRNA se acopla al siRISC (cadena guía), mientras la otra (cadena pasajera) es procesada por la proteína AGO2 (Rand y col., 2005; Leuschner y col., 2006), que produce una rotura endonucleolítica en el medio de la

cadena. La unión de una de las dos cadenas del siRNA al complejo RISC depende de la estabilidad termodinámica del apareamiento de bases en los dos extremos del dúplex de RNA, de manera que la cadena que tiene el extremo 5' menos estable será la que se quede en el complejo RISC y se denominará cadena guía (Martínez y col., 2002; Khvorova y col., 2003; Schwarz y col., 2003; Tomari y col., 2004). Se ha encontrado que AGO1 también forma parte de RISC (Martínez y col., 2002), pero se desconoce si el resto de proteínas de la familia Argonauta forma parte del mismo complejo o si son capaces de formar otros complejos miRNPs (Meister y col., 2004; Meister y Tuschl, 2004; Okamura y col., 2004; Maniataki y Mourelatos, 2005 a y b).

Se ha descrito otro proceso de silenciamiento por RNA, localizado en el núcleo de la célula, por el cual siRNAs que se forman a partir de transcritos que contienen elementos repetidos se incorporan en un complejo de silenciamiento transcripcional inducido por RNA (RITS, "RNA-induced transcriptional silencing complex") y promueven modificaciones en la cromatina que conducen a silenciamiento génico (revisado en Lippman y Martienssen, 2004; Matzke y Birchler, 2005). Recientemente, se ha descrito que siRNAs dirigidos contra secuencias promotoras de un gen o contra orígenes de replicación, pueden inducir metilación del DNA y, por tanto, silenciamiento génico en células de mamíferos (Kawasaki y Taira, 2005; Morris, 2005; González y col., 2006).

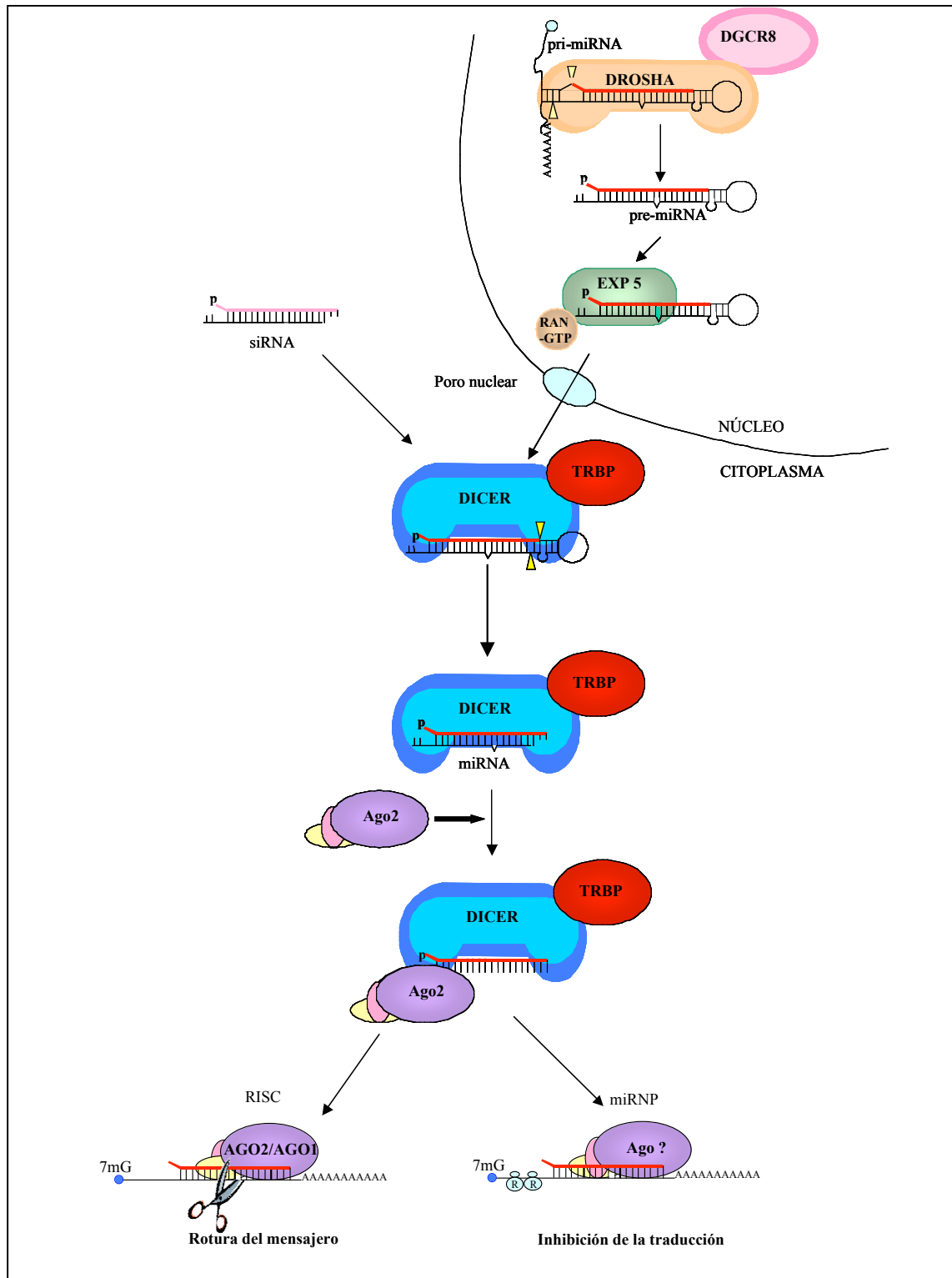


Figura 4: Esquema del mecanismo de silenciamiento génico por RNAi en mamíferos. 7mG = 7 metil Guanosina. Los triángulos amarillos representan los sitios de corte de las enzimas DROSHA y DICER.

2.3 Regulación de genes que codifican proteínas implicadas en RNAi

2.3.1 *Drosha (Rnase). Ribonucleasa III nuclear*

La proteína DROSHA pertenece a la clase II de la familia de las RNasas III y contiene: dos dominios RNasa III (RIII) (Fillipov y col., 2000; Wu y col., 2000), un dominio de unión a dsRNA, un dominio rico en prolina y otro rico en arginina y serina (Fig. 5).

Esta proteína se localiza en el núcleo y es la encargada de procesar los pri-miRNAs a pre-miRNAs (Lee y col., 2003), utilizando su actividad RNasa III. Deja dos o tres nt protuberantes en el extremo 3' del pre-miRNA. Requiere la ayuda de una proteína con dominios de unión a dsRNA, que en *D. melanogaster* se denomina PASHA y en *C. elegans* y mamíferos DCGR8 (Denli y col., 2004; Gregory y col., 2004; Han y col., 2004; Landthaler y col., 2004). Juntas forman el complejo procesador de miRNAs. Los dos dominios RIII de DROSHA forman un único centro de procesamiento con dos sitios catalíticos, que rompen, cada uno, un enlace fosfodiéster en cada extremo 3' o 5' del pri-miRNA (Han y col., 2004).

Tanto en humanos como en ratón el gen *Drosha* presenta una expresión ubicua en tejidos y líneas celulares (Wu y col., 2000; Fortín y col., 2002). En testículo de ratón, además de un transcrito de 5 kb de expresión ubicua, se ha detectado otro transcrito de 3,5 kb cuya secuencia aún no se conoce. Estos análisis se han llevado a cabo mediante RT-PCR y “Northern-blot” (Fortín y col., 2002).

2.3.2 *Dicer*

La proteína DICER pertenece a la clase III de la familia RNasas III. Se identificó inicialmente en *D. melanogaster* (Bernstein y col., 2001). En mamíferos se compone de un dominio DexH/DEAH RNA helicasa/ATPasa, un dominio PAZ, dos dominios RNasa (RIII) y un dominio de unión a dsRNA (Fig. 5) (Matsuda y col., 2000, Nicholson y Nicholson, 2002, Provost y col., 2002, Zhang y col., 2004). Reconoce específicamente dsRNA y los corta en fragmentos de 21 a 25 pb (Bernstein y col., 2001; Billy y col., 2001; Ketting y col., 2001).

Los dos dominios RIII de DICER forman un dímero intramolecular capaz de realizar dos cortes, uno en el extremo 3' y otro en el 5' (Zhang y col., 2004). DICER requiere de la proteína TRBP para unirse a AGO2 y constituir el complejo RISC (Chendrimada y col., 2005).

La expresión de *Dicer* es ubicua, pero varía dependiendo del tejido (Nicholson y Nicholson, 2002; Sago y col., 2004; Yang y col., 2005); aunque los niveles de expresión medidos mediante diferentes técnicas (RT-PCR en Tiempo Real, “Northern-blot”) son contradictorios. Se ha observado expresión en tejidos embrionarios (Nicholson y Nicholson, 2002) y se ha sugerido su implicación en angiogénesis (Yang y col., 2005) y en la morfogénesis del pulmón (Harris y col., 2006). Se ha comprobado que la expresión de *Dicer* durante la organogénesis en ratón se encuentra restringida a determinados órganos, e incluso a determinadas regiones dentro de un órgano (Lu y col., 2005a), y su carencia provoca letalidad durante el desarrollo temprano del embrión (Bernstein y col., 2003).

2.3.3 Genes de la familia Argonauta (*Eif2c 1-4*, “*Eukariotic translation initiation factor 1-4*”; *Ago 1-4*)

La familia argonauta se divide en dos subfamilias en función de la similitud de secuencia con la proteína Argonauta 1 de *A. thaliana* o con la proteína Piwi de *D. melanogaster* (Carmell y col., 2002; Sasaki y col., 2003). En mamíferos hay 4 miembros de la subfamilia Argonauta (*Ago1-4*) que han sido relacionados con procesos de RNAi (Doi y col., 2003; Meister y col., 2004; Liu y col., 2004).

La ruta de RNAi mejor caracterizada es la que se induce cuando se trata de aplicar RNAi como herramienta para silenciar genes, y culmina con la rotura endonucleolítica del mensajero diana. La proteína componente de RISC encargada de romper el mensajero es AGO2 (Liu y col., 2004). La otra ruta de RNAi conduce a la inhibición de la traducción y,

aunque parece que las proteínas argonauta están implicadas en este proceso, se desconoce su relación con él (revisado en Zamore y Haley, 2005).

En humanos se han detectado 4 miembros de la subfamilia Piwi (Sasaki y col., 2003) que se expresan predominantemente en testículo. En ratón, dos de estos genes, *Miwi* y *Mili*, son específicos de testículo y tienen una función crucial para el progreso de la espermatogénesis (Deng y Lin, 2002; Kuramochi-Miyagawa y col., 2004), aunque inicialmente no se habían relacionado con RNAi.

Las proteínas Argonauta están constituidas por cuatro grandes dominios: N-terminal, PAZ, medio y PIWI (Fig. 5), dos de los cuales están muy conservados:

- PAZ, se denominó así porque se encontró en tres proteínas de *D. melanogaster* conocidas como: Piwi, Argonaute, y Zwilli; además, está también presente en DICER. Este dominio consta de 130 aminoácidos, y está compuesto por dos subdominios separados por una hendidura. Parece estar implicado en los procesos de unión al siRNA (Lingel y col., 2003; Song y col., 2003; Yan y col., 2003). Reconoce extremos 3' de cadena sencilla (ssRNA, "single stranded RNA"), a través de los residuos altamente conservados que se encuentran en la hendidura. Por lo tanto, los dos nucleótidos 3' protuberantes que quedan tras la rotura de los dsRNAs, mediada por DICER o por DROSHA, son vitales para el reconocimiento de estas moléculas por las proteínas Argonauta.
- PIWI, se encuentra en el extremo carboxilo de las proteínas AGO 1-4 (Ceruti y col., 2000) y es específico de las proteínas Argonauta y Piwi. El núcleo de este dominio pertenece a la familia de enzimas con actividad RNasa H (Song y col., 2004), y contiene tres residuos conservados en su centro catalítico: dos aspartatos y una histidina, dominio DDH, análogo al dominio catalítico DDE de las enzimas con actividad RNasa H (Yang y Steitz, 1995). Mutaciones en cualquiera de estos residuos

en la proteína AGO2 impiden su función (Liu y col., 2004; Rivas y col., 2005). Se ha observado que el dominio Piwi es esencial en la formación de complejos entre las proteínas Argonata y la proteína DICER (Doi y col., 2003). Esta unión se hace a través de un subdominio denominado caja PIWI (Cox y col., 1998) que se une directamente al dominio RIII de DICER (Tahbaz y col., 2004).

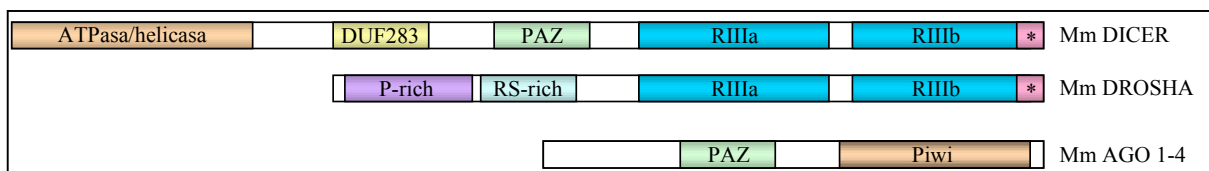


Figura 5: Esquema de las proteínas DROSHA, DICER y AGO 1-4. Dominio RNasa III (RIII).

Dominio de unión a dsRNA (*).

Se ha descrito que los genes *Ago 1-4* se expresan de forma dependiente de tejido durante la organogénesis en ratón, de manera que incluso dentro de un mismo órgano cada gen se expresa más abundantemente en unas regiones que en otras (Lu y col., 2005a). Se realizó un estudio de expresión génica por RT-PCR en Tiempo Real en el que se observó, que tanto *Dicer* como los genes *Ago* se expresan abundantemente en testículo, en comparación con el resto de tejidos adultos, siendo la mayor expresión la de *Ago3* y *Ago4* (Sago y col., 2004).

2.4 RNAi en testículo

Recientemente se han publicado varios trabajos que tratan de diseccionar el proceso de RNAi en testículo. Okada y col., (2004) consiguieron silenciar *in vitro* el gen *Nalp7* en la línea celular Tera 1, lo que se tradujo en la supresión del crecimiento de esta línea tumoral de origen testicular, abriendo el camino a la aplicación de RNAi como terapia contra el cáncer testicular. Posteriormente, se publicó el silenciamiento del gen específico de células germinales fosfolipasa C \square (Knott y col., 2005), mediante la generación de un transgénico que

expresaba un dsRNA pequeño, similar a un pre-miRNA, que se denomina RNA pequeño con forma de horquilla (“short hairpin RNA”, shRNA) dirigido contra este gen. De esta manera se demostró la implicación de este gen en la activación del oocito en la fecundación. Por otro lado, Yu y col. (2005) identificaron 29 miRNAs que se expresaban diferencialmente durante el desarrollo del testículo. Uno de ellos, el mir122a, regulaba la expresión de la proteína de transición 2 (TNP2). Lo que indicaba que había células de testículo que presentaban la maquinaria endógena de silenciamiento génico guiado por miRNAs. Shoji y col., (2005) consiguieron silenciar genes en espermatogonias, espermatocitos y espermátidas redondas, mediante la introducción local de shRNAs utilizando la técnica de microinyección en túbulo seminífero de ratón y transfección mediada por electroporación de onda cuadrada.

Respecto a la caracterización de proteínas implicadas en RNAi, las proteínas Argonata se han localizado en mamíferos en unos cuerpos citoplásmicos llamados cuerpos P (“Processing bodies”, “*P-Bodies*”) o (“GW Bodies”) (Liu y col., 2005b; Sen y Blau, 2005). Estos, contienen mensajeros no traducidos y son ricos en proteínas implicadas en procesos de degradación de mensajeros y excluyen elementos de la maquinaria de traducción (Eystathioy y col., 2003; Brengues y col., 2005; Teixeira y col., 2005). Además, las proteínas Argonata se han hallado junto con mensajeros objeto de represión traduccional mediada por miRNA (Sen y Blau, 2005; Liu y col., 2005a) y junto con miRNAs y siRNAs (Pillai y col., 2004; Jakymiw y col., 2005) en estos complejos. Por otro lado, se comprobó que las proteínas AGO1 y AGO2 interaccionan físicamente con proteínas componentes de los cuerpos P, DCP1a y DCP2 (Liu y col., 2005a) y GW182 (Liu y col., 2005b; Jakymiw y col., 2005). De estos datos se podría concluir que las rutas de RNAi de degradación de mensajeros y de inhibición de la traducción colocalizan en los cuerpos P.

En testículo existen unos cuerpos similares a los cuerpos P somáticos, denominados cuerpos cromatoides (“chromatoid body”, *cb*), a su vez relacionados con otras estructuras

citoplásmicas en otros organismos como *D. melanogaster*, donde se denominan “germplasm” o “nuage”. Estas estructuras en *D. melanogaster* se han relacionado con sitios de regulación traduccional. Los cb son gránulos lobulados perinucleares que se encuentran en el citoplasma de espermátidas redondas, que comparten con los cuerpos P proteínas como DCP1a. En ellos se han localizado las proteínas MIWI, DICER y las proteínas AGO2 y AGO3. Además, se localizaron miRNAs como el miR-21 y el let-7a, así como el miRNA específico de testículo miR122a y se encontró que DICER interacciona con una proteína característica de los cb llamada MVH (Kotaja y col., 2006).

Tanto los cuerpos P de células somáticas como los cb de células germinales están funcionalmente relacionados, y ambos están implicados en eliminación de mensajeros y en represión traduccional de mensajeros mediada por miRNAs.

2.4.1 RNAi en células de Sertoli

El silenciamiento génico por RNAi se ha aplicado con éxito en varias líneas celulares establecidas y derivadas de células de Sertoli como: TM4, Smat 1 y SK11 (Zeng y col., 2004; Belville y col., 2005; Sneddon y col., 2006). Estas líneas mantienen características de células de Sertoli *in vivo*, pero han sufrido modificaciones funcionales (Rassoulzadegan y col., 1993). Sin embargo, aún no se habían estudiado en cultivos primarios de células de Sertoli.

Recientemente se ha conseguido silenciar un gen en células de Sertoli *in vivo* mediante generación de ratones transgénicos que expresan shRNAs para inhibir la expresión del gen *Wtl* (Rao y col., 2006).

Sin embargo, tal y como se sugiere en Shoji y col., (2005) y en esta Tesis Doctoral, la introducción *in vivo* de vectores que expresen shRNAs en células del epitelio seminífero permitiría estudiar funciones génicas específicas de manera más rápida y menos costosa que mediante la generación de transgénicos. En esta Tesis Doctoral presentamos la posibilidad de

silenciar genes en células de Sertoli mediante la técnica de microinyección en epitelio seminífero *in vivo* y transfección mediada por electroporación de onda cuadrada.

2.5 Metodologías aplicadas a genómica funcional en epitelio seminífero

En general, existen dos formas de abordar estudios génicos funcionales: *in vitro* o *in vivo*. Los trabajos *in vitro* se han basado en líneas celulares derivadas del tipo celular que se quiere estudiar o sobre cultivos primarios. En el caso del epitelio seminífero no existen sistemas eficaces de cultivo y diferenciación de células de la línea germinal y, aunque es relativamente fácil realizar un cultivo primario de células de Sertoli, aún se está lejos de conseguir un desarrollo completo de la espermatogénesis mediante su cocultivo con células de la línea germinal, aunque algunos autores lo han propuesto (Rassoulzadegan y col., 1993; Staub, 2001; Marh y col., 2003), pero sin reproducibilidad experimental. Por lo que los estudios *in vitro* se han reducido a abordajes experimentales en cultivos primarios de células de Sertoli, o en líneas derivadas de células de Sertoli (TM4, Smat 1, Sk11, 15p1, etc).

Debido a los problemas en el establecimiento de modelos *in vitro*, los principales trabajos sobre la espermatogénesis se han llevado a cabo *in vivo*, bien anulando la expresión (“Knock Out”, KO) o sobreexpresando (transgénesis) el gen objeto de estudio (revisado en Escalier, 2001). Sin embargo, el desarrollo de nuevas aproximaciones experimentales que permitan la investigación *in vivo* de expresión y función génica en espermatogénesis, facilitaría un análisis multigénico, obviando muchos de los inconvenientes de la generación de animales transgénicos o mutantes nulos (KO) como tiempo, presupuesto y el inconveniente de que tales animales modificados genéticamente en genes de espermatogénesis pueden implicar infertilidad masculina.

La transferencia génica local *in vivo* es una herramienta valiosa para el estudio de procesos biológicos básicos y, como contrapartida a la transgénesis, presenta un gran atractivo como terapia frente a enfermedades.

2.5.1 Técnicas de microinyección en el túbulo seminífero

La microinyección en el túbulo seminífero se desarrolló inicialmente para introducir células troncales de la línea germinal procedentes de un ratón fértil, en el lumen de los túbulos seminíferos de ratones infértiles, y restaurar su fertilidad (Brinster y Avarbock, 1994; Brinster y Zimmerman., 1994). En la actualidad, existen tres formas de acceder al interior de un túbulo seminífero (Fig. 9d) (Ogawa y col., 1997): a) consistente en inyectar directamente a través de los túbulos seminíferos; b) consistente en acceder a través del conducto eferente a la *rete testis*, que es una red de tubulillos, donde empiezan y terminan los túbulos seminíferos, y de la que parten el conducto eferente y el epidídimo; c) consistente en inyectar directamente en la *rete testis*.

2.5.2 Transfección *in vivo* de las células del epitelio seminífero

Se han probado diferentes técnicas de transfección para introducir vectores de DNA en las células del epitelio seminífero, como liposomas (Sato y col., 2002; Celebi y col., 2002) o vectores virales (Blanchard y Boeckelheide., 1997; Ikawa y col., 2002). Sin embargo, la metodología de transfección empleada con mayor éxito fue la llevada a cabo mediante electroporación de onda cuadrada (Muramatsu y col., 1997; Yamazaki y col., 1998; Yamazaki y col., 2000; Huang y col., 2000; Yomogida y col., 2002 Hisano y col., 2003; Ike y col., 2004). Este tipo de electroporación permite aplicar pulsos de baja intensidad pero constantes, durante periodos de tiempo variables, reduciendo la agresión que sufría el tejido con métodos de electroporación tradicionales.

Cuando se inició esta Tesis Doctoral, aún no se había aplicado ninguna técnica de silenciamiento génico por RNAi en testículo *in vivo*. El emergente campo del silenciamiento génico pos-transcripcional nos permitió abordar el estudio del silenciamiento génico *in vivo* en epitelio seminífero de ratón.

Nuevos estudios realizados mediante la técnica de microinyección en *rete testis* y posterior electroporación han ayudado a determinar la eficacia de transfección y determinar qué tipos celulares son preferentemente transfectados (Shoji y col., 2005). Tanto Shoji y col. (2005), como los autores anteriormente citados, sugerían que Sertoli sería el tipo celular preferentemente transfectado cuando se intenta transfectar testículos de ratones adultos.

En esta Tesis se ha determinado la eficacia de silenciamiento génico en células de Sertoli mediante la administración local de vectores que expresan shRNAs microinyectados en testículos de ratones adultos.

3 OBJETIVOS

Los objetivos de esta Tesis Doctoral son:

- Estudiar el silenciamiento de la expresión de genes mediante RNAi en células del epitelio seminífero de ratón.
- Analizar comparativamente, *in vivo* e *in vitro*, la eficiencia de transfección de vectores capaces de transcribir shRNAs y la eficacia en el silenciamiento de la expresión de genes endógenos en distintos tipos celulares que conforman el epitelio seminífero.
- Caracterizar la expresión de genes que codifican proteínas implicadas en el proceso de RNAi: *Drosha*, *Dicer*, *Ago1*, *Ago2*, *Ago3* y *Ago4* en testículo. Valorando comparativamente sus niveles de expresión en: testículo en desarrollo, tipos celulares del epitelio seminífero y diferentes tejidos somáticos.

4 MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Materiales

4.1.1 Soluciones

Anestesia: Ketolar (84 mg/kg)/ Rompún (315 μ l/kg) en PBS 1X.

Bouin: Solución acuosa saturada de ácido pícrico con formaldehído (9,25 %, v/v) y ácido acético glacial (4,75 %, v/v).

CHURCH: Na₂HPO₄ x 2H₂O (0,25M), NaH₂PO₄ x H₂O (0,25M), SDS (7%, p/v), EDTA (1mM) y BSA (1%, p/v).

Colagenasa-Dispasa (Boehringer, Ref.: 269 638): Diluida en DMEM:F12 (1:1) a 10 mg/ml.

DNasa I (Boehringer, Ref.:104159): En DMEM: F12 (1:1) a 5 mg/ml.

Fijador de células y tejidos: Paraformaldehído al 4% (p/v) en PBS pH 7.0 (PFA).

Hialuronidasa (Sigma, Ref.: H-3506): En DMEM: F12 (1:1) a 20 mg/ml.

PBS: NaCl 136 mM, Kcl 2.6 mM, Na₂HPO₄ 8 mM, KH₂PO₄ 1.7 mM, pH 7.4.

PBSG: NaCl 136 mM, Kcl 2.6 mM, Na₂HPO₄ 8 mM, KH₂PO₄ 1.7 mM, pH 7.4., glucosa 0.1 % (p/v).

Tratamiento con DEPC: El agua se trató con DEPC 0,1 % (v/v). Se agitó enérgicamente y se esterilizó en autoclave.

Solución de microinyección: TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM), pH 7,5, suplementado con 0,04% (p/v) de azul tripán (Sigma, Ref.: T8154) ó 1 mg/ml de nigrosina (MERCK, Ref.: CI 50420), ó “fast green” 0,1% (p/v) (Sigma, Ref.: F-7252).

Solución de lavado para “Northern-blot”: SSC 2X (v/v), SDS 0,1% (v/v).

SSC 1X: NaCl 150 mM, citrato sódico 15 mM, pH 7.0.

Tampón de carga de electroforesis de DNA: glicerol 50% (v/v), SDS 0.1% (v/v), EDTA 0.1 M, azul de bromofenol 0.025% (p/v), xilen-cianol 0.025% (p/v).

Tampón de carga de electroforesis de RNA: formamida 62.5% (v/v), formaldehído 6.6% (v/v), tampón Northern 1X, glicerol 5% (v/v), púrpura de bromocresol 0.073% (v/v).

Tampón Northern 10X para electroforesis: ácido bórico 0.5 M, borato sódico 50 mM, NaSO₄ 100 mM y EDTA 10 mM.

Tampón TBE: Tris 90 mM, ácido bórico 90 mM, EDTA 2 mM, pH 8.0.

Tripsina/EDTA (GIBCO, Ref.: 25300-54).

4.1.2 Medios de cultivo

LB: bactotripton 1% (p/v), extracto de levadura 0.5% (p/v), NaCl 8.5 mM, pH 7.5. Esterilizado en autoclave.

LB Agar: medio LB más agar al 1.5% (p/v). Para medios selectivos se suplementa con alguno de los siguientes componentes: ampicilina 50 µg/ml, tetraciclina 12,5 µg/ml, kanamicina 25 µg/ml, IPTG 0.5 mM, X-Gal 40 µg/ml.

Medio de cultivo para células NIH-3T3: DMEM (GIBCO BRL, Ref.:41966-029) suplementado con suero bovino fetal (SBF) 10% (v/v), L-Glutamina (2mM), penicilina-estreptomicina 100 U/ml (GIBCO BRL, Ref.:15140-114).

Medio para cultivo primario de fibroblastos: DMEM suplementado con 10% SBF (v/v), HEPES 1M, mezcla de aminoácidos no esenciales 1% (GIBCO, Ref.: 11140-035), L-Glutamina 1%, penicilina/estreptomicina 100 U/ml y piruvato sódico 100 U/ml.

Medio de cultivo DMEM: F12 (1:1) para células de Sertoli: HAM-F12 (GIBCO BRL, Ref.:11760-022) mezclado con DMEM (1:1) y suplementado con SBF (10 %), ITSS 1X (SIGMA, Ref.: I-1884), penicilina-estreptomicina 100 U/ml.

4.1.3 Estirpes bacterianas

“Transforming One Shot DH5α”: Células de *Escherichia coli* competentes para transformación química o por electroporación.

regiones sentido y antisentido del RNA hibridarán y la región intermedia dará lugar a un lazo, constituyendo un shRNA.

- **CAG:** Promotor quimérico reconocido por la RNA polimerasa II que regula la expresión del gen *HcRed1*. Está constituido por el promotor de la beta actina de pollo fusionado con la secuencia potenciadora (“enhancer”) de la transcripción del promotor CMV-IE (Niwa y col., 1991).

-pRed (Fig. 7): El plásmido pRed fue construido en nuestro laboratorio. Deriva de pGtoR por delección del fragmento que contiene el promotor H1 más la región codificante del shRNA_{EGFP}. Se utilizó como control negativo en el estudio de silenciamiento génico por RNA.

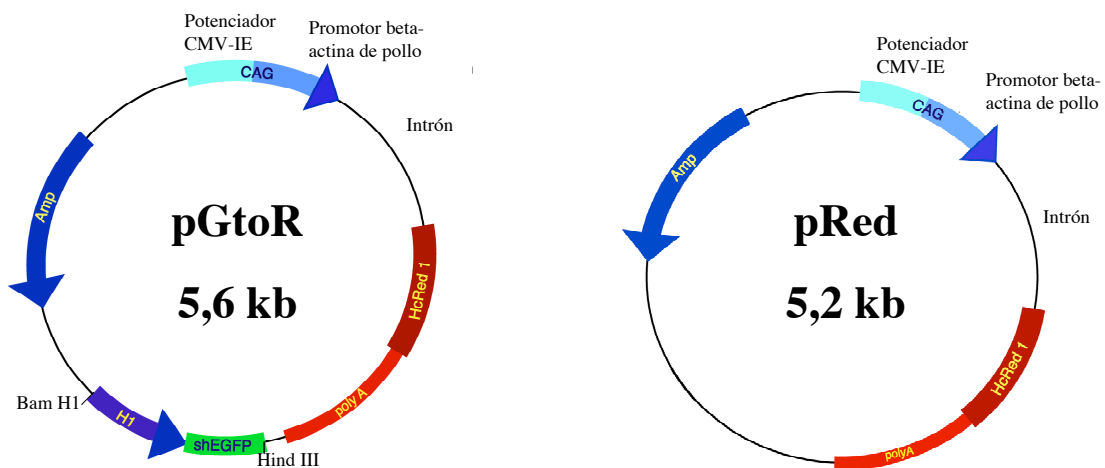


Figura 7: Vectores pGtoR y pRed. Amp = resistencia a ampicilina. *HcRed1* = región codificante de la proteína HCRED1.

-pEGFP-N1 (Clontech, ref.: 6085-1): Vector de expresión que contiene el gen de la proteína verde fluorescente EGFP bajo el control del promotor del citomegalovirus humano (CMV).

4.1.6 Animales

Línea FM131 (C57BL6 TgN(act-EGFP)OsbC14-Y01-FM131) (RIKEN BRC): Línea de ratones C57 que produce constitutivamente la variante EGFP de la proteína fluorescente verde GFP en todos los tejidos salvo eritrocitos y pelo (Okabe y col., 1997) (Fig. 8).

Línea C57BL6/J: Se utilizaron ratones de esta línea como donantes de células de Sertoli no fluorescentes.

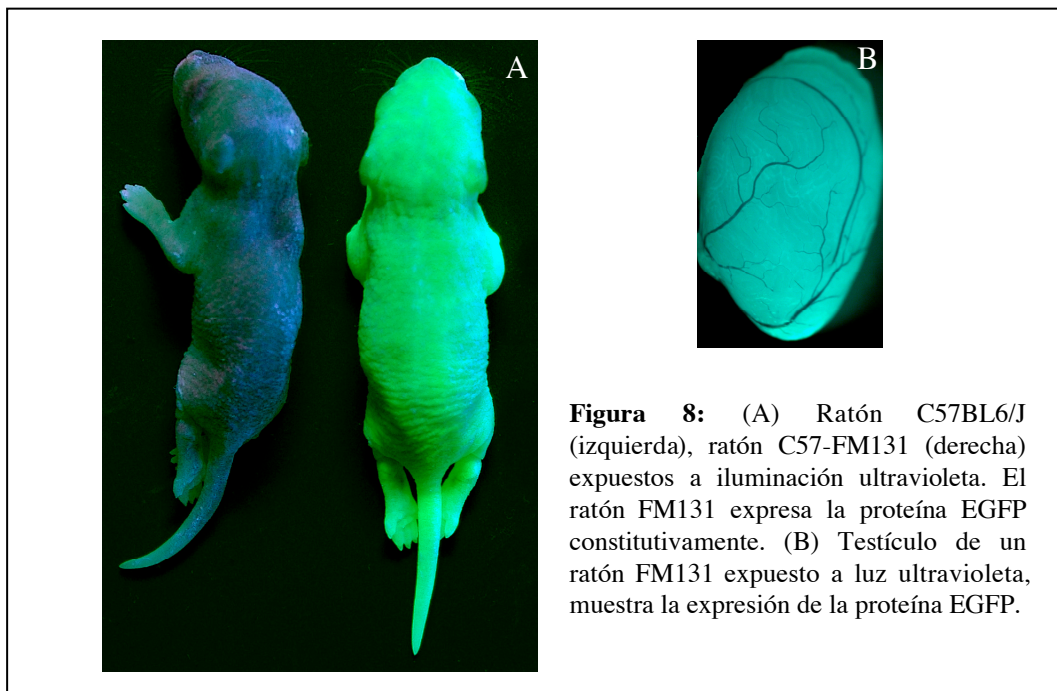


Figura 8: (A) Ratón C57BL6/J (izquierda), ratón C57-FM131 (derecha) expuestos a iluminación ultravioleta. El ratón FM131 expresa la proteína EGFP constitutivamente. (B) Testículo de un ratón FM131 expuesto a luz ultravioleta, muestra la expresión de la proteína EGFP.

Línea CD1: Se utilizaron como donantes de tejidos de los que se aisló RNA para estudios de expresión génica.

3.1.7 Membranas y filtros

“Zeta-Probe GT Blotting membranes” (BIO-Rad, Ref.: 162-0196): Membranas de nylon empleadas para transferir RNAs.

3.1.8 Columnas de cromatografía

“Quick spin sephadex G-50” (Boehringer Mannheim, Ref.: 1273-973): Columnas empleadas para la purificación de sondas de cDNA marcadas radiactivamente.

4.1.9 Precusores radiactivos

[α -³²P]-dCTP 3000 Ci/mmol, (Amersham Bioscience).

4.1.10 Kits comerciales

“Fugene 6 Transfection Reagent” (Roche Biochemicals, Ref.: 11814443001).

“High Pure Plasmid Isolation Kit” (Roche Biochemicals, Ref.: 1754777).

“High Pure PCR Product Purification Kit” (Roche Biochemicals, Ref.: 1732668).

“Plasmid Purification MIDI/MAXI Kits” (JETstar Ref.: 220025/10)

“ELU-QUIK DNA Purification kit” (Schleider & Schuell, Ref.: 10462632)

“SAINT 18” (Symbolux therapeutics)

“Trizol Reagent” (Invitrogen, Ref 15596-026)

“TOPO TA Cloning” (Invitrogen, Ref: K4500-01)

“Ready to GoTM DNA Labelling Veda” (dCTP) (Amersham Biosciences, Ref.: 27-9240-01)

3.1.11 Programas informáticos

Comparación de secuencias nucleotídicas y proteicas

BLAST (“Basic Local Alingment Search Tool”): <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>

Paquete de aplicaciones informáticas “DNA Compare”.

Bases de datos de genes y proteínas

MGI (“Mouse genome informatics”): <http://www.informatics.jax.org/>

Locus Link: <http://www.ncbi.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=gene>

Swiss-prot: <http://www.expasy.org/sprot/>

Interpro <http://www.ebi.ac.uk/interpro/index.html>

ENSEMBL.: <http://www.ensembl.org/index.html>

Programas para el diseño de oligonucleótidos

Primer Express™ 1.5 (Applied Biosystems)

OLIGO 4.0-s.

Oligonucleótidos

Denominación	Origen de la secuencia	Secuencia 5'-3'	Aplicación
H1P-F	Vector pGtoR	gaacgctgacgtcatcaacc	Comprobación pGtoR
pGtoR-R	Vector pGtoR	ttgagcatctgacttctggc	Comprobación pRed
Drosha-F	NM_026799	attatcctctccaccactc	Sondas para Northern
Drosha-R	NM_026799	ctgctgaatgcttggtcctt	Sondas para Northern
Dicer-F	NM_148948	ctaattggcaaactgggtgag	Sondas para Northern
Dicer-R	NM_148948	ctctccgctgggctaaactt	Sondas para Northern
Ago1-F	AB081471	tgccaacctctgctcaag	Sondas para Northern
Ago1-R	AB081471	ccaagcgagcatagtaggca	Sondas para Northern
Ago2-F	AB081472	agcgttttacaaggcacagc	Sondas para Northern
Ago2-R	AB081472	caggaagatgacaggttgct	Sondas para Northern
Ago3-F	ENSMUST00000030655	ggagcagaagcatacatacc	Sondas para Northern
Ago3-R	ENSMUST00000030655	ccaaccctttctgtcctatc	Sondas para Northern
Ago4-F	AB081474	ggcaagagcaaaagcatacc	Sondas para Northern
Ago-R	AB081474	gacattgccacttttcccca	Sondas para Northern
S16-F	BC082286	ttctgggcaaggagcgatt	RT-PCR en tiempo Real
S16-R	BC082286	gatggactgtcggatggca	RT-PCR en tiempo Real
RT-Dro F	NM_026799	ggaccatcacgaaggacacttg	RT-PCR en tiempo Real
RT-Dro R	NM_026799	atgccagttcctctgctacct	RT-PCR en tiempo Real
RT-Dicer F	NM_148948	ggatgcatgtgctatctgga	RT-PCR en tiempo Real
RT-Dicer R	NM_148948	gcactgctccgtgtgcaa	RT-PCR en tiempo Real
RT-Ago1 F	AB081471	gaagacgccagtgtatgctgaa	RT-PCR en tiempo Real
RT-Ago1 R	AB081471	atcttgaggcagaggttgaca	RT-PCR en tiempo Real
RT-Ago2 F	AB081472	gccgtcttcccactaccac	RT-PCR en tiempo Real
RT-Ago2 R	AB081472	ggtattgacacagagcgtgtgc	RT-PCR en tiempo Real
RT-Ago3 F	ENSMUST00000030655	ttggaagaagcggcaacatc	RT-PCR en tiempo Real
RT-Ago3 R	ENSMUST00000030655	gatagtgtgaaggacggctggt	RT-PCR en tiempo Real
RT-Ago4 F	AB081474	acacgctccgtctccattcc	RT-PCR en tiempo Real
RT-Ago4 R	AB081474	gactgcctccgcactgtca	RT-PCR en tiempo Real

Tabla I: Oligonucleótidos utilizados en diferentes abordajes experimentales. Para diseñar los oligonucleótidos se utilizaron secuencias procedentes de las bases de datos NCBI y ENSEMBL cuyos códigos de acceso se muestran.

4.1.11 Programas estadísticos

MedCalc

GradPrism

4.2 Métodos

Todos los experimentos con ratones se llevaron a cabo siguiendo protocolos de cría, estabulación y sacrificio supervisados por la Comisión de Bioética del CIB/CSIC.

4.2.1 Construcción de pRed

El vector pGtoR fue cedido amablemente por el Dr. Okabe (Universidad de Osaka, Japón).

A partir de pGtoR se construyó el vector que nos sirvió como control negativo: pRed. Se eliminó el fragmento que contenía H1-shRNA_{EGFP} mediante la digestión de pGtoR con las enzimas de restricción BamH1 y Hind III (Fig. 7). Los productos de la digestión se separaron en un gel de agarosa al 1,2 % y se aisló la banda de 5,2 kb. La banda se purificó con el kit “ELUQUIK” (Schleicher & Schuell). Se rellenaron los extremos protuberantes utilizando la actividad 5'-3' polimerasa del fragmento klenow de la ADN-polimerasa I de *E. Coli*. Se ligaron los extremos romos del plásmido con la DNA ligasa T4 y se transformaron bacterias DH5 α quimiocompetentes con el producto de ligación. Se seleccionaron varias colonias transformadas, que habían crecido en placas de LB-Agar con ampicilina y se purificaron los plásmidos con el kit comercial de Roche. Finalmente, se comprobó la presencia ó ausencia del fragmento H1-shRNA_{EGFP}, con los oligonucleótidos H1P-F y pGtoR-R.

4.2.2 Cultivo de la línea NIH-3T3 y transfección

Sobre placas de cultivo de 35 mm (Nunclon, Brand Products) con cubreobjetos en el fondo, se sembraron alrededor de 10⁵ células. Cuando se alcanzó un 70-80 % de confluencia se transfectó el vector pGtoR con “Fugene 6”, según las instrucciones del fabricante, en una relación Fugene:DNA 3:1. 48 h después de la transfección los cubreobjetos se lavaron brevemente en PBS 1X y se fijaron durante 30 minutos a 4° C en PFA al 4% en PBS-DEPC.

Se lavaron de nuevo en PBS y se montaron las preparaciones con glicerol-PBS (9:1). Finalmente, se tomaron fotografías en un microscopio de fluorescencia.

4.2.3 Cultivo primario de fibroblastos y transfección

Se realizó un cultivo primario de fibroblastos aislados de la piel de ratones FM131. Para ello, los ratones de 2/3 días de edad fueron sacrificados por asfixia mediante CO₂. Se separó la piel y se incubó en una solución de tripsina 0,25 % a 4° C durante 18 horas. Posteriormente, se lavó en PBS 1X y se colocó en una placa de petri seca con la dermis hacia abajo. Se separó la epidermis con unas pinzas y se cortó la dermis con bisturí en fragmentos cuadrados de 2 a 3 mm de lado. Alrededor de 6 fragmentos se colocaron en el centro de una placa de cultivo de 35 mm con un cubre encima, ya que el contacto con una superficie facilita su crecimiento. Finalmente, se añadió medio de cultivo DMEM suplementado y se mantuvieron en un incubador a 37°C y 5% CO₂. Las células se levantaron de la placa añadiendo tripsina/EDTA cada vez que el cultivo se hacía confluyente, y se sembraron sobre cubres 2 x 10⁵ células por placa de 60 mm.

Antes de la transfección se cambió el medio para eliminar células muertas. Se transfectó el vector pGtoR con “Fugene 6” siguiendo las recomendaciones del fabricante. El análisis se realizó 48 horas después de la transfección. Para ello, los cubres se lavaron brevemente en PBS 1X y se fijaron durante 30 minutos a 4° C en PFA al 4% en PBS-DEPC. Se lavaron de nuevo en PBS y se montaron las preparaciones con glicerol-PBS (9:1). Finalmente, se tomaron fotografías en un microscopio de fluorescencia.

4.2.4 Cultivo primario de células de Sertoli

Se utilizaron machos de edades comprendidas entre 16 y 18 días, en los que la proporción de células de Sertoli en los túbulos seminíferos permite un mayor rendimiento de

células de Sertoli en los cultivos. Los animales se sacrificaron por dislocación cervical y se retiraron los testículos. Se lavaron dos veces en PBS 1X estéril. Se retiró la túnica albugínea y los testículos se lavaron nuevamente en PBS 1X estéril. Posteriormente, se disgregaron en varios trozos y se añadieron a un tubo tipo “falcon” conteniendo 50 ml de medio DMEM:F12 suplementado con suero fetal bovino (SFB) hasta una concentración final del 2%, 1 ml de colagenasa-dispasa (10 mg/ml) y 1 ml de DNasa I (5 mg/ml). Los fragmentos testiculares se incubaron a 32 °C durante 30 minutos con agitación suave (90 r.p.m.), pipeteando los túbulos varias veces cada 10 minutos, y se dejaron sedimentar durante 5 minutos a 32°. Se eliminó el sobrenadante (que contiene células intertubulares) y los túbulos se resuspendieron en 50 ml de medio de cultivo sin suero. Este paso de lavado se repitió dos veces más. Tras el lavado, se repitió el ciclo anterior. Después de la última sedimentación, los túbulos se resuspendieron en 20 ml de medio sin suero, para evitar agregación, y se pasaron 14 veces a través de una aguja de 18,5 G para disgregarlos. Después, la suspensión celular se filtró por una malla de 70 μ m de poro (“Cell Strainer”). Se completó el volumen hasta 50 ml y se suplementó con SFB hasta una concentración final del 2 %, 1 ml de hialuronidasa (20 mg/ml) y 1 ml de DNasa I (5 mg/ml). Se incubaron durante 30 minutos a 37 °C con agitación (125 r.p.m.), pipeteando cada 10 minutos. La suspensión de células se centrifugó 10 minutos a 1200 r.p.m, en una centrífuga Beckmann TJ-6. Se retiró el sobrenadante, las células se resuspendieron en 25 ml de medio con 10 % de suero y se dejaron sedimentar durante 20 minutos a 32°C. Se retiró el sobrenadante, enriquecido en células germinales. Por el contrario, las células de Sertoli tienden a agregarse y sedimentar, por lo que la población celular que queda tras retirar el sedimento está enriquecida en células de Sertoli. Se contaron las células y se plaquearon 40×10^3 células por pocillo de 1,9 cm² en 0.5 ml de medio completo. Al día siguiente se cambió el medio completo.

Para eliminar células germinales contaminantes se aplicó un choque hipotónico. Para ello, los cultivos se trataron con TRIS-HCl 20 mM pH 7.4, a temperatura ambiente, durante 3 minutos y se cambió a medio completo.

4.2.5 Transfección de células de Sertoli

Para transfectar células de Sertoli se utilizaron dos sistemas diferentes: uno basado en partículas lipídicas (“Fugene 6” ,Roche Biochemicals) y otro basado en moléculas anfifílicas (“SAINT”, Symbolux therapeutics), siguiendo las especificaciones de los fabricantes. Se transfectaron los vectores pGtoR y pRed.

La relación μl de Fugene 6/ μg de DNA que se utilizó fue 3:1 o 6:1. Se administraron 0.4 μg de DNA por pocillo de 1.9 cm^2 . Se reunieron las células de 3 pocillos para alcanzar un número suficiente que nos permitiera llevar a cabo el análisis tras la transfección por citometría de flujo (citómetro de flujo “FACS Vantage”, Becton-Dickinson). El análisis se realizó 3, 5 y 7 días después de la transfección, repitiendo cada experimento tres veces. Los resultados de citometría se analizaron estadísticamente mediante una prueba t de Student con el programa informático Med-Calc.

Además, se tomaron fotografías de las células directamente en las placas con un microscopio invertido de fluorescencia (“Nikon ECLIPSE TE300 inverted microscope”; Nikon, Tokio, Japón).

4.2.6 Microinyección en *rete testis* y transfección *in vivo* de las células del epitelio seminífero mediante electroporación de onda cuadrada

Se anestesiaron ratones macho, de edad comprendida entre 30 y 45 días posparto, mediante inyección intraperitoneal de una solución de Ketolar (84mg/Kg)/Rompún (315 μ l/Kg). Se evisceraron transitoriamente los testículos y se expusieron en una lupa para su manipulación (Leica MZFLIII). La microinyección se llevó a cabo introduciendo una micropipeta de cristal (borosilicato), de 40-70 μ m de diámetro, directamente en la *rete testis* (Fig. 9 A y E), tal y como se describe en Ogawa y col. (1997) (Fig. 9 D). Se introdujeron lentamente (25 μ l/ min), a través de la *rete testis*, 40 μ l de solución de microinyección (40 μ g de DNA), que contenía un colorante como marcador del progreso de la microinyección. Como colorantes se probaron: azul tripán (0,04%, Fig. 9 F), “fast green” (0,1%, Fig. 9 G) y nigrosina (1 mg/ml, Fig. 9 A-C). La solución se introdujo hasta que la mayor parte de los túbulos seminíferos superficiales aparecieron rellenos.

Retirada la micropipeta, la transfección fue inducida por electroporación. La electroporación se realizó con un electroporador de onda cuadrada ECM 830 (BTX). Antes de electroporar, se humedeció brevemente el testículo y los electrodos en PBS 1X, para que la transmisión de la corriente fuera homogénea. Posteriormente, se sujetó el testículo con unos electrodos a modo de pinzas (modelo 520, 7mm de diámetro, BTX, San Diego) y se aplicaron 8 pulsos eléctricos. Se dieron 4 pulsos en un sentido y 4 en el sentido opuesto; ya que si sólo se hiciera en un sentido, el DNA, cargado negativamente, se dirigiría hacia un único polo del testículo. Se aplicó un voltaje en cada pulso de 30 a 50 V, dependiendo del tamaño del testículo. La duración de cada pulso fue de 50 ms, con un intervalo entre pulso y pulso de 950 ms. Después de la electroporación, el testículo se humedeció nuevamente en PBS 1X y se reubicó en el escroto. Se suturó la herida y se mantuvo al ratón hasta su análisis, estabulado en

condiciones controladas de temperatura, humedad y ciclo lumínico, así como comida y bebida *ad libitum*.

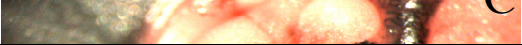
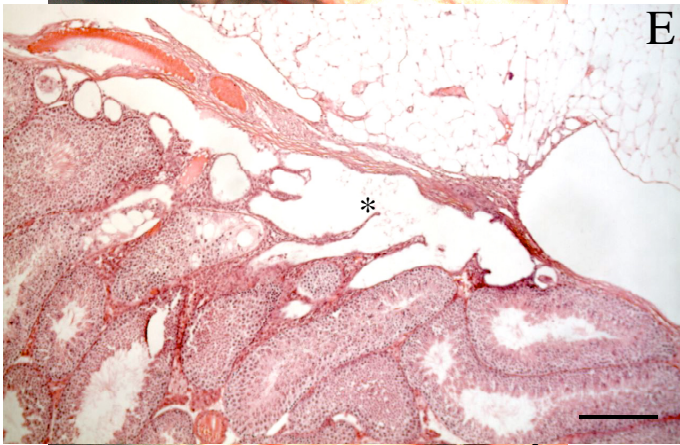
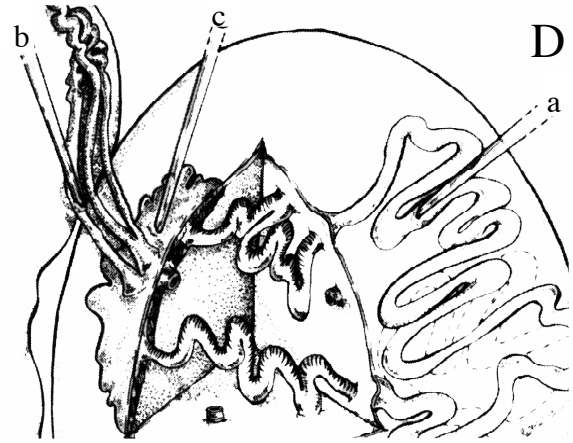
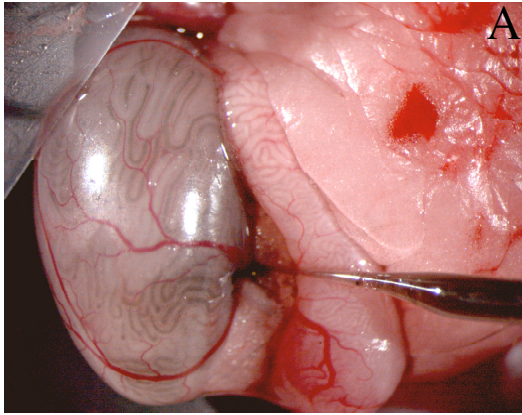
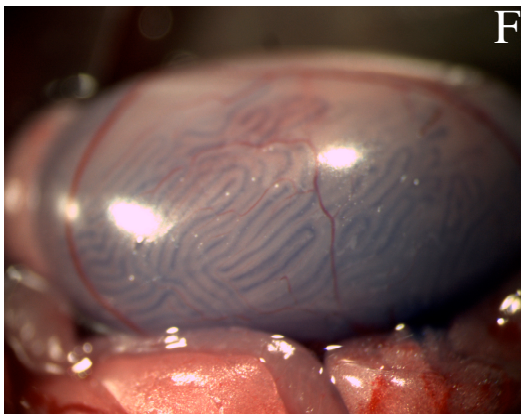


Figura 9: Microinyección en túbulos seminíferos

(A, B y C) Progreso de la microinyección con nigrosina. (D) Esquema que muestra los diferentes sistemas de microinyección en túbulo seminífero (Ogawa., 1997): directamente en el lumen del túbulo (a), a través del conducto eferente (b), en *rete testis* (c). (E) Corte transversal de un testículo a nivel de *rete testis* teñido con hematoxilina-eosina (microfotografía cedida amablemente por Unai Silván, barra = 200 μ m). (F) Testículo microinyectado con azul tripán y (G) “fast green”. *Rete testis* (*). Conducto eferente (flecha en C).



4.2.7 Técnicas Histológicas

4.2.7.1 Preparaciones de túbulos seminíferos “*in toto*”

Fragmentos de túbulos obtenidos de testículos microinyectados o sin microinyectar, de ratones C57BL6/J, se colocaron sobre portas en una gota de PBS con un cubre encima, tal como se describe en Parvinen y Hecht, (1981).

4.2.7.2 Criosecciones histológicas

Los testículos transfectados, de ratones C57BL6/J o FM131, se fijaron en PFA al 4% toda la noche a 4° C. Posteriormente, se embebieron en concentraciones crecientes de sacarosa-PBS (10%, 20%, 30%), se incluyeron en “Tissue-TeK” (O.C.T. Compound) y se congelaron en nieve carbónica. Se realizaron cortes en el criostato a – 20 °C, con grosores comprendidos entre 5 y 10 μ m, se secaron al aire y se montaron con una solución de glicerol:PBS (9:1). Los cortes se tiñeron previamente con una solución al 2,5% de DAPI. Se fotografiaron en un microscopio de fluorescencia.

4.2.8 Análisis por citometría de flujo

4.2.8.1 Monodispersión de células de testículo

La dispersión de células testiculares se realizó de modo similar al proceso de separación de células descrito anteriormente para células de Sertoli, escalando las soluciones para un único testículo. Después de retirar la túnica albugínea, los testículos fueron fragmentados y lavados en PBS 1X. Los fragmentos se incubaron en un erlenmeyer que contenía 12.5 ml de DMEM:F12 (1:1) suplementado con colagenasa-dispasa (0.5 mg/ml) y DNasa I (0.1 mg/ml) durante 30 minutos a 32° C, en agitación (90 rpm). Cada 10 minutos se pipeteó para separar bien los túbulos y se dejaron sedimentar durante 5 minutos en un baño a 32° C. El sobrenadante fue retirado, eliminando de esta manera las células intertubulares. Este

lavado se repitió dos veces. Los túbulos digeridos se pasaron 16-20 veces por una jeringa de 10 ml con una aguja de 18,5 G para disgregar las células y, posteriormente, se pasaron por un filtro de 70 μ m de poro. Se añadió al medio hialuronidasa (0.4 mg/ml) y DNasa I (0.1 mg/ml) y se incubaron 30 minutos a 32° C. Se centrifugaron las células, se lavaron y se resuspendieron en PBS 1X. Las monodispersiones de células se analizaron por citometría de flujo.

3.2.8.2 Análisis de la intensidad de fluorescencia verde (EGFP) y roja (HCRED1) de las células transfectadas mediante citometría de flujo

Las células procedentes de los experimentos de transfección con pGtoR o con pRed se analizaron en un citómetro de flujo FACS Vantage (Becton-Dickinson). Para detectar las células transfectadas se midió la fluorescencia roja emitida por el marcador HCRED1. El análisis se realizó a partir de la población de células vivas, seleccionadas por su tamaño y complejidad (“forward scatter and side scatter”). Considerando la disponibilidad técnica de filtros de excitación y emisión del citómetro de flujo, para detectar la fluorescencia roja se utilizó una longitud de onda de excitación de 630 nm y la emisión se recogió a 660 nm. Por tanto, la proteína HCRED1 no fue excitada con la longitud de onda correspondiente al máximo de su espectro (588 nm, Fig. 10). Aunque de este modo se infravalorase el número de células transfectadas, evitamos que se excitaran moléculas de EGFP (excitables a 585 pero no a 630 nm).

Los resultados del análisis por citometría de flujo se representan en gráficos de número de células frente a intensidad de fluorescencia (Fig. 11). El número de células positivas para fluorescencia roja (transfectadas) se puede observar en el gráfico 1 de la figura 11. El segmento R3 define el rango de intensidad de fluorescencia emitida por las células transfectadas, mientras que el segmento R2 precisa el rango de intensidad de fluorescencia

emitida por las células no transfectadas (fondo). El límite entre la región R2 y R3 se establece a partir del análisis de la intensidad de fluorescencia emitida por células no transfectadas procedentes de ratones C57BL6/J (blanco de fluorescencia).

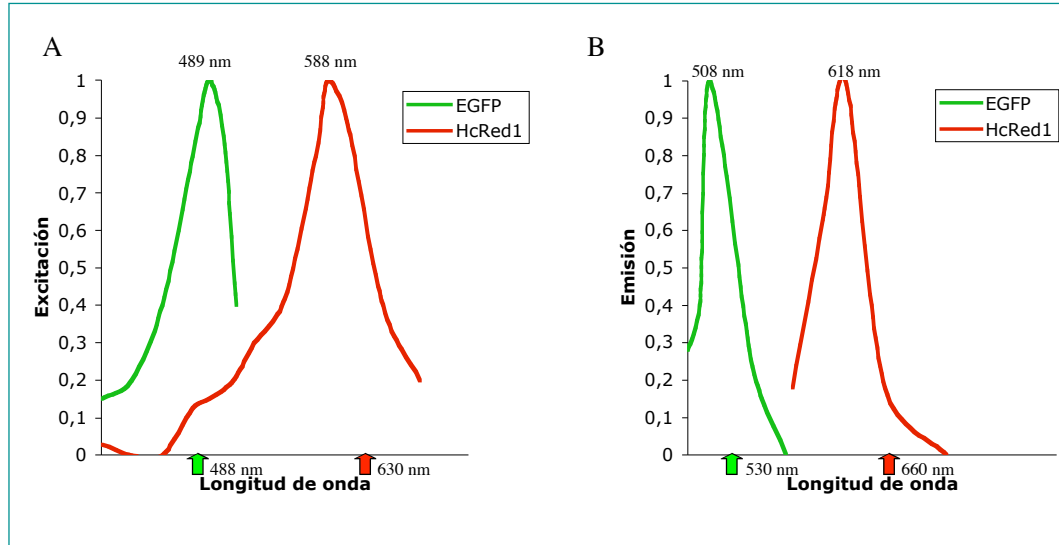


Figura 10: Espectros de excitación (A) y de emisión (B) de las proteínas EGFP y HCRED1.

Las longitudes de onda utilizadas para excitar y para registrar la emisión de estas proteínas se muestran con una flecha.

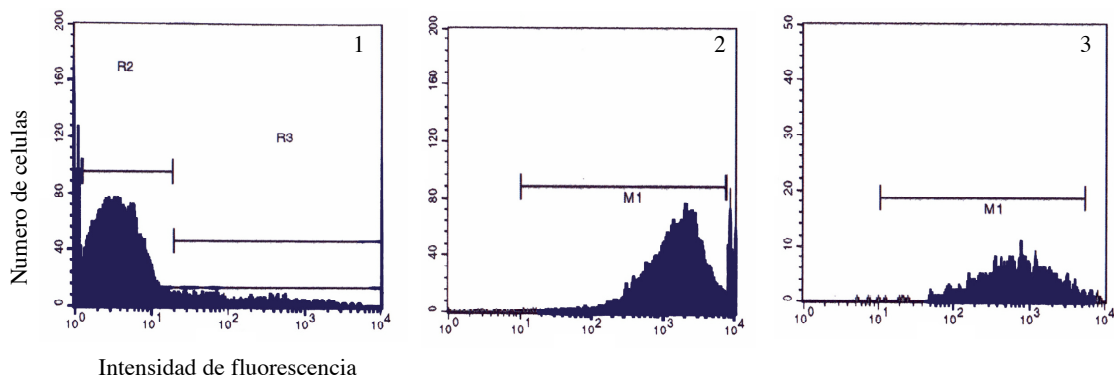


Figura 11: Número de células frente a intensidad de fluorescencia. La emisión de fluorescencia roja se recogió a 660 nm (1). La emisión de fluorescencia verde se recogió a 530 nm (2) y (3).

La Ifv de las células transfectadas (R3) y no transfectadas (R2) se puede observar en los gráficos 2 y 3 de la figura 11, respectivamente. Se registró la Ifv emitida por célula de la población de células no transfectadas (gráfico 2, figura 11) y de la población de células transfectadas (gráfico 3, figura 11), y se calculó la media para cada población. Los cultivos *in vitro* se analizaron 3, 5 y 7 días después de ser transfectados, mientras que las monodispersiones de células de testículo se analizaron 4 días después de ser transfectadas. Se realizaron tres réplicas de los experimentos *in vitro*, en cada tiempo, y dos de las transfecciones *in vivo*. Se calculó la media y la desviación típica. Con los valores de las medias y sus desviaciones típicas se realizó un análisis estadístico mediante la t de Student para valorar la significación de las diferencias entre los valores de las poblaciones transfectadas con pRed y con pGtoR.

4.2.9 Análisis de expresión en testículo de los genes que codifican proteínas implicadas en RNAi

4.2.9.1 Separación de subpoblaciones de tipos celulares del epitelio seminífero

Para el aislamiento de subpoblaciones de células testiculares se empleó el sistema denominado “STA-PUT” (Miller y Phillips, 1969). Este sistema está basado en la sedimentación por gravedad, a través de un gradiente continuo de BSA (del 2 al 4 %), de una suspensión monodispersa de células de testículo (Lam y col., 1970). Para la preparación de las células se siguió el método enzimático descrito por Meistrich con algunas modificaciones (Heyting y col., 1985; Gil-Alberdi, 1989). En cada separación se utilizaron las células de 10 testículos adultos en un volumen de gradiente de 1200 ml. Tras la separación, se recogieron fracciones de 30 ml que se analizaron en el microscopio de contraste de fases. El enriquecimiento de las subpoblaciones en tipos celulares específicos se evaluó citológicamente, seleccionando sólo aquellas fracciones del gradiente que presentaban entre

un 90 y un 95 % de pureza en espermátocitos paquiténicos, en espermátidas redondas ó en espermátidas alargadas, respectivamente.

4.2.9.2 Extracción de RNA

Para la obtención de RNA total de tejidos se diseccionaron ratones CD1 adultos a los que se les extrajeron los siguientes tejidos: pulmón, corazón, hígado, bazo, músculo, cerebro, riñón y testículo. Para el análisis de expresión génica durante el desarrollo testicular se utilizaron testículos de ratones de 6, 10, 14, 18 y 22 días de desarrollo posnatal. La extracción de RNA total se llevó a cabo con el reactivo TRIZOL (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración del RNA obtenido se midió por espectrofotometría y su integridad se comprobó mediante electroforesis en agarosa/formaldehído tiñendo con bromuro de etidio. También se obtuvo RNA total de células de Sertoli, procedentes de cultivos primarios, de espermátocitos o de espermátidas, siguiendo el mismo procedimiento.

4.2.9.3 “Northern-blot”

El RNA total se separó electroforéticamente según Cheng y Skoulchi, (1989). Una vez migrado, el RNA se transfirió a filtros de nylon (“Zeta probe”, BIO-RAD) mediante vacío (“vacuum blotter”, Appligene). La presión aplicada fue de 60 mbar durante 3 h. El RNA fue fijado covalentemente al filtro por irradiación UV (240 mJ/cm²), mediante “UV crosslinker” (Amersham). Los filtros fueron hibridados con sondas de cDNA capaces de reconocer los transcritos correspondientes a los genes: *Drosha*, *Dicer*, *Ago1*, *Ago2*, *Ago3* y *Ago4*. La síntesis de las sondas se llevó a cabo por RT-PCR. Partiendo de RNA total de testículo adulto (ratones CD-1) y utilizando oligo dT (17nt), como cebador, se obtuvo la primera cadena de cDNA por retrotranscripción. Posteriormente, los cDNAs se amplificaron por PCR utilizando las parejas de cebadores descritas en la Tabla I; diseñados específicamente para cada gen en estudio (Fig. 12). Los productos resultantes de la amplificación fueron sometidos a

electroforesis en geles de agarosa (1%) para comprobar su tamaño (Fig. 20) y también fueron secuenciados. Las sondas se marcaron radiactivamente por incorporación de [α - ^{32}P]-dCTP, siguiendo el protocolo del kit “Ready to go” (Amersham Biosciences). Tras el marcaje, se eliminó el [α - ^{32}P]-dCTP no incorporado purificando las sondas mediante columnas de “Sephadex G-50” (Roche). Las membranas se prehibridaron a 65°C en tampón CHURCH durante 1 hora. Se añadió el DNA marcado y se dejó hibridando toda la noche a 65°C en agitación. Los lavados pos-hibridación se hicieron siguiendo protocolos convencionales (Ausubel y col., 1995). Para tener un control de carga, los filtros fueron hibridados simultáneamente con una sonda de DNA que reconoce los transcritos del gen constitutivo *rpS16* (que codifica la proteína rpS16 de la subunidad pequeña del ribosoma). Las señales radiactivas se recogieron inicialmente en placas fosforescentes (“Bas casete 2340”, Fujifilm). También se realizaron exposiciones con películas de autorradiografía (“MXB Film”, Kodak). Los periodos de exposición fueron variables, según la intensidad de la señal.

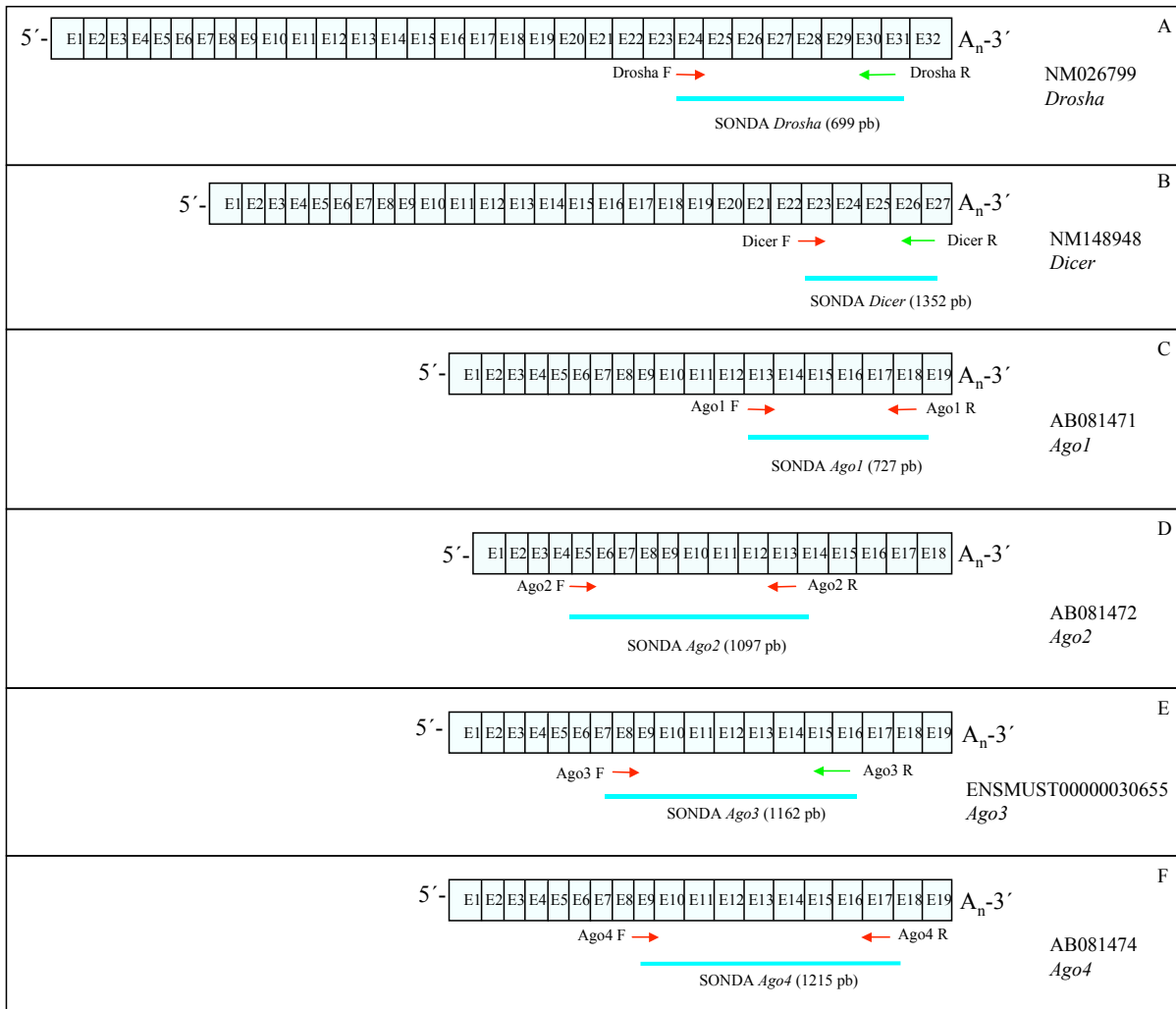


Figura 12: Dibujo esquemático de la localización de los productos de RT-PCR con respecto a los transcritos de referencia *Drosha* (A), *Dicer* (B), *Ago1* (C), *Ago2* (D), *Ago3* (E) y *Ago4* (F). El esquema muestra la organización exónica de los transcritos, así como el tamaño de la sonda generada. Los cebadores diseñados en bordes exón-exón se muestran en color verde.

4.2.9.4 Cuantificación de la expresión génica por RT-PCR en Tiempo Real.

Con el objeto de avanzar en el estudio de los mecanismos de silenciamiento por RNAi en testículo, se procedió al análisis de la expresión génica por RT-PCR en Tiempo Real de los genes *Drosha*, *Dicer*, *Ago1*, *Ago2*, *Ago3* y *Ago4*.

Para eliminar la posibilidad de contaminación con DNA genómico, el RNA total de células y tejidos se trató con DNasa RQ1 (Promega, Ref.: M198A) a 37° C durante 30 minutos.

La retrotranscripción se realizó con la transcriptasa reversa “Superscript II Rnase H⁻” (Invitrogen, Ref.: 18064-014). Como cebador se utilizó un oligo dT (17 nt) a 500 ng/μl. Las condiciones de la reacción fueron las sugeridas por el fabricante.

RT-PCR en Tiempo Real

Se diseñaron oligonucleótidos específicos (ver Tabla I) con el programa “Primer express” (Applied Biosystem) de manera que cumplieran las siguientes características:

- Riqueza en GC: 20-80 %.
- Temperatura de fusión de los oligonucleótidos (T_M): Entre 58° y 62° C, con la óptima en 60° C.
- No contener más de tres bases iguales consecutivas, especialmente si son Gs.
- La longitud de los oligonucleótidos debe estar comprendida entre 18 y 40 nt, la óptima 20 nt.
- Inestabilidad del extremo 3': Entre los últimos 5 nt debe haber más A y T que G y C.
- El tamaño de la secuencia amplificada (amplicón) debe estar comprendido entre 50 y 150 pb.

Los oligonucleótidos seleccionados se analizaron con el programa “Oligo” para comprobar que no eran susceptibles de formar dímeros, ni de adoptar estructuras secundarias inadecuadas para el experimento.

Se realizó la RT-PCR en Tiempo Real utilizando el sistema de detección: ABI PRISM 7700 (Applied Biosystem).

Los reactivos utilizados fueron: SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystem).

El perfil de PCR fue:

- Desnaturalización inicial: 10 min a 95 °C.
- 40 ciclos formados por las siguientes etapas:
 - Desnaturalización: 15 s a 95 °C
 - Extensión: 1 min a 60 °C.
- Elongación final: 1 min a 60 °C.

Además, se midieron en todas las muestras los niveles de expresión del gen *rpS16* como control endógeno (Wagner y Perry, 1985). Como tejido calibrador se utilizó testículo adulto, que sirvió de referencia para medir la expresión en los demás tejidos.

Test de validación

En primer lugar se realizó una recta de calibrado con cDNA de testículo mediante diluciones seriadas y por triplicado: 1/10, 1/100, 1/1000 y 1/10000. Se analizó la eficiencia de amplificación del gen control (*rpS16*) y del gen problema. La condición para poder analizar los datos por el método de las Cts comparativas (Livak y Schmittgen, 2001) es que las eficiencias de ambos genes deben ser iguales.

Los valores de expresión se obtuvieron a partir de la fórmula $2^{-\Delta\Delta C_t}$ de manera que:

- $\Delta C_T = C_T P - C_T S$
- $\Delta\Delta C_T = \Delta C_T \text{ tejido problema} - \Delta C_T \text{ testículo}$

siendo P = media aritmética de las réplicas del gen problema; S = media aritmética de las réplicas de S16.

Análisis estadístico

Debido a que los valores derivados del estimador $2^{-\Delta\Delta C_t}$ son no lineales, su distribución era asimétrica, y ésto complicaba su análisis estadístico. Una de las posibles soluciones consistía en transformar los datos de manera que siguieran una distribución simétrica. Para ello, los

datos se transforman a los de una distribución “log normal” (Abraira y Pérez de Vargas, 1996) de manera que: si disponemos de dos tejidos, X y Z, para cada uno se analizó la expresión de un gen control (a) y un gen problema (b), obteniendo por triplicado para cada tejido 3 muestras $(a_1^x + a_2^x + a_3^x)$ y $(b_1^x + b_2^x + b_3^x)$, cuya media y desviación típica serán:

$$\bar{a} = \frac{1}{3}(a_1^x + a_2^x + a_3^x);$$

$$s_{ax} = \sqrt{\frac{1}{3}((a_1^x - \bar{a}_x)^2 + (a_2^x - \bar{a}_x)^2 + (a_3^x - \bar{a}_x)^2)}$$

Siendo $\bar{x} = \bar{a}_x \square \bar{b}_x$ e $\bar{y} = \bar{a}_z \square \bar{b}_z$, el estimador que interesa es $\square = 2^{\square(\bar{x} \square \bar{z})}$.

Si suponemos que las muestras de los genes son independientes y que tienen una distribución normal, para seguir una distribución log normal el estimador se transformaría de la siguiente manera:

$$\text{Ln} \square = N(\square(\bar{x} \square \bar{z}) \text{Ln} 2, (\text{Ln} 2)^2 s_{x+z}^2); \text{ siendo } s_{x+z} = \sqrt{\frac{1}{3}(s_{a_x}^2 + s_{b_x}^2 + s_{a_z}^2 + s_{b_z}^2)}$$

Para comparar estadísticamente dos estimadores se comparan los valores $\square(\bar{x} \square \bar{z}) \text{Ln} 2$ y $\square(\bar{x} \square \bar{y}) \text{Ln} 2$ cuyos errores asociados son $(\text{Ln} 2)s_{x+y}$ y $(\text{Ln} 2)s_{x+z}$.

El análisis estadístico se puede realizar ahora mediante la t de student de manera que los datos con un valor $p < 0,05$ son significativamente diferentes (S) y si $p > 0,05$ se considera que no existen diferencias estadísticamente significativas. El análisis se llevó a cabo con el programa informático Medcalc.

Análisis de correlación

Se realizó un análisis de la relación o asociación, en cuanto a expresión, entre los distintos genes en estudio con el programa “GradPrism”. Para ello, se utilizaron los datos de expresión génica por tejido. Se calculó el coeficiente de correlación de Pearson (r) para cuantificar la dirección y magnitud de la correlación. Se calculó, también, el coeficiente de

determinación (R^2), para medir el grado de dependencia entre dos variables y se realizó el análisis estadístico para un intervalo de confianza del 95 %; de manera que valores de $p < 0,05$ indicarían que la correlación era significativa, mientras que valores de $p > 0,05$ indicarían que no es posible asegurar que exista correlación.

5 RESULTADOS

5.1 Silenciamiento de *Egfp* en cultivos celulares: evaluación del funcionamiento del vector pGtoR

Una de las herramientas importante en este estudio ha sido la utilización del vector pGtoR (ver materiales y métodos). Con el objeto de comprobar su funcionalidad como inductor del silenciamiento génico específico por RNAi, se llevaron a cabo una serie de experimentos *in vitro* sobre líneas celulares. Este vector codifica un shRNA que dirige el silenciamiento del gen *Egfp* por RNAi (Hasuwa y col., 2002). Además, el vector pGtoR expresa una proteína roja fluorescente, HCRED1, que permite identificar las células transfectadas. De esta manera, las células que expresaran constitutivamente la proteína EGFP y que fueran transfectadas con pGtoR, emitirían fluorescencia roja, mientras su fluorescencia verde endógena se reduciría como consecuencia del silenciamiento.

En primer lugar, se comprobó la expresión de la proteína roja fluorescente mediante la transfección de pGtoR en la línea establecida de fibroblastos NIH-3T3, pudiendo identificarse claramente cuales son las células transfectadas (Fig. 13).

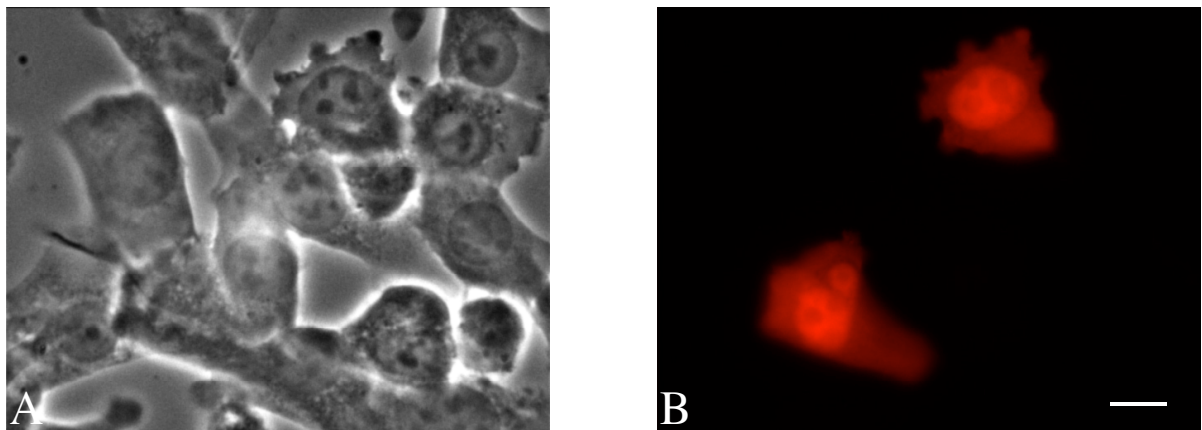


FIGURA 13: Células NIH-3T3 en cultivo después de la transfección con el vector pGtoR. Contraste de fase (A). Células transfectadas emitiendo fluorescencia roja (B). Imágenes obtenidas con en el microscopio de fluorescencia utilizando una longitud de onda de excitación de 535 nm. Barra = 10 μ m.

Para comprobar la capacidad del vector pGtoR de silenciar *Egfp* por RNAi, se transfectaron con dicho vector fibroblastos aislados de epidermis de ratones FM131 y cultivados *in vitro*. Estas células, expresan constitutivamente la proteína EGFP. Los fibroblastos transfectados se identificaron gracias a la fluorescencia roja emitida por la proteína HCRED1, tal como habíamos comprobado en células NIH-3T3. Mediante microscopía de fluorescencia pudimos verificar que los fibroblastos transfectados con pGtoR tenían disminuida la fluorescencia verde, en comparación con la de los fibroblastos no transfectados (Fig. 14). Por lo tanto, la expresión del shRNA_{EGFP} es suficiente para reducir los niveles de EGFP en las células transfectadas.

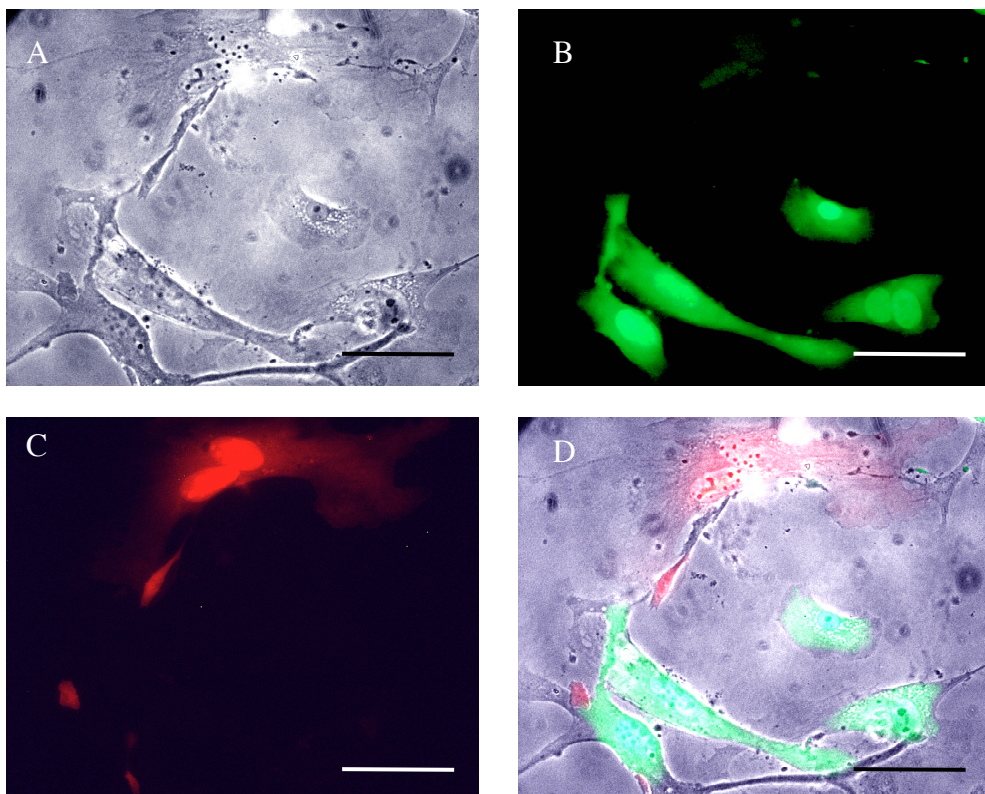


FIGURA 14: Transfección de fibroblastos, procedentes de ratones FM131, con el vector pGtoR. Contraste de fase (A). Fibroblastos que expresan la proteína verde fluorescente (excitación a 488 nm) (B). Fibroblastos que expresan la proteína roja fluorescente HCRED1 (excitación a 535 nm) (C). Fusión de imágenes (D). Barra = 10 μ m.

5.2 Silenciamiento por RNAi *in vivo* en epitelio seminífero de ratón

La microinyección de vectores de shRNA en el túbulo seminífero de ratón se llevó a cabo mediante la introducción, a través de la *rete testis*, de una solución que alcanza el lumen de los túbulos seminíferos. Para seguir el progreso de microinyección la solución debe contener un marcador coloreado. El marcador utilizado habitualmente en microinyección en túbulo seminífero ha sido azul tripán (Brinster y Avarbock., 1994). Sin embargo, se comprobó, mediante preparaciones por aplastamiento, que túbulos que habían sido microinyectados con azul tripán emitían fluorescencia roja al ser excitados con luz ultravioleta (Fig. 15); lo cual interfería con el modelo experimental planteado, basado en el uso del vector pGtoR que expresa la proteína HCRED1 como marcador.

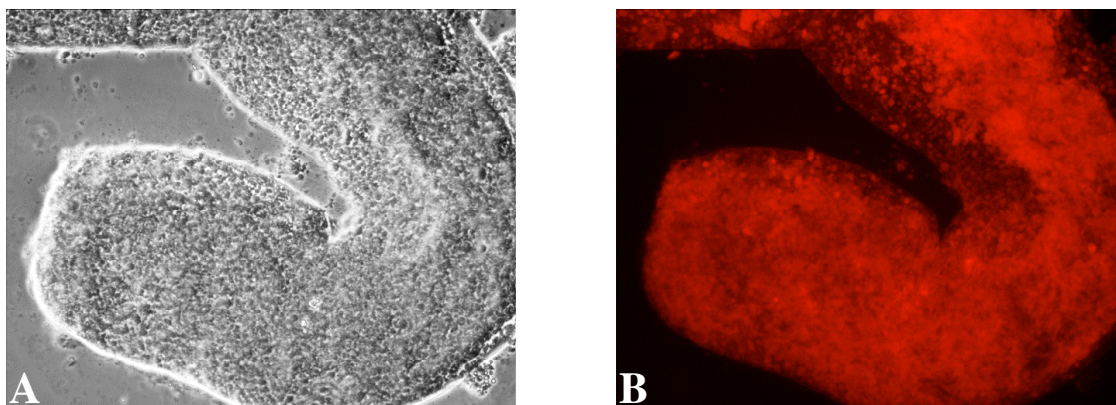


Figura 15: Túbulo seminífero inyectado con una solución de azul tripán 0,04 %. Imagen de contraste de fase (A). Imagen de Fluorescencia (excitación a 535 nm) (B). (1000 aumentos).

Se probaron otros colorantes, como “fast green” (Matsuda y CepKo., 2004), que también emitían fluorescencia roja. Finalmente, se optó por el uso de nigrosina como marcador de seguimiento de la microinyección, ya que no emitía fluorescencia y, por tanto, no

interfería con ninguna de las proteínas fluorescentes expresadas por los vectores utilizados en este trabajo.

Los experimentos de transfección *in vivo* se llevaron a cabo por electroporación, aplicando pulsos eléctricos de onda cuadrada inmediatamente después de la microinyección (ver materiales y métodos). Varios grupos han realizado diferentes experimentos de transfección de las células del epitelio seminífero utilizando diversos abordajes, pero con resultados dispares en cuanto a los tipos celulares que se transfectaban. La información existente acerca de la eficacia de transfección en epitelio seminífero *in vivo* mediante electroporación de onda cuadrada es escasa. Por ésto, llevamos a cabo experimentos para estudiar la accesibilidad del vector a los diferentes tipos celulares y la eficacia de transfección. En primer lugar, para establecer qué tipos celulares eran susceptibles de transfección, así como su eficiencia, se llevaron a cabo transfecciones en el epitelio seminífero de ratones C57BL6/J adultos con el vector pEGFP-N1, que expresa la proteína EGFP. La identificación de los tipos celulares transfectados se realizó mediante el estudio de cortes transversales de testículos transfectados con pEGFP-N1 (Fig. 16).

Los resultados obtenidos en distintos experimentos, con diferentes condiciones de electroporación, mostraban que las células transfectadas mayoritariamente eran células de Sertoli (identificadas por su morfología arborescente); aún así se podían identificar pocas células germinales transfectadas. Además, pudimos observar, *a priori*, que la eficiencia de la transfección era relativamente baja.

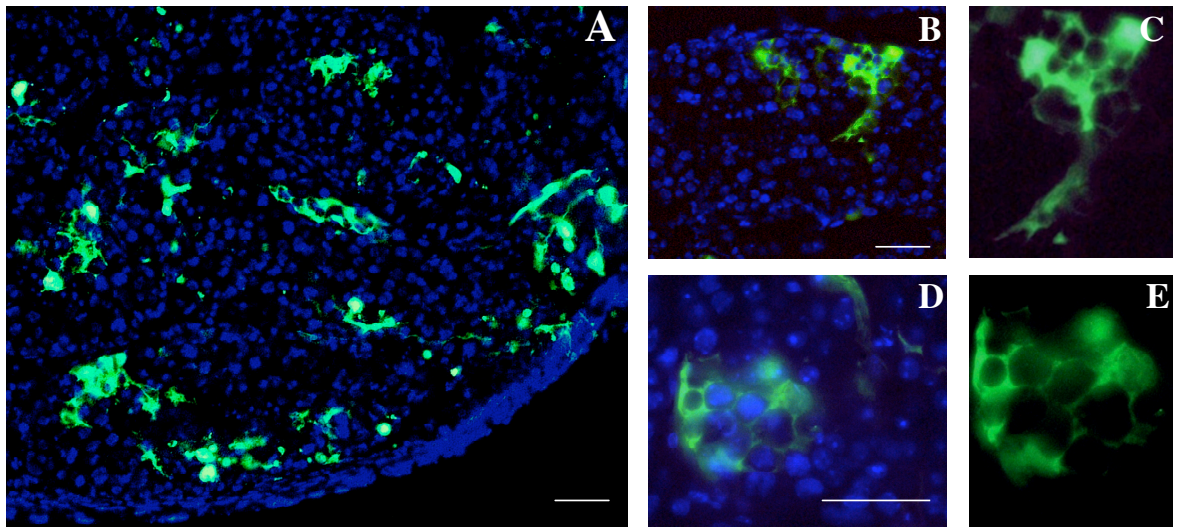


FIGURA 16: Transfección *in vivo* del epitelio seminífero con el vector pEGFP-N1, mediante electroporación de onda cuadrada. Aspecto general de un corte de testículo (A) (fusión EGFP/DAPI). Detalle de dos túbulos (B) y (D). Imagen de fluorescencia de células de Sertoli transfectadas (C) y (E). Las células transfectadas expresan la proteína verde fluorescente EGFP (excitación a 488 nm) mientras que los núcleos están teñidos con DAPI (excitación a 358 nm). Barra = 100 μ m.

La metodología utilizada para estudiar el silenciamiento génico, mediado por shRNA en epitelio seminífero *in vivo*, ha consistido en la transfección de los vectores pGtoR (expresando el shRNA_{EGFP} y la proteína HCRED1) y pRed (expresando solamente HCRED1) a células de los túbulos seminíferos de ratones FM131 adultos (que expresan constitutivamente EGFP).

En los cortes histológicos de testículo de ratones FM131 es difícil precisar y cuantificar variaciones en los niveles de EGFP ocasionados por RNAi; ya que existe heterogeneidad en la expresión del gen *Egfp*, regulado por el promotor CAG, en las células del epitelio seminífero de ratones FM131 (Ventela y col., 2000). Por tanto, el método analítico utilizado ha consistido en medir la intensidad de fluorescencia verde (Ifv) por citometría de flujo en poblaciones celulares transfectadas, reconocibles por la expresión de

HcRed1 (fluorescencia roja), frente a no transfectadas. Estas poblaciones celulares se obtenían por monodispersión de células del epitelio seminífero después de la transfección (ver materiales y métodos).

Se obtuvo la media de los valores de Ifv de la población transfectada y de la población no transfectada, mediante el análisis de estas poblaciones por citometría de flujo. Para normalizar, relacionamos la Ifv media de la población transfectada con la Ifv media de la población no transfectada (Ifv normalizada), dentro de cada experimento (testículo transfectado). La normalización se hizo asignando el valor de 100% a la Ifv media de la población de células no transfectadas y calculando el porcentaje de la Ifv media de la población transfectada. Los valores obtenidos a partir de dos réplicas experimentales, después de 4 días desde la transfección, se muestran en la tabla II.

	IFV normalizada	
	pGtoR	pRed
Transfección 1	108,58	193,7
Transfección 2	133,88	223,88
Media	121,23	208,79
Desviación típica	17,89	21,34

Tabla II: Intensidad de fluorescencia verde normalizada de las poblaciones de células transfectadas *in vivo* con pGtoR o con pRed.

En principio resultaba llamativo que las células transfectadas tuvieran un nivel de Ifv, en porcentaje, mayor que el de las no transfectadas. Esto podría explicarse porque el tipo celular preferentemente transfectado tuviera, per se, una intensidad de fluorescencia mayor que aquel que no fue transfectado. Los resultados estarían evidenciando la selección “por transfección” de aquellas células con mayor Ifv. Por los experimentos anteriores podríamos

apuntar que serían células de Sertoli, ya que hay evidencias de que tienen mayor fluorescencia verde que las células germinales (Ventela y col., 2000). Consecuentemente, el dato significativo es la comparación entre células transfectadas con pGtoR *versus* pRed en los que la única diferencia es que pRed carece de región codificante del shRNA_{EGFP}.

El análisis comparativo de las medias, basado en la distribución t de Student, de la intensidad de fluorescencia verde entre las células transfectadas con pGtoR frente a las transfectadas con pRed, indicaba diferencias significativas ($p < 0.05$).

Así, en la figura 17 se representan los porcentajes de Ifv normalizada, asignando en este caso 100 % al valor proporcionado por las células transfectadas con pRed. Se evidenció una reducción de Ifv del 41,94 % en las células transfectadas con pGtoR, frente a las transfectadas con pRed. Por tanto, la expresión de shRNA_{EGFP}, es decir, una molécula diseñada para inducir silenciamiento postranscripcional del gen que codifica la proteína EGFP, sería la inductora de la reducción significativa de la señal EGFP observada en las células transfectadas con pGtoR. La capacidad para inducir silenciamiento por RNAi mediante transfección *in vivo* en células del epitelio seminífero con vectores que expresan shRNA, es un hecho experimentalmente demostrable.

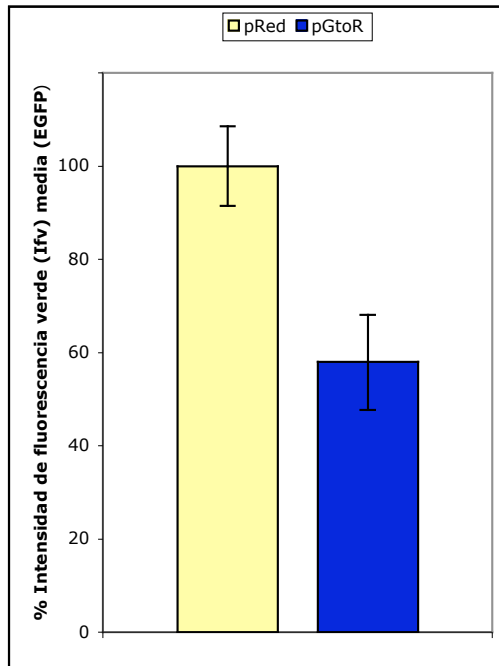


Figura 17: Porcentaje relativo de Intensidad de fluorescencia verde en las poblaciones de células del epitelio seminífero transfectadas *in vivo* con pGtoR o con pRed.

5.3 Silenciamiento por RNAi en cultivo primario de células de Sertoli

De los resultados anteriores parece deducirse que el tipo celular preferentemente transfectable *in vivo*, en el epitelio seminífero, es la célula de Sertoli. Puesto que, de todas las células del epitelio seminífero, las de Sertoli son las únicas cultivables en cultivos primarios, hemos profundizado en el análisis de silenciamiento génico por shRNAs en este tipo celular en experimentos *in vitro*. En primer lugar, evaluamos la eficiencia de la transfección de los vectores capaces de generar interferencia de RNA en estas células. Existe una dificultad intrínseca para la transfección de macromoléculas en muchos tipos de cultivos primarios; por esto, en nuestro caso, evaluamos distintos métodos en células de Sertoli. Con este fin se prepararon cultivos primarios de células de Sertoli procedentes de ratones C57BL6/J y FM131.

Se probaron dos agentes de transfección: uno basado en moléculas lipídicas “Fugene 6” y otro basado en moléculas anfifílicas “Saint”. “Fugene 6” se probó en dos relaciones: (µl de “Fugene 6” : µg de DNA): 6:1 y 3:1. La máxima eficacia de transfección se obtuvo con “Fugene 6” en la relación 6:1 por lo que se eligió esta relación para realizar los experimentos de silenciamiento (Tabla III).

El cultivo primario de células de Sertoli presenta una particularidad respecto a otros cultivos de células somáticas: la necesidad de eliminar las células germinales que permanecen fuertemente adheridas sobre ellas. Para ello, el cultivo se somete a un choque hipotónico, tal como se describe en materiales y métodos. La necesidad de ese tratamiento nos obligó a probar la transfección antes y después por dos razones: a) el choque hipotónico podría afectar a la capacidad de las células de ser transfectadas; b) normalmente, las células pierden capacidad de ser transfectadas a medida que aumenta el tiempo de cultivo. Se pudo observar que la eficacia de transfección aumentaba entre un 700 % con pGtoR y un 440 % con pEGFP-N1 cuando se transfectaba antes del choque hipotónico (Tabla III). Por tanto, el choque

hipotónico afectaba a la eficacia de transfección. De esta manera, el choque hipotónico se aplicó un día después de la transfección, lo que además permitía acceder a las células pocos días después de haber comenzado el cultivo y antes de que se constituyesen uniones intercelulares.

C57BL6/J	AGENTE DE TRANSFECCION			
	FUGENE/DNA (6:1)		FUGENE/DNA (3:1) Transfección después del choque hipotónico	SAINT Transfección después del choque hipotónico
	Transfección después del choque hipotónico	Transfección antes del choque hipotónico		
VECTORES				
pGtoR	2,35	17,79	1,64	0
pRed	—	25,05	—	—
pEGFP-N1	8,7	38,32	2,9	5,7

Tabla III: Eficacia de transfección a células de Sertoli de ratones C57BL6/J: Porcentaje de células transfectadas, medido mediante citometría de flujo, utilizando diferentes agentes de transfección (“Fugene 6” y “Saint”).

Se pudo observar mayor eficacia de transfección al transfectar con pEGFP-N1 (38.32 %, Tabla III).

Aceptada una mayor eficacia de transfección antes del choque hipotónico, en experimentos similares con células de Sertoli procedentes de ratones FM131 se detectó un menor porcentaje de transfección (pGtoR = 7.17 %; pRed = 5.65 %) que en las células de Sertoli procedentes de ratones C57BL6/J (pGtoR = 17.79 %; pRed = 25,05 %). Estas diferencias en la eficacia de las transfecciones pueden ser debidas al vector usado y al fondo genético de las células (FM131 o C57).

Inicialmente, los cultivos primarios de células de Sertoli FM131 transfectadas con pGtoR fueron observados directamente al microscopio de fluorescencia para evaluar la reducción en la intensidad de fluorescencia emitida por EGFP.

Efectivamente, pudimos observar células que producían HCRED1 (fluorescencia roja) y presentaban unos niveles de fluorescencia verde ausentes o muy por debajo de los de células vecinas no transfectadas (Fig. 18)

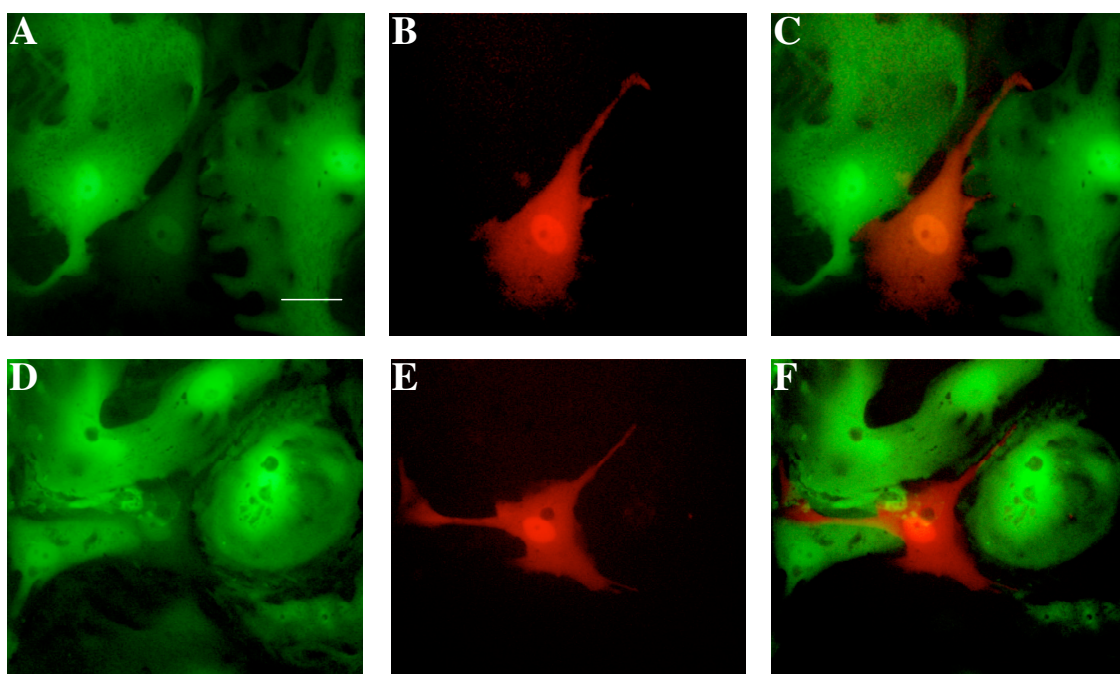


Figura 18: Células de Sertoli, procedentes de ratones FM131, transfectadas con el vector pGtoR. Se observaron las células en cultivo con un microscopio invertido de fluorescencia, 5 días después de la transfección (A, B y C) y 6 días después de la transfección (D, E y F). La detección de fluorescencia verde (EGFP) y roja (HCRED1) se llevó a cabo utilizando una longitud de onda de excitación de 488 nm (A y D) y de 535 nm (B y E), respectivamente. Fusiones (C y F). Barra = 10 μ m.

Para cuantificar el silenciamiento génico de *Egfp* en este modelo experimental, se procedió de manera semejante al estudio *in vivo*. El análisis se llevó a cabo 3, 5 y 7 días después de la transfección de los vectores pGtoR y pRed. Los experimentos se realizaron por triplicado. Las poblaciones de células transfectadas con pGtoR o pRed eran detectadas por la emisión de fluorescencia roja. Se obtuvo la media de Ifv de la población transfectada y de la población no transfectada tras el análisis de estas poblaciones en el citómetro de flujo. La normalización se hizo de igual manera que en los experimentos *in vivo*, relacionando la Ifv media de la población transfectada con la Ifv media de la población no transfectada (Ifv normalizada), dentro de cada experimento. La normalización se hizo asignando el valor arbitrario de 100% a la Ifv media de la población de células no transfectadas y calculando el porcentaje de la Ifv media de la población transfectada (Tabla IV).

	3 días		5 días		7 días	
	pGtoR	pRed	pGtoR	pRed	pGtoR	pRed
Transfección 1	51,9	83,83	70,8	105,7	46,9	85,77
Transfección 2	62,25	86,5	52,25	87,94	42,56	81,18
Transfección 3	70,37	93,81	52,83	83,96	66,74	100,35
Media	62,84	88,05	58,71	92,53	52,07	89,1
Desviación típica	9,69	5,17	10,47	11,58	12,89	10,01

Tabla IV: Porcentaje relativo de Ifv de las poblaciones de células transfectadas *in vitro*, con pGtoR o con pRed 3, 5 y 7 días después de la transfección.

En la figura 19 se representan los porcentajes de intensidad de fluorescencia verde normalizada de las poblaciones transfectadas con pGtoR y las transfectadas con pRed. Al asignar el valor 100% a la Ifv media normalizada de pRed se comprobó que la Ifv media en las células transfectadas con pGtoR se había reducido ya a los 3 días de transfección un 28,63 %; 5 días después se redujo un 36,55 % y 7 días después un 41,77 %. La máxima reducción de Ifv se alcanzaba a los 7 días.

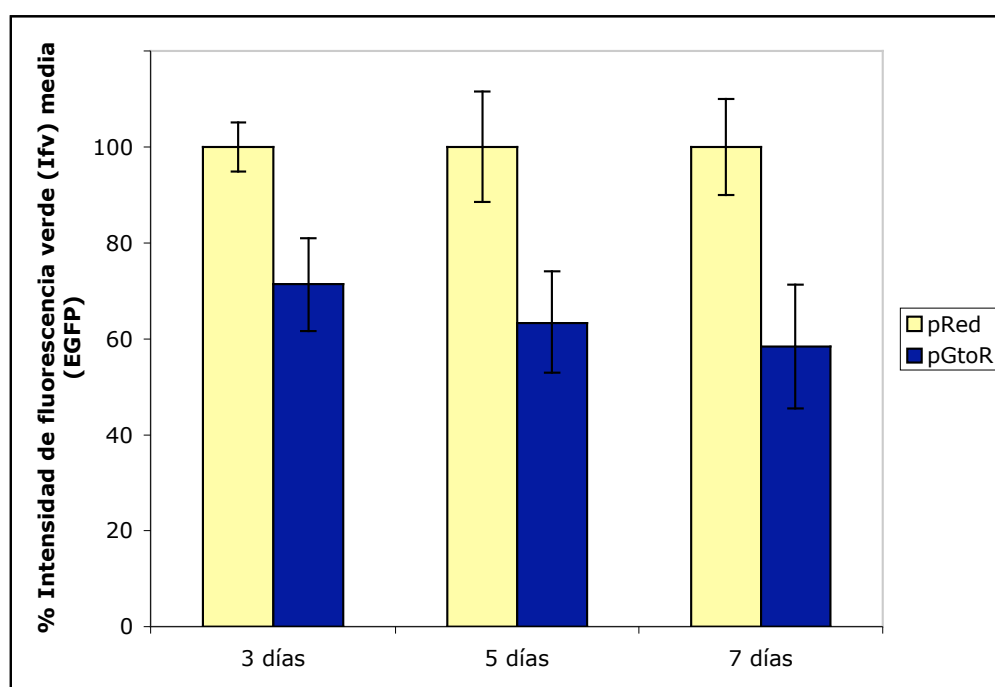


Figura 19: Porcentaje de Ifv media (488 nm) de las poblaciones celulares transfectadas con pRed o pGtoR, analizadas a los 3, 5 y 7 días después de la transfección.

Mediante análisis estadístico (t de Student) siempre se obtuvo un valor de $p < 0.05$, lo que indicaba que, a los 3, 5 y 7 días después de la transfección la Ifv media de las células transfectadas con pGtoR es significativamente inferior a la de las células transfectadas con pRed. Por tanto, al igual que en los experimentos *in vivo*, podemos inferir que es debido a la presencia del shRNA diseñado para silenciar la expresión del gen *Egfp*, de expresión constitutiva en los ratones FM131.

5.4 Expresión en testículo de ratón de genes implicados en RNAi

En el epitelio seminífero de ratón hemos comprobado que, al menos en células de Sertoli, era posible inducir silenciamiento génico, por medio de moléculas de shRNA, tanto *in vivo* como *in vitro*. Esto indicaba que la maquinaria molecular implicada en RNAi estaba y era funcional en estas células. Con el objetivo de caracterizar la presencia y regulación de algunos de los componentes clave en este proceso, recientemente descritos en la literatura, nos propusimos analizar comparativamente la expresión de los genes que codifican estas proteínas, tanto en células del epitelio seminífero como en tejidos somáticos.

Los genes que se estudiaron fueron: *Drosha*, *Dicer*, *Ago1*, *Ago2*, *Ago3* y *Ago4*. Inicialmente, analizamos la expresión mediante “Northern-blot”, utilizando RNA total obtenido de testículos en distintas etapas de desarrollo posnatal y de varios tejidos somáticos. En la hibridación se utilizaron sondas de DNA específicas, obtenidas por RT-PCR, para reconocer los mensajeros de cada unidad de transcripción objeto de estudio.

Las sondas generadas reconocerían la región 3' de los transcritos *Drosha*, *Dicer* y *Ago1-4*. Como se observa en la figura 20, el tamaño de los productos de RT-PCR obtenidos para cada gen se correspondía con el tamaño esperado (Fig.12).

Los amplicones se secuenciaron y su secuencia se comparó con la de los cDNAs utilizados como referencia (Tabla I). En todos los casos la secuencia amplificada se correspondía con la de los cDNAs, salvo *Ago3*, que se analizará en detalle más adelante.

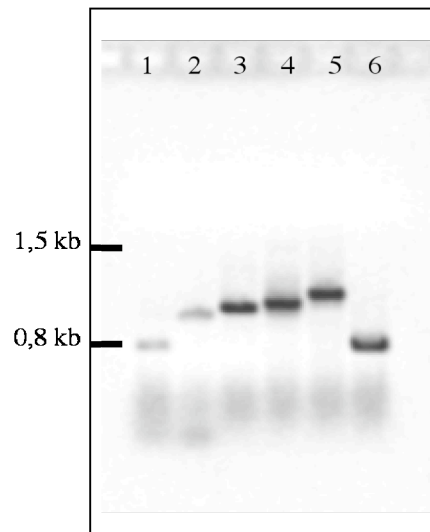


Figura 20: Electroforesis en gel de agarosa (1%), teñido con BrEt, de los cDNAs sintetizados por RT-PCR. Identificación de sus tamaños: *Ago1*, 727pb (1); *Ago2*, 1097 pb (2); *Ago3*, 1162 pb (3); *Ago4*, 1215 pb (4); *Dicer*, 1352 pb (5) y *Drosha*, 699 pb (6).

Tras las hibridaciones, únicamente pudimos detectar señal en las membranas hibridadas con la sonda *Drosha*, tras 4 días de exposición. En el resto de hibridaciones no detectamos señal en ningún carril, lo cual indicaba que el nivel de expresión de *Dicer*, *Ago* 1-4 era muy bajo. En la figura 21 podemos observar los resultados de “Northern-blot” obtenidos para *Drosha*. Detectábamos un único transcrito de aproximadamente 5 kb, presente en todos los estadios de desarrollo de testículo. Este transcrito también fue detectado en músculo y cerebro. Se densitometró la señal del transcrito de *Drosha* durante el desarrollo de testículo y se calculó el nivel de expresión con respecto a la señal del transcrito del gen constitutivo *rpS16* (Fig. 22). Observamos variaciones en los niveles de expresión de este transcrito durante el desarrollo de testículo. Destacaban los incrementos de señal que aparecían a los 10 y 18 dpp. El patrón de expresión no se correlacionaba directamente con patrones definidos de diferenciación celular en el testículo en desarrollo.

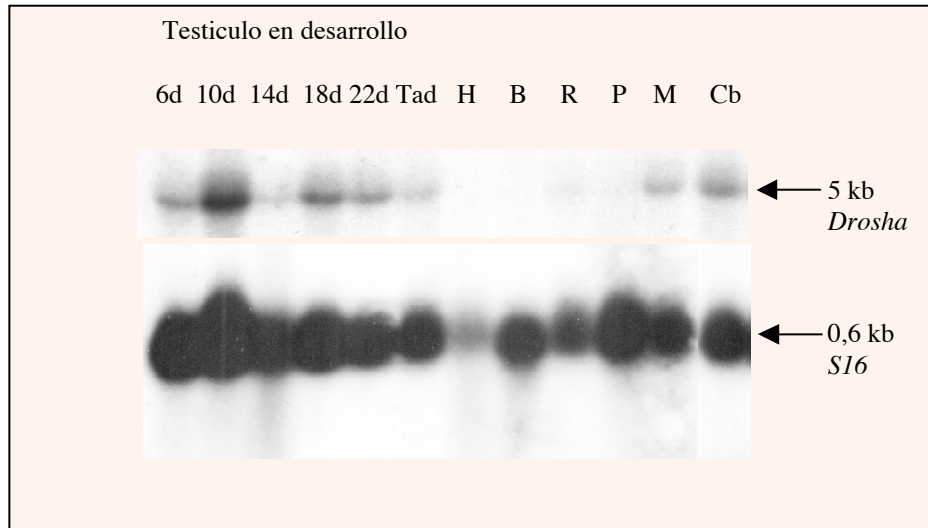


Figura 21: “Northern-blot” de RNA total de distintos días del desarrollo posnatal de testículo y de diferentes tejidos somáticos: hígado (H), bazo (B), riñón (R), pulmón (P), músculo (M) y cerebro (Cb). Se hibridó con una sonda específica para el gen *Droscha*. Como control de carga, el panel inferior muestra la señal de *rpS16*.

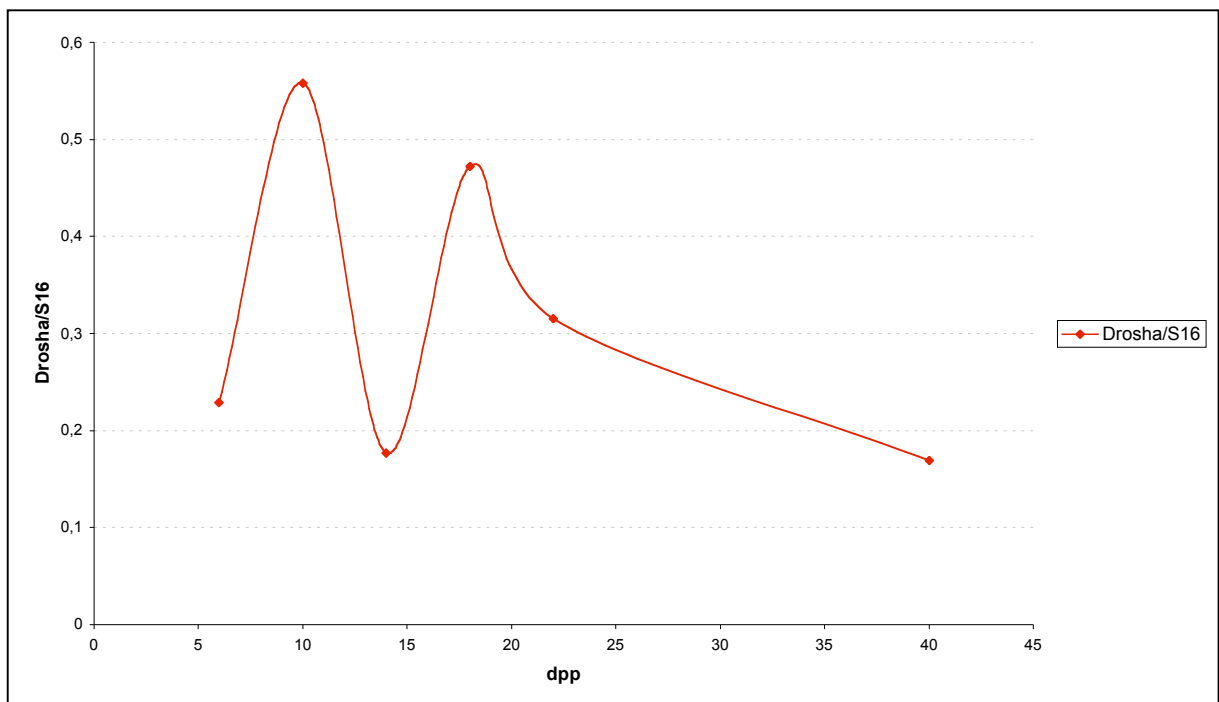


Figura 22: Representación gráfica de los resultados densitométricos obtenidos a partir del “Northern-blot”. Se muestran los niveles de expresión del transcrito de 5 kb del gen *Droscha*, con respecto al nivel del transcrito *rpS16*, durante el desarrollo testicular.

Puesto que mediante “Northern-blot”, utilizando RNA total, no detectábamos la expresión de la mayor parte de los genes en estudio, decidimos abordar otra metodología: RT-PCR en Tiempo Real. Se analizaron nuevamente, muestras de testículo en desarrollo, diferentes tipos de tejido somático y, además, diferentes tipos celulares purificados del epitelio seminífero de ratón (ver materiales y métodos): espermátocitos paquiténicos, espermátidas redondas y alargadas, y células de Sertoli. También se evaluaron los niveles de expresión en una línea celular establecida, fibroblastos NIH-3T3.

Expresión de *Drosha*

Los niveles de expresión de *Drosha* en testículo, medidos por RT-PCR en Tiempo Real, diferían de los encontrados en la mayor parte de tejidos analizados. Cabe destacar que la expresión en cerebro era el doble que en testículo (Fig. 24).

Analizando la expresión de *Drosha*, en relación a la primera oleada de diferenciación de células germinales durante el desarrollo puberal del testículo (Fig. 23), pudimos observar un aumento de la expresión que alcanzaba el máximo a 18 dpp. El análisis en subpoblaciones celulares del epitelio enriquecidas en tipos celulares definidos, mostraban una mayor expresión en células germinales que en somáticas (Sertoli) (Fig. 24 C). Este patrón era coherente con un nivel de expresión relativamente alto en testículo adulto (Fig. 24 B), donde la mayor proporción de células corresponde a células germinales. Los resultados de expresión durante el desarrollo obtenidos por RT-PCR en Tiempo Real contrastaban con los obtenidos por “Northern-blot”. Las diferencias podían atribuirse a la presencia de transcritos adicionales de *Drosha* que no eran detectados mediante “Northern-blot” de RNA total; esos transcritos, sin embargo, sí contribuían a los valores de expresión medidos por RT-PCR en Tiempo Real.

En este sentido, Fortin y col. (2002) ya habían descrito la presencia de dos transcritos, en estudios previos de “Northern blot” utilizando RNA poly A(+) procedente de testículo adulto.

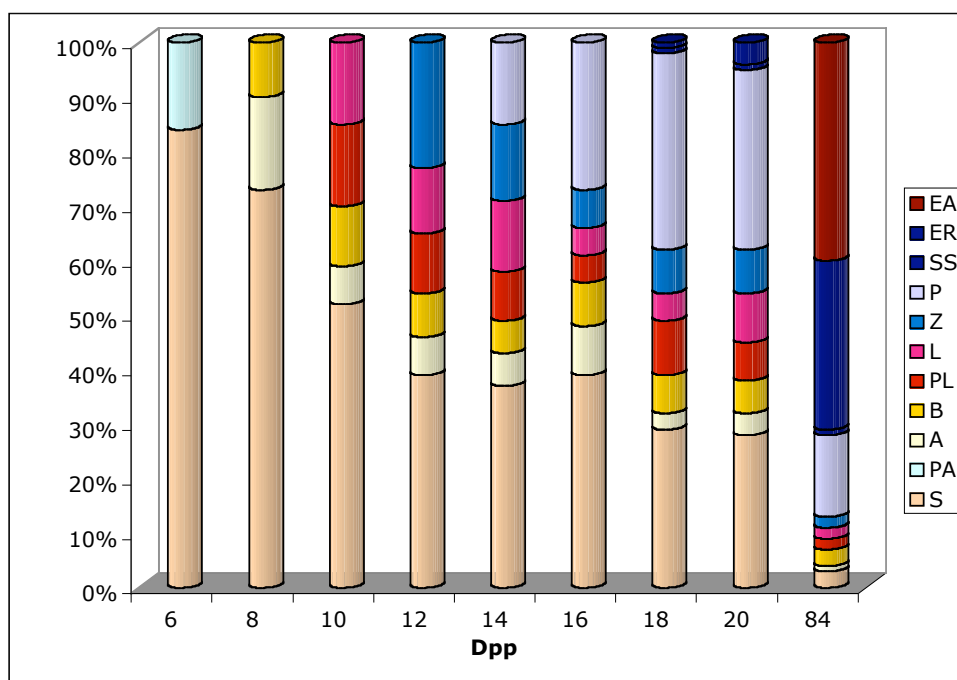


Figura 23: Secuencia de aparición de tipos celulares en el epitelio seminífero durante el desarrollo posnatal del testículo (Bellve y col., 1977). Sertoli (S), Espermátidas alargadas (EA), Espermátidas redondas (ER), Espermátocitos secundarios (SS), Paquitenas (P), Zigotenas (Z), Leptotenas (L), Preleptotenas (PL), Espermatogonias tipo A (A), Espermatogonias tipo B (B) y Espermatogonias tipo A primitivas (PA).

Expresión de *Dicer*

Los niveles de expresión de *Dicer* más elevados se detectaban en cerebro y testículo. Durante el desarrollo de testículo aumentaba significativamente su expresión, alcanzando un máximo a 18 dpp. A partir de 18 dpp los niveles descendían hasta llegar a adulto. Estos datos, inicialmente, concordarían con que Sertoli era el tipo celular en el que se encontraba mayor expresión de *Dicer* (Fig. 25), siendo éste un tipo celular escasamente representado en testículo adulto en relación con otros tipos de células (Bellvé y col., 1977, Fig. 23).

Las diferencias observadas al analizar comparativamente los patrones de expresión de *Drosha* y *Dicer*, en las muestras estudiadas, sugerían que además de actuar ambos en las rutas moleculares de generación de miRNAs, podrían estar interviniendo en otras vías de silenciamiento génico por RNAi o, incluso, en otros procesos celulares.

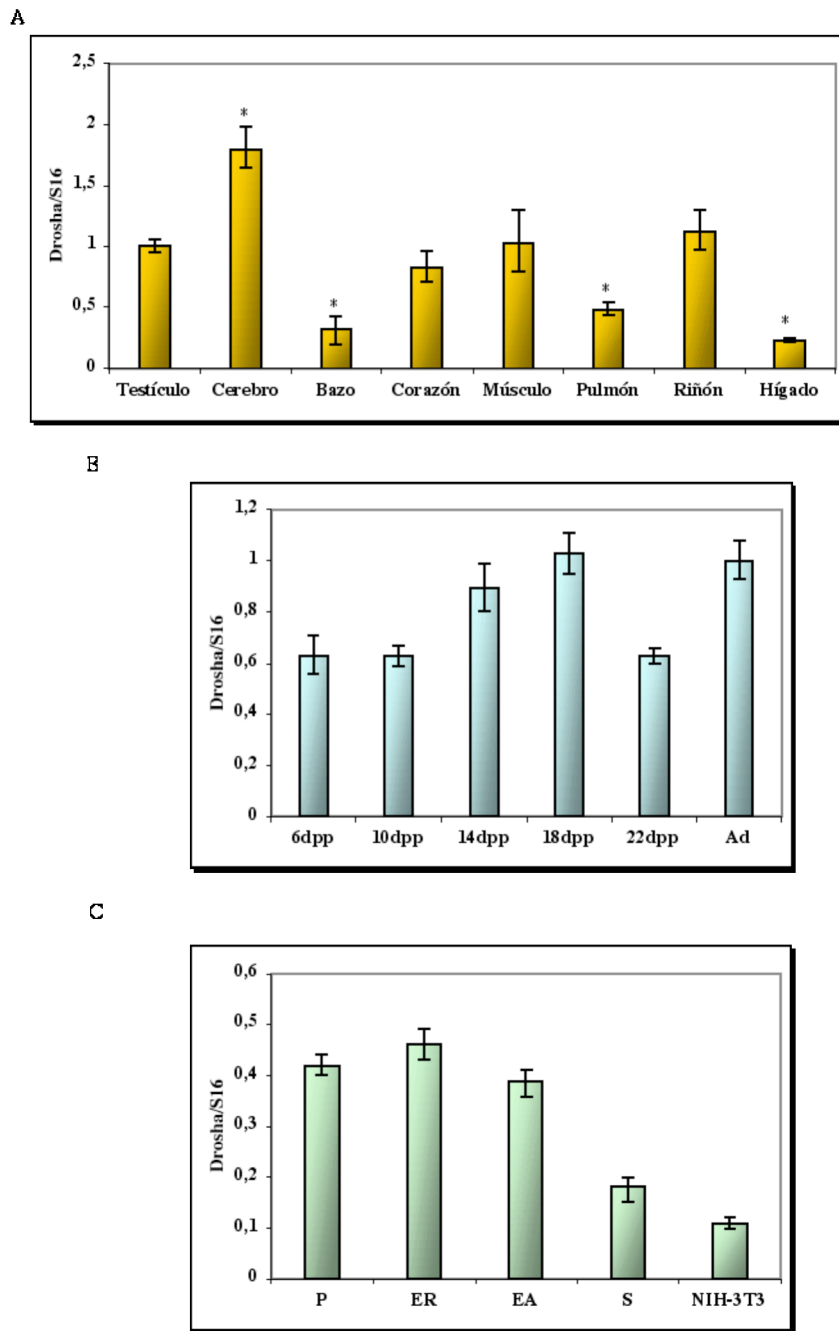
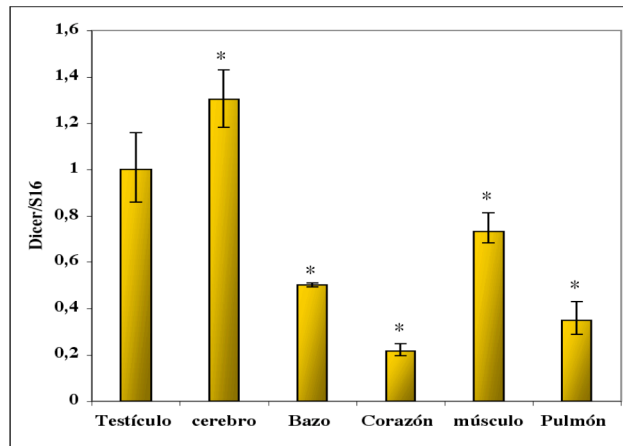
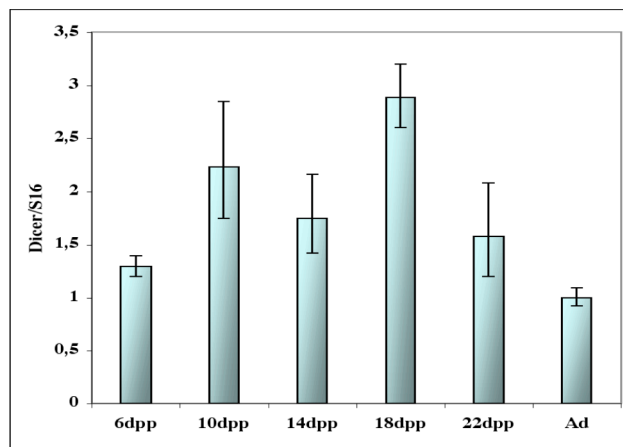


Figura 24: Expresión de *Droscha*. Se representan los niveles de expresión medidos en diferentes tejidos somáticos (A), durante el desarrollo del testículo (B), y en diferentes tipos celulares que forman parte del epitelio seminífero (C). Los valores de expresión están referidos a testículo adulto (tejido calibrador). Tejidos cuya expresión difiere significativamente de la expresión en testículo (*). (P = paquitenas; ER = espermátidas redondas; EA = espermátidas alargadas; S = Sertoli).

A



B



C

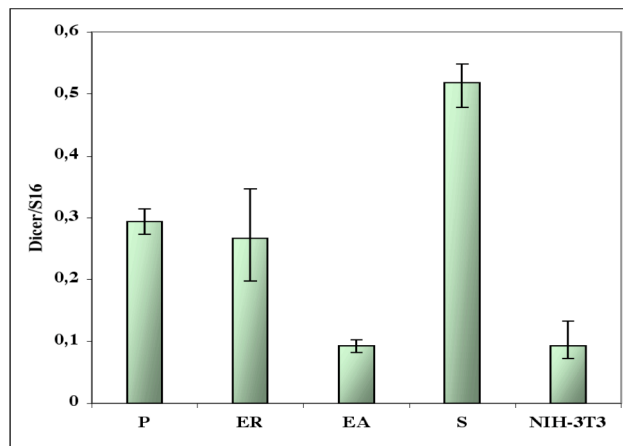


Figura 25: Expresión de *Dicer*. Se representan los niveles de expresión medidos en diferentes tejidos somáticos (A), durante el desarrollo del testículo (B), y en diferentes tipos celulares que forman parte del epitelio seminífero (C). Los valores de expresión están referidos a testículo adulto (tejido calibrador). Tejidos cuya expresión difiere significativamente de la expresión en testículo (*). (P = paquetenas; ER = espermátidas redondas; EA = espermátidas alargadas; S = Sertoli).

Expresión de *Ago1*

Ago 1 se expresaba preferentemente en bazo, en comparación con el resto de tejidos, donde la expresión es muy baja (Fig. 26 A). Durante el desarrollo de testículo se mantenía, relativamente, un elevado nivel de expresión entre los días 10 y 18 dpp, disminuyendo hacia los 22 dpp y adulto (Fig. 26 B).

Analizados los tipos celulares del epitelio seminífero, los niveles de expresión eran poco conspicuos, en consonancia con los bajos niveles detectados en testículo (Fig. 26 C).

Expresión de *Ago2*

Ago2 presentaba un elevado nivel de expresión en cerebro, donde detectábamos alrededor de 4 veces más señal que en el resto de tejidos (Fig. 27 A). Durante el desarrollo del testículo se observaba un aumento progresivo de la expresión, alcanzando el máximo a 22 dpp y disminuyendo posteriormente en adulto (Fig. 27 B). Estos resultados coincidían con el hecho de que *Ago2*, en células germinales, disminuía su expresión, progresivamente, con la diferenciación desde paquitenas a espermátidas alargadas (Fig. 27 C). Al igual que *Dicer*, *Ago2* se expresaba preferentemente en células somáticas. En células de Sertoli, su expresión era alrededor de tres veces mayor que en los tipos celulares de la línea germinal, lo cual podría explicar la disminución relativa que presentaba su expresión en testículo adulto, donde el número relativo de células de Sertoli es bajo, en relación con el de células germinales (Fig. 23). En este caso, las células somáticas NIH-3T3 también presentaban mayor señal que las células de la línea germinal (Fig. 27 C).

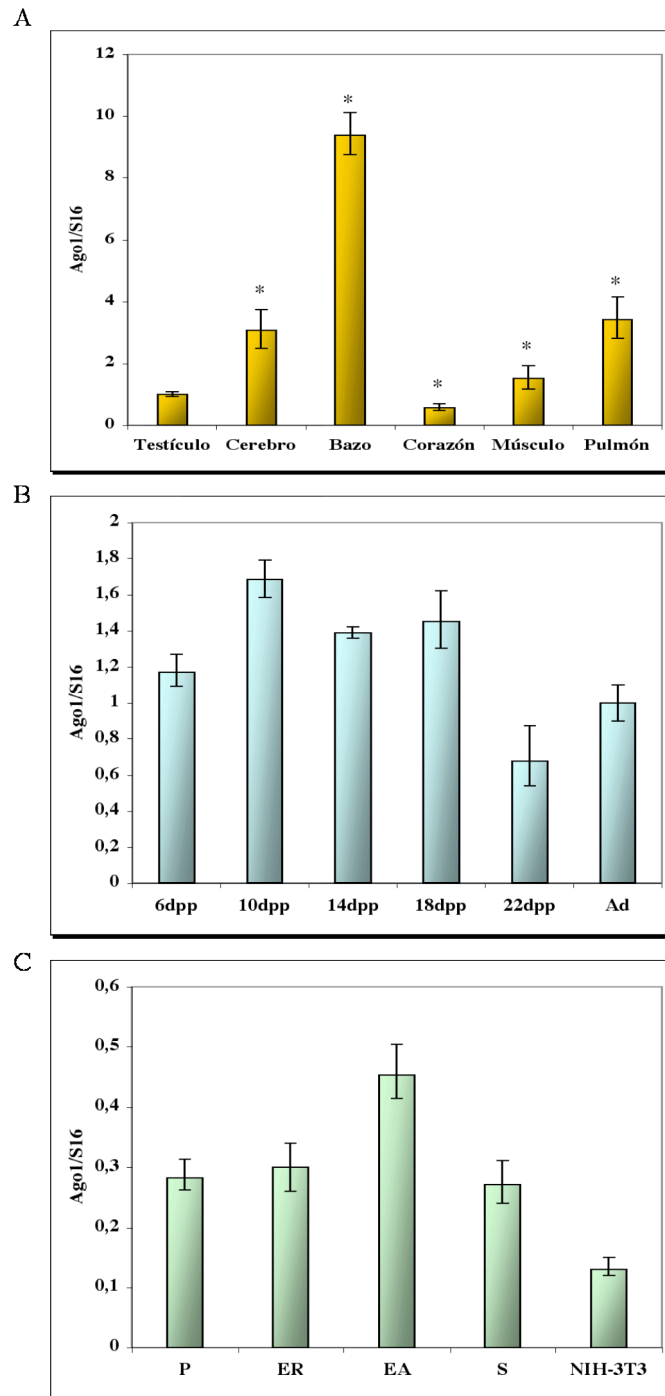


Figura 26: Expresión de *Ago1*. Se representan los niveles de expresión medidos en diferentes tejidos somáticos (A), durante el desarrollo del testículo (B), y en diferentes tipos celulares que forman parte del epitelio seminífero (C). Los valores de expresión están referidos a testículo adulto (tejido calibrador). Tejidos cuya expresión difiere significativamente de la expresión en testículo (*). (P = paquitenas; ER = espermátidas redondas; EA = espermátidas alargadas; S = Sertoli).

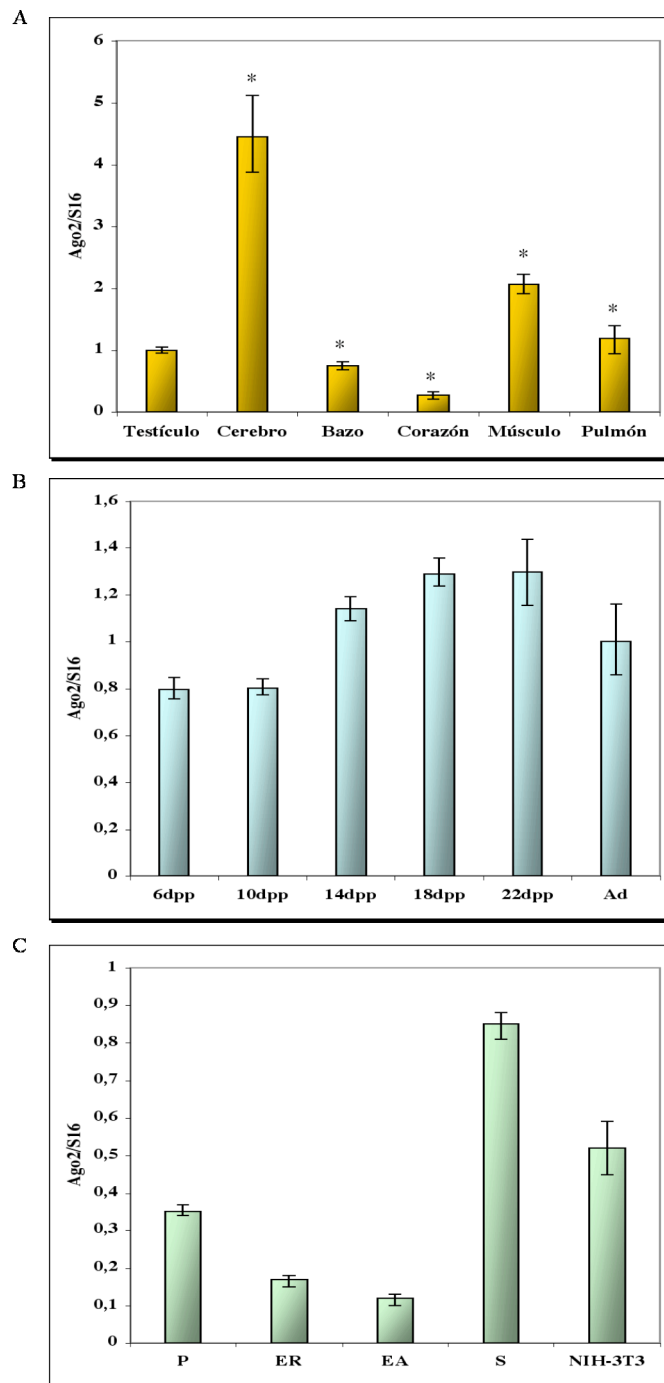


Figura 27: Expresión de *Ago2*. Se representan los niveles de expresión medidos en diferentes tejidos somáticos (A), durante el desarrollo del testículo (B), y en diferentes tipos celulares que forman parte del epitelio seminífero (C). Los valores de expresión están referidos a testículo adulto (tejido calibrador). Tejidos cuya expresión difiere significativamente de la expresión en testículo (*). (P = paquitenas; ER = espermátidas redondas; EA = espermátidas alargadas; S = Sertoli).

Expresión de *Ago3*

El tejido analizado donde se encontraba la máxima expresión de *Ago3* era el cerebro; aunque sus niveles en testículo eran también elevados, en comparación con el resto de tejidos (Fig. 29 A). Durante el desarrollo de testículo se observaba que la distribución de los datos de niveles de expresión se aproximaba a una de tipo Normal, de manera que su expresión aumentaba desde 6 dpp, se mantenía hasta 18 dpp y disminuía progresivamente hasta adulto (Fig. 29 B). El resultado se correspondía con el hecho de que la expresión en las células germinales disminuía asociada a la diferenciación a espermatidas alargadas. En general, la expresión de *Ago3* era mayor en las células de la línea germinal que en las células somáticas (Fig. 29 C).

Hay que destacar que tras la secuenciación de los fragmentos amplificados a partir de RNA total de testículo, por RT-PCR, con el objetivo de generar sondas para el análisis por “Northern-blot”, detectamos un nuevo transcrito de *Ago3*. Este transcrito difería de los descritos en las bases de datos de ratón ENSEMBL y NCBI. En la base de datos de ratón ENSEMBL se han descrito dos transcritos para el gen *Ago3*. El primer transcrito, ENSMUST00000030655, tiene 2780 nt, está constituido por 19 exones y codifica una proteína de 860 aminoácidos. El segundo transcrito, ENSMUST00000069097, tiene 2468 nt, está constituido por 18 exones y codifica una proteína de 756 aminoácidos, más corta que la anterior debido al procesamiento alternativo de un exón. El primer transcrito se utilizó como referencia para diseñar los oligonucleótidos que se emplearon en generar la sonda para “Northern-blot” por RT-PCR. Los oligonucleótidos Ago 3-F y Ago 3-R (Tabla I) debían generar un producto de PCR con un tamaño de 1178 pb (Fig. 12)); sin embargo, el fragmento amplificado a partir del cDNA de testículo era de 1162 pb. Tras la secuenciación, se detectó la ausencia de una región de 16 pb, (nucleótido 1860 al 1875 en la secuencia del transcrito ENSMUST00000030655, Apéndice 1). Esta región se localiza en el inicio del exón 14 del

transcrito ENSMUST00000030655 y del exón 13 del transcrito ENSMUST00000069097. La ausencia de esa región podría explicarse por procesamiento alternativo (Fig. 28a). Tras llevar a cabo un análisis de traducción del mensajero teórico que portara esa delección, observamos que la ausencia de esta secuencia generaría un cambio en el marco abierto de lectura. Este cambio implicaría la introducción de un codón de parada, de tal modo que se produciría una proteína truncada (Tr-AGO3) de 586 aminoácidos (Fig. 28b), que conservaría el 30 % del extremo amino amino terminal del dominio Piwi (Apéndice 2).

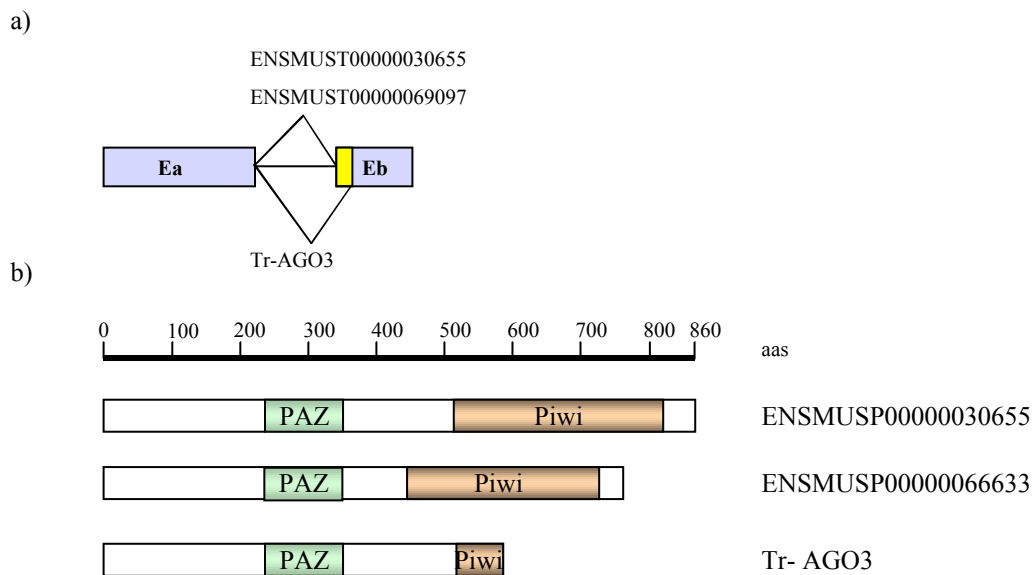


Figura 28: Representación esquemática del posible procesamiento alternativo que daría lugar a los transcritos ENSMUST00000030655, ENSMUST00000069077 y al nuevo transcrito *Tr-Ago3* (a). Esquema de las proteínas codificadas en los tres transcritos (los dos publicados en ENSEMBL y el nuevo) (b). Ea = exón 13 del transcrito ENSMUST00000030655 y exón 12 del transcrito ENSMUST00000069077. Eb = Exón 14 del transcrito ENSMUST00000030655 y exón 13 del transcrito ENSMUST00000069077.

Expresión de *Ago4*

Ago4 destacaba porque su nivel de expresión en testículo era muy elevado en relación con el resto de tejidos. Durante el desarrollo posnatal del testículo se observaba un aumento progresivo y significativo de la expresión de *Ago4*; aunque disminuía en testículo adulto. Este patrón coincidía con la disminución en la cantidad de transcritos detectada durante la diferenciación de las células germinales. El bajo nivel de expresión detectado en 6 dpp y 10 dpp se correspondía con la presencia reducida de *Ago4* en células de Sertoli, y sugería, además, que en espermatogonias prácticamente no se expresaría o la expresión sería muy baja. El incremento de su expresión coincidiría con la entrada en meiosis (alrededor de 10 dpp) y aparición de espermatoцитos primarios, lo cual estaba en consonancia con la elevada presencia de *Ago4* en paquitenas (Fig. 30).

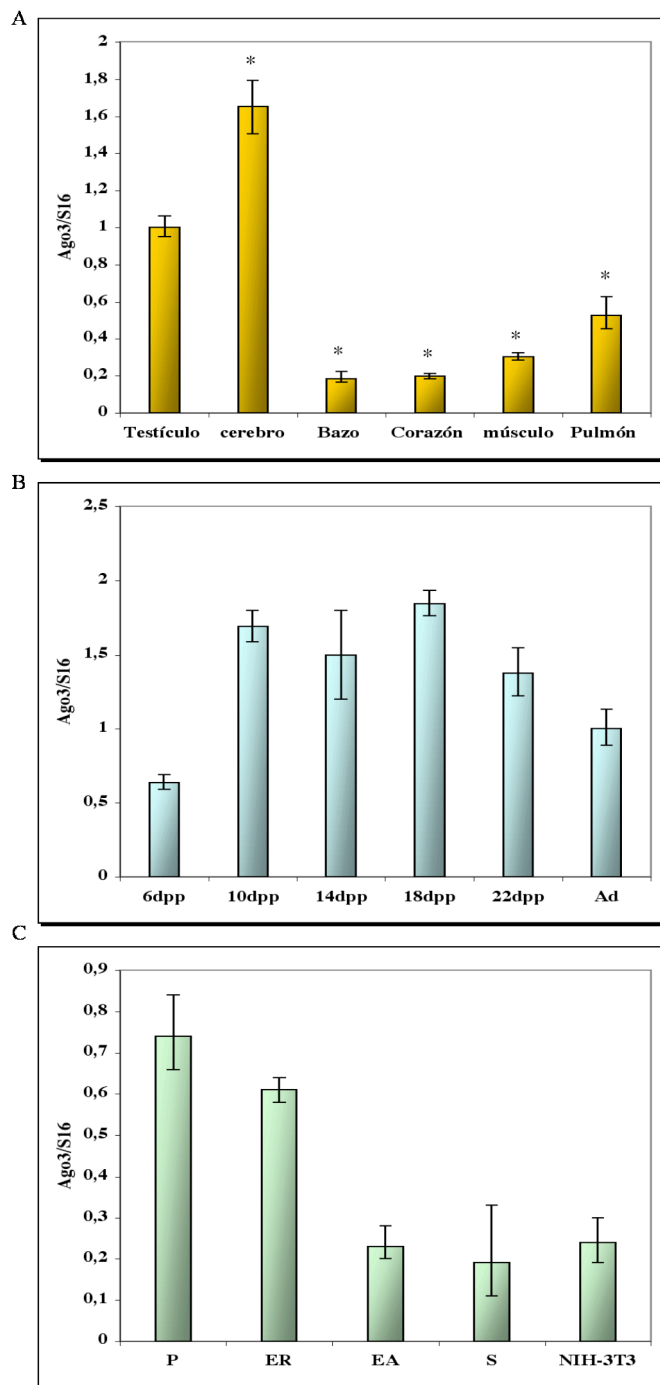


Figura 29: Expresión de *Ago3*. Se representan los niveles de expresión medidos en diferentes tejidos somáticos (A), durante el desarrollo del testículo (B), y en diferentes tipos celulares que forman parte del epitelio seminífero (C). Los valores de expresión están referidos a testículo adulto (tejido calibrador). Tejidos cuya expresión difiere significativamente de la expresión en testículo (*). (P = paquitenas; ER = espermátidas redondas; EA = espermátidas alargadas; S = Sertoli).

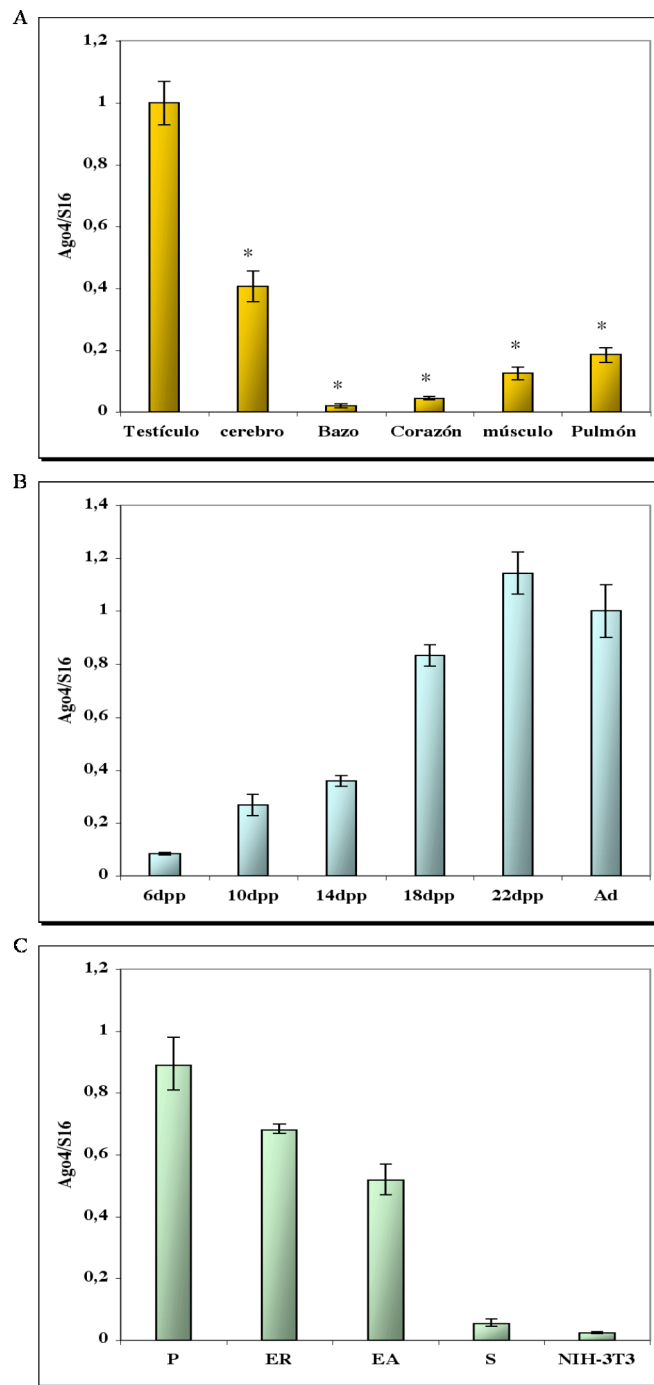


Figura 30: Expresión de *Ago4*. Se representan los niveles de expresión medidos en diferentes tejidos somáticos (A), durante el desarrollo del testículo (B), y en diferentes tipos celulares que forman parte del epitelio seminífero (C). Los valores de expresión están referidos a testículo adulto (tejido calibrador). Tejidos cuya expresión difiere significativamente de la expresión en testículo (*). (P = paquitenas; ER = espermátidas redondas; EA = espermátidas alargadas; S = Sertoli).

5.4.1 Análisis comparativo de la expresión de los genes *Ago 1-4*, *Drosha* y *Dicer*

Para poder comparar la expresión de los genes *Ago 1-4*, *Drosha* y *Dicer* entre sí, fue necesario realizar otro tipo de análisis. En este caso los valores de expresión de cada gen se normalizaron con *rpS16*, pero no se relacionaron con un tejido calibrador, que hasta aquí había sido testículo adulto. El análisis comparativo de la expresión en los diferentes tejidos y tipos celulares se muestra en la figura 31 y figura 32, respectivamente. De esta manera pudo relacionarse la expresión de cada gen con el resto, dentro de una misma escala.

Se pudo observar que los genes que más se expresaban en todos los tejidos eran *Ago2* y *Drosha*. En testículo y cerebro se detectaban valores relativamente altos de *Dicer*, *Ago3* y *Ago4*; mientras que en bazo se detectaba un alto nivel de *Ago1*. El resto de genes se expresaba casi a nivel basal. En general, el tejido que presenta mayor expresión de todos los genes era cerebro, seguido de testículo.

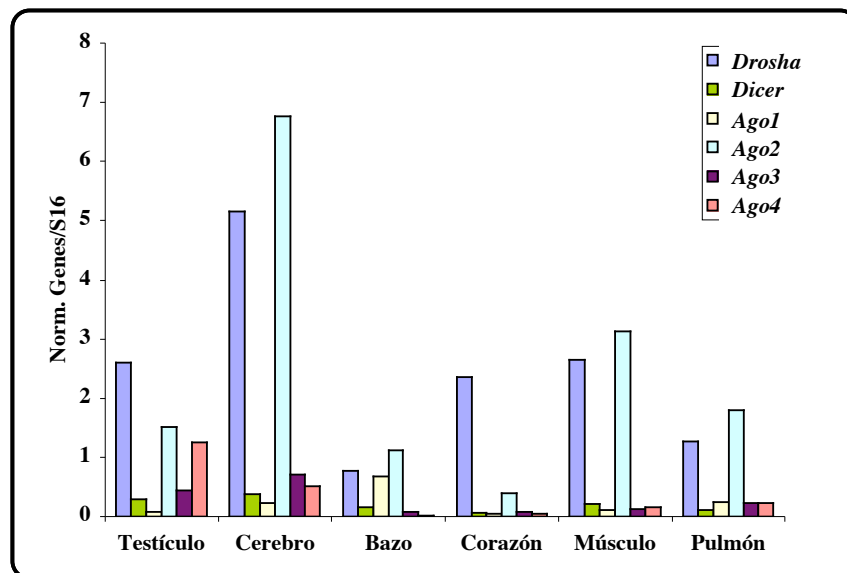


Figura 31: Comparación de los niveles de expresión de *Ago 1-4*, *Drosha* y *Dicer*, normalizados con respecto a *rpS16* en los diferentes tejidos analizados.

Análisis de correlación: Para estudiar las relaciones entre los diferentes genes se realizó un análisis de correlación de los valores de expresión génica en tejidos somáticos.

Variables	Pearson	R ²	p	Significativo
<i>Drosha-Dicer</i>	0,8177	0,69	0,0468	SI
<i>Drosha-Ago1</i>	-0,47		0,34	NO
<i>Drosha-Ago2</i>	0,8508	0,69	0,0410	SI
<i>Drosha-Ago3</i>	0,8298	0,72	0,0317	SI
<i>Drosha-Ago4</i>	0,39		0,44	NO
<i>Dicer-Ago1</i>	-0,12		0,85	NO
<i>Dicer-Ago2</i>	0,8078	0,65	0,0519	NO*
<i>Dicer-Ago3</i>	0,8786	0,77	0,0212	SI
<i>Dicer-Ago4</i>	0,6428		0,16	NO
<i>Ago1-Ago2</i>	-0,06		0,89	NO
<i>Ago1-Ago3</i>	-0,2179		0,21	NO
<i>Ago1-Ago4</i>	0,39		0,44	NO
<i>Ago2-Ago3</i>	0,8074	0,65	0,0520	NO*
<i>Ago2-Ago4</i>	0,1576		0,76	NO
<i>Ago3-Ago4</i>	0,6291		0,18	NO
<i>Ago2-Ago4**</i>	0,9351	0,87	0,0197	SI
<i>Ago3-Ago4**</i>	0,9777	0,96	0,004	SI
<i>Drosha-Ago4**</i>	0,8357	0,70	0,078	NO*
<i>Dicer-Ago4**</i>	0,8417	0,71	0,0738	NO*

Tabla V: Análisis de Correlación de la expresión de los genes *Drosha*, *Dicer* y *Ago 1-4* en tejidos somáticos. Se muestra el coeficiente de correlación de Pearson, el coeficiente de determinación (R²) y la significación estadística del coeficiente de correlación (correlación significativa cuando p<0,05). En color verde se destacan las comparaciones con elevado coeficiente de correlación y de determinación (dependencia entre variables).
* Datos con un valor de p> 0.05, pero con coeficiente de correlación alto (color amarillo). La falta de significación puede deberse a que el tamaño muestral es pequeño. ** Datos de correlación de *Ago4* en el que se han obviado los valores de expresión en testículo.

Se observó una asociación significativa de las expresiones de *Drosha-Dicer/Drosha-Ago2/ Drosha-Ago3/ y Dicer-Ago3* en los tejidos estudiados; sin embargo, *Ago1* no parecía asociarse significativamente con los demás genes. Si en el análisis se eliminaban los valores de expresión en testículo, la dependencia lineal entre *Ago4* y el resto de genes, excepto *Ago1*, era clara; presentando un coeficiente de determinación muy alto con *Ago2* y cercano a 1 con *Ago3* (Tabla V).

En cuanto a los tipos celulares, *Drosha*, *Ago3* y *Ago4* se expresaban preferentemente en células de la línea germinal; mientras que *Ago2* lo hacía en células de Sertoli y NIH-3T3. *Dicer* conservaba niveles similares, tanto en las células de la línea germinal como en células de Sertoli. No se detectaba casi expresión de *Ago1* (Fig. 32).

Cabe destacar que en las células de la línea germinal la expresión de *Ago4* superaba a la de *Ago2*, mientras que en células de Sertoli *Ago2* se expresa más que *Ago4*.

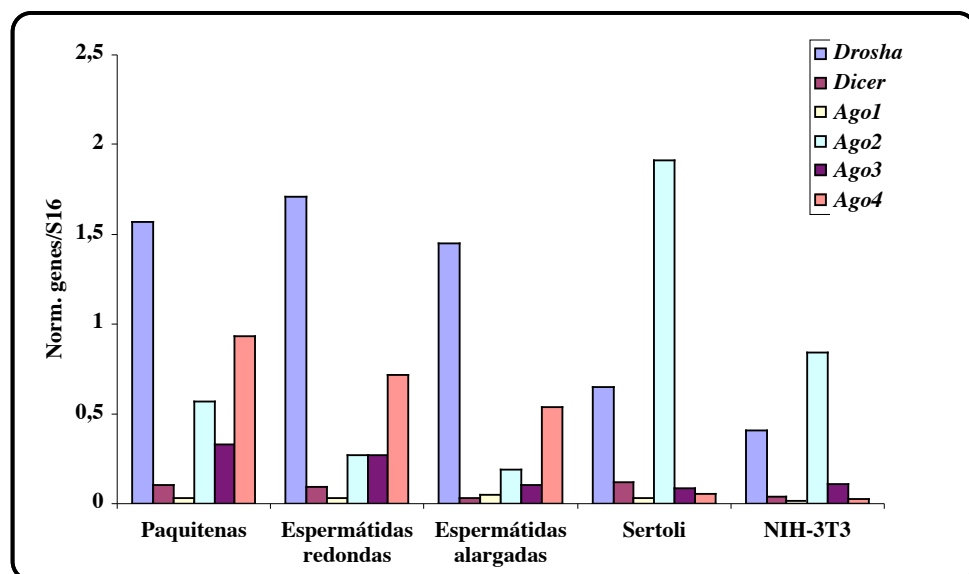


Figura 32: Comparación de los niveles de expresión de *Ago 1-4*, *Drosha* y *Dicer*, normalizados con respecto a *rpS16*, en diferentes tipos celulares del epitelio seminífero y en la línea somática NIH-3T3.

6 DISCUSIÓN

Desde que en 1998 Fire y Mello describieran el fenómeno de interferencia de RNA, el interés, el desarrollo tecnológico y las aplicaciones se han incrementado exponencialmente, como lo demuestra la evolución del número de trabajos publicados desde entonces (Fig. 33). En el momento en que se inició esta Tesis Doctoral, prácticamente no había estudios que hubieran utilizado la tecnología de interferencia de RNA *in vivo*. Se desconocía tanto la mecánica molecular de RNAi implicada en las rutas biológicas de silenciamiento génico en epitelio seminífero, como la posibilidad de su aplicación como técnica de supresión de función génica en las células integrantes de este epitelio. Actualmente, se ha conseguido aplicar la técnica de silenciamiento génico mediado por siRNAs o shRNAs *in vivo* en diferentes tejidos, tanto en estudios funcionales como en ensayos terapéuticos (Lu y col., 2005b). Asimismo, el proceso de interferencia de RNA se ha convertido en los últimos años en una herramienta muy utilizada en genómica funcional y su aplicación en terapia génica genera grandes expectativas (Leun y Whittaker, 2005).

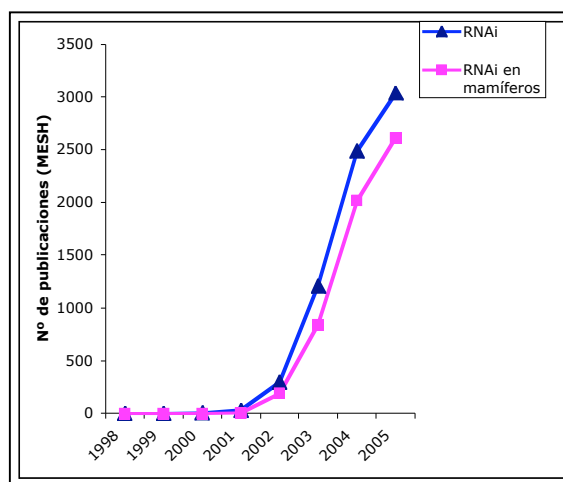


Figura 33: Evolución del número de publicaciones sobre RNAi (1998-2005): Los datos se obtuvieron de la base de datos bibliográfica PubMed. La terminología MESH utilizada incluye: “RNA interference”, “RNA-induced silencing complex”, “small interfering RNA”, “microRNA”. La gráfica correspondiente a RNAi en mamíferos se obtuvo con la misma terminología y añadiendo el término “mammals”.

El objetivo principal de esta Tesis ha sido el estudio del fenómeno de RNAi en el epitelio seminífero de ratón. Sin embargo, los resultados de transfección *in vivo*, mediante la metodología descrita (ver materiales y métodos) en ratones adultos, ha enfocado este estudio de RNAi hacia las células de Sertoli, dada la residual transfección de vectores a células germinales.

Recientemente, se han publicado varios artículos sobre el fenómeno de RNAi en epitelio seminífero de ratón. Por un lado, se demostró que existía la maquinaria necesaria para silenciar genes en células espermatogénicas, mediante la introducción exógena de shRNAs dirigidos contra genes específicos de células de la línea germinal, ya sea mediante EP *in vivo* (Shoji y col., 2005) o transgénesis (Knot y col., 2005). Además, se han descubierto varios miRNAs en testículo (Yu y col., 2005), algunos de ellos específicos de línea germinal, lo que sugería la presencia de la maquinaria endógena de regulación de la expresión por miRNAs en el epitelio seminífero. Por otro lado, se ha demostrado, mediante experimentos de transgénesis, que las células de Sertoli poseen la maquinaria endógena de silenciamiento génico (Rao y col., 2006).

Sin embargo, tal como ha demostrado Shoji y col. (2005) y en el trabajo llevado a cabo en esta Tesis Doctoral, la incorporación local *in vivo* de vectores que expresan shRNAs en células del epitelio seminífero permite estudiar la función génica de manera rápida y menos costosa que mediante la generación de animales transgénicos. En esta Tesis se ha evaluado la posibilidad de silenciar genes en células de Sertoli mediante la técnica de microinyección en epitelio seminífero *in vivo* y transfección de vectores que expresan shRNAs por electroporación de onda cuadrada.

6.1 Silenciamiento del gen *Egfp* en epitelio seminífero de ratón *in vivo*

Uno de los vectores utilizado en este estudio, pGtoR, coexpresaba simultáneamente moléculas de shRNA_{EGFP} y transcritos codificantes de la proteína roja fluorescente, HCRED1, como marcador. La expresión de *HcRed1* facilitaba el análisis del silenciamiento génico a nivel de células individuales. De esta manera, podíamos seleccionar las células transfectadas y analizar la expresión del gen diana, en nuestro caso el gen *Egfp*, en ratones FM131. El epitelio seminífero de mamíferos está estructurado de forma compleja, con tipos celulares diferentes, tanto por su morfología como por su estado transcripcional y ploídico. Consecuentemente, se requiere un análisis definido para cada tipo celular. El marcador fluorescente (HCRED1) nos permitía distinguir en qué células se podía estar produciendo el silenciamiento y analizar el comportamiento de estos tipos celulares en comparación con el resto de células no transfectadas.

Encontramos diversos problemas asociados a la utilización del vector pGtoR. Por un lado, para detectar la fluorescencia emitida por la proteína HCRED1 fue necesario utilizar longitudes de onda de excitación que salieran del espectro de excitación de la proteína EGFP. Ello podría incidir negativamente en la detección de células que contuvieran un escaso número de moléculas del vector, ya que, su señal estaría por debajo del umbral establecido para discriminar células no transfectadas de células transfectadas (ver materiales y métodos). De esta manera, células consideradas como no transfectadas podrían estar expresando, realmente, moléculas de shRNA a nivel suficiente para silenciar el gen *Egfp*, introduciendo un sesgo en la valoración de intensidad de fluorescencia verde (Ifv). En este caso, los valores de Ifv en células seleccionadas como no transfectadas serían menores que los reales. Por otro lado, la utilización del mismo promotor, CAG, para regular la expresión endógena de *Egfp* (el ratón transgénico FM131 se generó usando CAG como promotor de *Egfp*) y la expresión de *HcRed1* podría conducir a una competencia por la maquinaria de transcripción tanto en

células FM131 transfectadas con pGtoR como en aquellas transfectadas con el vector control pRed. Esta competencia resultaría en una disminución de la expresión de ambos genes. Los dos fenómenos podían estar interviniendo, de modo que las diferencias de Ifv que observamos entre las poblaciones celulares transfectadas con pGtoR y las transfectadas con pRed podían estar infravaloradas.

Inicialmente se comprobó que el vector pGtoR era funcional, llevando a cabo experimentos de transfección en células NIH-3T3 y fibroblastos primarios procedentes de ratones transgénicos FM131. Una vez que se demostró que el shRNA que expresaba pGtoR era capaz de silenciar el gen *Egfp*, en modelos celulares simples, comenzamos los estudios *in vivo*.

El método utilizado para transfectar *in vivo* células del epitelio seminífero ha sido la electroporación de onda cuadrada. Observamos que utilizando esta técnica en ratones con edades comprendidas entre los 30 y 45 días, el tipo celular preferentemente transfectado era la célula de Sertoli. Como se ha descrito en la introducción, el túbulo seminífero está constituido por un estrato basal y otro luminal, definidos en base a las uniones estrechas que se establecen entre células de Sertoli (Lui y Lee, 2006). Cuando se microinyectaba en *rete testis*, la solución con el vector entraba en el lumen de los túbulos seminíferos, por lo que las células más expuestas serían las que se transfectarían con mayor probabilidad; es decir: las células de Sertoli (Fig. 16) (Russel y col., 1986; de Franca y col., 1993; Russel y Griswold, 1993) y las espermátidas en elongación. Las espermátidas en elongación se encuentran, en general, en un estado de baja o nula actividad transcripcional (Kierszenbaum y Tres, 1975; Sprando y Russel, 1987; Steger, 2001), por lo que, aunque se transfectaran, la proteína roja fluorescente no se expresaría o lo haría muy poco. El acceso de moléculas de DNA al compartimento basal del epitelio seminífero estaría dificultado por la presencia de la barrera que establecen las uniones estrechas. En individuos prepúberes aún no están constituidas estas uniones; así,

Shoji y col. (2005) describieron la transfección en testículos de ratones de 5 dpp para acceder a espermatogonias, de 8 dpp para acceder a paquitenas y de 15 dpp para acceder a espermátidas redondas. Estos autores también emplearon la técnica de microinyección y transfección por electroporación de onda cuadrada, pero en testículos de ratones prepúberes, logrando silenciar genes en espermatogonias, espermátidas y espermátidas redondas.

Una vez determinado que el tipo celular preferentemente transfectado *in vivo*, en animales adultos, era la célula de Sertoli, se procedió a estudiar el silenciamiento génico por RNAi en este tipo celular. Dada la heterogeneidad en cuanto a la emisión de fluorescencia verde, entre los tipos celulares que componen el epitelio seminífero de los ratones transgénicos para el gen *Egfp* (FM131) (Ventela y col., 2000), y con el objetivo de cuantificar los resultados, se usó la citometría de flujo para evaluar la reducción de EGFP. Los resultados mostraban una disminución de un 41,94 % de la intensidad de fluorescencia verde en las células transfectadas con el vector pGtoR, en comparación con la Ifv de las células transfectadas con el vector pRed. Esta reducción de fluorescencia era una medida indirecta de la reducción de proteína EGFP en las células transfectadas con pGtoR, como consecuencia del silenciamiento mediado por el shRNA_{EGFP}.

En este trabajo concluimos que es posible silenciar genes en células de Sertoli mediante la introducción *in vivo* de vectores que expresen shRNAs. Nuestros resultados corroboran los publicados recientemente por Rao y col. (2006). Estos autores comprobaron que la célula de Sertoli posee la maquinaria para silenciar genes por RNAi. Mediante transgénesis introdujeron en ratones una construcción capaz de expresar, específicamente en células de Sertoli, un shRNA que se diseñó utilizando como modelo un pri-miRNA. Como vimos en la introducción, el silenciamiento génico por RNAi puede llevarse a cabo por degradación del mRNA diana o por bloqueo de su traducción. En nuestro caso no hemos podido confirmar si la disminución de proteína EGFP era debida a uno u otro proceso. Sin

embargo, Rao y col. (2006) no observaron reducción del mRNA, lo que sugería que el silenciamiento debía ser producido por represión traduccional.

Tras la observación de que el tipo celular transfectado preferentemente era la célula de Sertoli, y demostrar que se produce silenciamiento del gen *Egfp* cuando analizamos el conjunto de células monodispersas de testículos procedentes de ratones FM131, quisimos comprobar, en cultivos primarios de células de Sertoli procedentes de ratones FM131, que, efectivamente, en este tipo celular se producía interferencia de RNA.

6.2 Silenciamiento del gen *Egfp* en células de Sertoli FM131 en cultivo

Las células procedentes de cultivos primarios son, en general, más difíciles de transfectar que las líneas celulares establecidas. En este trabajo hemos optimizado la técnica de transfección a células de Sertoli *in vitro* mediante liposomas, hasta un 40% de eficiencia de transfección (ver resultados). No existe mucha información sobre la eficacia de transfección a células de Sertoli en cultivo primario, pero nuestros resultados superan el 25% de eficacia obtenida por Chaudhary y Skinner (2002), que utilizaban fosfato cálcico como agente de transfección, o se asemejan al 30-40% obtenido por Denolet y col. (2006), que utilizaban partículas lipídicas (“Gene Juice”, Novagen). Es importante reseñar, en este sentido, que la diferencia encontrada en cuanto a eficiencia de transfección en los experimentos realizados con pGtoR y pRed, comparando la transfección a células de Sertoli procedentes de ratones FM131 (5-7%) con la transfección a células de Sertoli procedentes de ratones C57BL6/J (17-25%), podía estar ocasionada por la competencia entre los promotores CAG de los genes *Egfp* y *HcRed1* en las células de Sertoli FM131, como se ha explicado en el apartado anterior.

Llevamos a cabo experimentos de transfección con el vector pGtoR en cultivos primarios de células de Sertoli obtenidas de testículos de ratones FM131 para demostrar que

en estas células, transfectadas preferentemente *in vivo*, era posible inducir el proceso de interferencia de RNA para silenciar el gen *Egfp*. Efectivamente, conseguimos reducir hasta un 41,7% la señal de EGFP.

Analizando el periodo de cadencia entre la transfección y el análisis de silenciamiento génico, se observó que la reducción en la fluorescencia generada por la proteína EGFP era mayor hacia los 7 días después de la transfección con pGtoR (Fig. 19). Hay diversos estudios en los que se ha silenciado GFP o EGFP de distintos tipos celulares; entre ellos destaca el de Cronn y Adams (2003), que observaron que la proteína EGFP era muy estable, y estimaron que tarda 4 días en desaparecer. Por lo tanto, podíamos estar consiguiendo una reducción relativamente rápida de la expresión del gen *Egfp*, bien por procesamiento del mRNA o por inhibición de la traducción, que no detectaríamos hasta varios días después, una vez que la proteína EGFP se hubiera metabolizado en la célula.

A pesar de los avances en las metodologías de diseño de siRNAs y shRNAs, antes de llevar a cabo un estudio de silenciamiento génico por RNAi se ha hecho necesario probar entre 3 y 6 diseños de moléculas silenciadoras diferentes, hasta encontrar una suficientemente eficaz (Dykxhoorn y Lieberman, 2005). El interés en trasladar este tipo de estudios a modelos *in vivo* se ha acrecentado en los últimos tiempos, pero en estos modelos puede ser altamente costoso probar múltiples construcciones. Por ello, es útil desarrollar sistemas *in vitro* en los que poder probar varias construcciones y seleccionar aquellas que mejor funcionen. Si el objetivo es silenciar genes en un tipo celular determinado *in vivo*, se hace necesario recurrir a cultivos primarios de ese tipo celular para dirigir eficazmente el silenciamiento génico después del ensayo con diversos vectores.

También se ha logrado silenciar genes por RNAi en líneas celulares estables derivadas de Sertoli: TM4 (Zeng y col., 2004), Smat 1 (Belville y col., 2005) y SK11 (Sneddon y col., 2006). A diferencia de un cultivo primario, estas líneas no expresan todo el transcriptoma de

Sertoli, Zeng y col (2004) observaron reducción del mRNA del gen *Sortilin* con dos de los 6 siRNAs que utilizaron, pudiendo asociar la función de este gen con el transporte de la proteína prosaposina a los lisosomas. Belville y col. (2005) observaron una reducción del mRNA de la hormona anti-Muleriana (*Amh*). Sneddon y col. (2006) también observaron reducción de mensajero cuando introdujeron un shRNA en las células SK11 contra el gen del receptor de estrógenos- α (*ER α*).

6.3 Regulación de la expresión de genes que codifican proteínas implicadas en RNAi

Según los datos de expresión obtenidos en esta Tesis Doctoral, mediante RT-PCR en Tiempo Real, los genes *Drosha*, *Dicer* y *Ago 1-4* se expresan de manera dependiente de tejido. Esta expresión dependiente de tejido ya se había descrito, tanto en el desarrollo del embrión de ratón (Lu y col., 2005a) como en tejidos somáticos adultos (Sago y col., 2004), sugiriendo que estos genes tienen un posible carácter pleiotrópico. El tejido en el que registrábamos mayor expresión de *Drosha*, *Dicer*, *Ago2* y *Ago3* fue cerebro. *Ago1* se expresaba preferentemente en bazo, mientras que *Ago4* lo hacía en testículo y, en menor medida, en cerebro. En general, estos resultados coincidían con los datos publicados hasta el momento (Wu y col., 2000; Nicholson y Nicholson, 2002; Fortín y col., 2002; Sago y col., 2004; Yang y col., 2005). En un análisis similar, por RT-PCR en Tiempo Real, Sago y col. (2004) observaron que el tejido en el que más expresión había de *Dicer*, *Ago2*, *3* y *4* era testículo. Sin embargo, los errores estándar asociados a los valores de expresión eran muy grandes, y carecían de un análisis estadístico que confirmara la significación de las diferencias.

Realizamos un análisis de correlación entre estos genes, en función de los niveles de expresión en los diferentes tejidos estudiados, calculando el coeficiente de correlación de

Pearson. Se observó que *Drosha*, *Dicer*, *Ago2* y *Ago3* estaban coregulados en todos los tejidos analizados, lo que era de esperar, ya que se han identificado en rutas biológicas comunes. Sin embargo, su coeficiente de determinación no es del 100%; es decir, el grado de dependencia de un gen con respecto al otro no es total y, por tanto, podrían estar actuando, alternativamente y de manera independiente, en otros procesos biológicos. Los valores de expresión de *Ago1* y *Ago4* no se correlacionaban con ninguno de los otros genes; ya habíamos observado que estos genes se expresaban de forma especialmente alta en bazo y testículo, lo que podía significar que tuviesen otras funciones especializadas en esos tejidos. Si en el análisis de correlación de *Ago4*, con el resto de genes, obviábamos el dato de expresión en testículo, podíamos observar que la correlación con *Ago2* y *Ago3* era casi del 100%. Así, en órganos diferentes a testículo, se expresaba coordinadamente con *Ago2* y *Ago3*. Aunque la correlación no era significativa ($p_{Ago4-Dicer}=0,0738$; $p_{Ago4-Drosha}=0,078$; Tabla V), *Ago4* también presentaba un coeficiente de determinación relativamente alto con *Drosha* ($R^2 = 0,70$) y *Dicer*. ($R^2 = 0,71$). Esto podría indicar que *Ago4* intervendría alternativamente en otros procesos de diferenciación y desarrollo en células del testículo. Por otro lado, *Ago1* no se correlacionaba con el resto de genes, lo cual sugería su participación en procesos distintos a RNAi en la mayor parte de los tejidos analizados. Se ha observado que la expresión de algunos miRNAs es específica de tejido (Lagos-Quintana y col., 2002 y 2003), de tal modo que es posible que cada proteína Argonauta se haya especializado en procesos dirigidos por miRNAs específicos.

Sago y col. (2004) ya habían observado que *Dicer* y los genes de la familia Argonauta tienen niveles de expresión altos en testículo. Estos datos han sido corroborados por nuestro estudio, en el que, además, observamos que la expresión de *Drosha*, *Dicer*, y los genes de la familia Argonauta cambiaba durante el desarrollo del epitelio seminífero, así como en los distintos tipos celulares analizados. Los mayores valores de expresión se detectaban, en

general, entre los 14 y 18 dpp. En esos días, el tipo celular más abundante es el espermatocito paquiténico (Bellvé y col., 1977).

El patrón de expresión de *Drosha* durante el desarrollo de testículo, obtenido mediante “Northern-blot” (Fig. 21-22), difería del obtenido mediante RT-PCR en Tiempo Real (Fig. 24b). En “Northern-blot”, detectábamos un único transcrito de 5kb (Fig. 21), utilizando membranas que contenían RNA total procedente de testículos de diferentes días del desarrollo. Sin embargo, Fortín y col. (2002) ya habían descrito, también mediante “Northern-blot”, la presencia de dos transcritos en testículo adulto: uno de 5kb y otro de 3,5kb, específico de testículo, en membranas que contenían mRNA purificado. Los oligonucleótidos utilizados para detectar *Drosha* mediante RT-PCR en Tiempo Real fueron diseñados para amplificar cDNA a partir de una secuencia específica localizada hacia la región 3’ del transcrito utilizado como referencia (ver materiales y métodos). Es probable que en los experimentos de RT-PCR en Tiempo Real estuviéramos amplificando cDNA no sólo a partir del transcrito de 5kb sino de otros presentes en los distintos estadios de desarrollo analizados, lo que explicaría las diferencias de expresión estimadas en ambos experimentos. En el análisis de *Drosha* durante el desarrollo de testículo, detectamos un alto nivel de expresión después de iniciada la meiosis. Los niveles de transcrito eran más elevados en los tipos celulares de línea germinal, que en células somáticas (Fig. 24 C). La presencia en células germinales de mayores cantidades de transcrito *Drosha* que en células de Sertoli apoyaba la idea de que en línea germinal podrían estar expresándose gran cantidad de miRNAs, puesto que *Drosha* es un elemento clave en el procesamiento de este tipo de moléculas. Esta idea estaría de acuerdo con la hipótesis de que tejidos con procesos de diferenciación terminal, sujetos a cambios dinámicos en la expresión génica, estarían sometidos a una mayor regulación por miRNAs, al igual que en procesos de determinación celular durante el desarrollo embrionario, como ya ha sido sugerido (Lu y col., 2005a).

Otro de los genes cuya función en silenciamiento por RNAi ha sido bien caracterizada es *Dicer*. *Dicer* registraba su máxima expresión en paquitenas, disminuyendo ésta, progresivamente en la diferenciación, hasta el estadio de espermátida alargada. Según Kotaja y col. (2006) la proteína DICER se detecta en espermátidas redondas, pero desaparece en alargadas. Nuestros resultados corroboraban los datos de expresión observados por Kotaja y col. (2006) y sugerían que los transcritos *Dicer* eran inmediatamente traducidos en su correspondiente proteína en estas células. Los mismos autores observaron que DICER colocalizaba con los cuerpos cromatóides de manera dependiente del estadio de maduración de las espermátidas redondas, aumentando progresivamente hasta el estadio VI y VII, y disminuyendo a partir del estadio VIII. Por otro lado, se ha establecido que DICER interacciona con diversas proteínas dependiendo del tejido en el que se exprese: en sistema nervioso interacciona con las proteínas GEMIN3 y GEMIN4, proteínas que presentan un dominio RNA helicasa (Mourelatos y col., 2002), y en testículo interacciona con HIWI, el homólogo humano de MIWI (Tahbaz y col., 2004), y con MVH, un componente de los cuerpos cromatóides (Kotaja y col., 2006). Consecuentemente, todos estos datos parecen indicar que las interacciones de DICER con otras proteínas podrían depender del tejido donde se expresa. Según nuestros datos de expresión, *Dicer* se expresaba mucho más en Sertoli que en línea germinal y en la otra línea somática analizada: NIH-3T3. Esto sugería que la célula de Sertoli requeriría más proteína DICER que las células de la línea germinal.

Al igual que *Dicer*, detectamos un elevado nivel de expresión de *Ago2* en paquitenas, que disminuía progresivamente durante la espermiogénesis; es decir, observábamos una reducción en espermátidas redondas y alargadas. Kotaja y col. (2006) observaron que la proteína AGO2 se localiza en cuerpos cromatóides junto con DICER, y es en esta estructura donde se sugiere que pueda llevar a cabo su función. En los cuerpos cromatóides también se localiza el miRNA-122a, que dirige la degradación del mRNA de la proteína TNP2 (Yu y

col., 2005). Si AGO2 es la única proteína que presenta un centro activo capaz de romper mensajeros, es probable que sea la encargada de romper el mensajero de *Tnp2*. Por otra parte, AGO2 se expresaba mucho más en Sertoli que en la línea germinal, superando el nivel de *Droscha* (Fig. 32), tal como sucedía en otros tejidos analizados (cerebro, bazo, músculo y pulmón). Es posible que DICER y AGO2 desarrollen alguna función independiente del silenciamiento mediado por miRNAs endógenos en células de Sertoli.

Los resultados de expresión de *Ago3* y *Ago4* durante el desarrollo posnatal de testículo se ajustaban a una distribución Normal, con el máximo nivel de expresión entre los días 10 y 18 dpp. Este patrón de expresión estaba en consonancia con la expresión detectada en las células germinales estudiadas: en paquitenas encontrábamos más expresión de ambos genes que en espermátidas redondas y alargadas, lo que indicaba que la acumulación de transcritos se iba reduciendo a lo largo de la espermiogénesis (Fig. 29 y 30). Al mismo tiempo, estos genes se expresaban poco o no se expresaban, en las células somáticas analizadas (células de Sertoli o NIH-3T3). Se ha descrito la localización de la proteína AGO3 en cuerpos P y en cuerpos cromatoides. AGO4 se ha localizado en cuerpos P, pero se desconoce si también está presente en cuerpos cromatoides. Siendo *Ago4* el gen de la familia Argonauta que más se expresa en testículo, sería interesante caracterizar su localización subcelular durante la espermatogénesis.

En conclusión, se demuestra que los genes de la familia Argonauta tienen un patrón de expresión definido para cada tejido y tipo celular. Además su expresión se encuentra regulada durante el desarrollo de las células germinales. Se pone de manifiesto, entonces, que si bien puede que haya procesos de silenciamiento génico que dependan de las cuatro proteínas Argonauta (Doi y col., 2003), nuestros datos sugieren que estos genes pudieran ser pleiotrópicos dependientes de tejido o de tipos celulares. Es posible que según el tipo de siRNA involucrado, sea una proteína Argonauta u otra la encargada de realizar el proceso de

silenciamiento. De esta manera, es posible que una gran parte de los procesos de regulación de la expresión génica mediados por miRNAs, en línea germinal, dependan de AGO3 y AGO4. Serán necesarios nuevos estudios que analicen las funciones específicas de tejido y de tipo celular de estas proteínas, para comprender sus implicaciones en procesos de silenciamiento.

Encontramos evidencias de la existencia de un nuevo transcrito *Ago3*. Este transcrito difería de los descritos en la base de datos ENSEMBL por la ausencia de una secuencia de 16 nt pertenecientes al inicio del exón 14 del transcrito ENSMUST00000030655 o del exón 13 del transcrito ENSMUST00000069077 (Fig. 28a). La aparición de este nuevo transcrito podía, por tanto, ser explicada por procesamiento alternativo (“splicing”) del transcrito primario. La ausencia de estos 16 nt en el mRNA provocaría un cambio en el marco abierto de lectura y, de traducirse, generaría una proteína truncada. El cambio afectaría al dominio Piwi, que se perdería en un 70%. La pérdida afectaría a los residuos aspartato e histidina que forman el centro catalítico y a la caja PIWI. Aunque aún no se conoce la función del dominio Piwi, si se sabe que es necesario para la interacción de AGO3 con DICER (Tahbaz y col., 2004), y que, al menos en AGO2, el dominio funciona como centro catalítico capaz de producir roturas en el dsRNA (Liu y col., 2004; Rivas y col., 2005). La proteína teórica resultante, Tr-AGO3, por tanto, tendría una función diferente de la proteína AGO3. En general, en células espermatogénicas se ha encontrado un gran número de mRNAs que difieren en tamaño y estructura de los transcritos de los mismos genes estudiados en células somáticas. Estos nuevos transcritos se producen a partir de inicios de la transcripción específicos de testículo, por procesamiento alternativo o poliadenilación alternativa. Se han denominado transcritos alterados en células espermáticas (SCATs, “Spermatogenic Cell-Altered Transcripts”) y muchos de ellos codifican proteínas truncadas que no pueden llevar a cabo las mismas funciones que las proteínas de células somáticas (Kleene, 2001). Mientras

que unos autores piensan que los SCATs tienen funciones especiales relacionadas con meiosis y espermiogénesis, (Eddy y O'Brien, 1998; Hecht, 1998; Walker y col, 1999), otros proponen que son el resultado de una pérdida de control de la expresión (Davies y Willison, 1993; Schimdt, 1996; Ewolou y Schimenti, 1997; Kleene y col., 1998) y que no se traducirían a proteínas, ya que en algunos transcritos se han descrito secuencias que inhiben la traducción de los mRNAs (Kleene, 2001). En conclusión, Tr-AGO3 sería un transcrito alternativo, que generaría una proteína truncada con una función en espermatogénesis diferente a la de AGO3, como sucede de manera análoga para otras proteínas (Eddy y O'Brien, 1998; Walker y col., 1999). O, también, podría formar parte de un mecanismo de regulación funcional.

7 CONCLUSIONES

El análisis de los datos presentados en este trabajo, junto con la revisión de las publicaciones científicas referentes al silenciamiento génico por RNAi en epitelio seminífero, nos ha permitido enunciar las siguientes conclusiones:

1. La metodología de transfección *in vivo* en epitelio seminífero de ratones adultos, mediada por electroporación de onda cuadrada, únicamente permite la transfección de células de Sertoli, en las diversas condiciones establecidas para no dañar irreversiblemente el epitelio.
2. Se ha demostrado que es posible silenciar genes endógenos mediante la introducción de shRNAs en células de Sertoli tanto *in vivo* como *in vitro*.
3. Los genes *Drosha*, *Dicer*, *Ago1*, *Ago2*, *Ago3* y *Ago4* que codifican proteínas participantes en los mecanismos moleculares conducentes a silenciamiento génico por RNAi, presentan diferentes niveles de expresión en los tejidos analizados, siendo la expresión de *Ago3* y *Ago4* especialmente abundante en testículo.
4. Existe correlación positiva entre la expresión de los genes *Ago2*, *Ago3*, *Drosha* y *Dicer*. No se encuentra correlación de la expresión de *Ago1* y *Ago4* con la del resto de genes analizados, siendo su expresión especialmente alta en bazo y testículo, respectivamente, sugiriéndonos un papel especializado en estos tejidos.
5. La expresión de los 6 genes analizados está regulada durante el desarrollo del epitelio seminífero. Su expresión es dependiente del tipo celular, de manera que, *Dicer* y *Ago2* se expresan preferentemente en células somáticas, mientras que *Drosha*, *Ago3* y *Ago4* lo hacen en células de la línea germinal.

8 BIBLIOGRAFÍA

- Abraira, V y Pérez de Vargas, L.A. (1996). Métodos multivariantes en bioestadística. Ed. Centro de Estudios Avanzados Ramón Areces. Madrid.
- Ambros, V. (2004) The functions of animal microRNAs. *Nature* 431, 350-355.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D. Sedman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K. (1996). *Current protocols in molecular biology*. Jonh Wiley & Sons, Inc.U.S.
- Barber, G.N. (2001) Host defense, viruses and apoptosis. *Cell Death Differ.* 8, 113-126.
- Bartel, D.P. (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116, 281-297.
- Baulcombe, D. (2004) RNA silencing in plants. *Nature* 431, 356-363.
- Belville, C., Jamin, S.P., Picard, J.Y., Josso, N. y di Clemente, N. (2005) Role of type I receptors for anti-Mullerian hormone in the SMAT-1 Sertoli cell line. *Oncogene* 24, 4984-4992.
- Bellve, A.R., Millette, C.F., Bhatnagar, Y.M. y O'Brien, D.A. (1977) Dissociation of the mouse testis and characterization of isolated spermatogenic cells. *J. Histochem. Cytochem.* 25, 480-494.
- Bernstein, E., Caudy, A.A., Hammond, S.M. y Hannon, G.J. (2001) Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 409, 363-366.
- Bernstein, E., Kim, S.Y., Carmell, M.A., Murchison, E.P., Alcorn, H., Li, M.Z., Mills, A.A., Elledge, S.J., Yerson, K.V. y Hannon, G.J. (2003) Dicer is essential for mouse development. *Nat. Genet.* 35, 215-217.
- Billy, E., Brondani, V., Zhang, H., Muller, U. y Filipowicz, W. (2001) Specific interference with gene expression induced by long, double-stranded RNA in mouse embryonal teratocarcinoma cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 98, 14428-14433.
- Bitko, V. y Barik, S. (2001) Phenotypic silencing of cytoplasmic genes using sequence-specific double-stranded short interfering RNA and its application in the reverse genetics of wild type negative-strand RNA viruses. *BMC Microbiol.* 1, 34.
- Blanchard, K.T. y Boekelheide, K. (1997) Adenovirus-mediated gene transfer to rat testis in vivo. *Biol. Reprod.* 56, 495-500.
- Bohnsack, M.T., Czaplinski, K. y Gorlich, D. (2004) Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA* 10, 185-191.
- Bregues, M., Teixeira, D. y Parker, R. (2005) Movement of eukaryotic mRNAs between polysomes and cytoplasmic processing bodies. *Science* 310, 486-489.

- Brinster, R.L. y Avarbock, M.R. (1994) Germline transmission of donor haplotype following spermatogonial transplantation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 91, 11303-11307.
- Brinster, R.L. y Zimmermann, J.W. (1994) Spermatogenesis following male germ-cell transplantation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 91, 11298-11302.
- Brummelkamp, T.R., Bernards, R. y Agami, R. (2002) A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* 296, 550-553.
- Carmell, M.A., Xuan, Z., Zhang, M.Q. y Hannon, G.J. (2002) The Argonaute family: tentacles that reach into RNAi, developmental control, stem cell maintenance, and tumorigenesis. *Genes Dev.* 16, 2733-2742.
- Carrington, J.C. y Ambros, V. (2003) Role of microRNAs in plant and animal development. *Science* 301, 336-338.
- Celebi, C., Auvray, P., Benvegna, T., Plusquellec, D., Jegou, B. y Guillaudeux, T. (2002) Transient transmission of a transgene in mouse offspring following in vivo transfection of male germ cells. *Mol. Reprod. Dev.* 62, 477-482.
- Cerutti, L., Mian, N. y Bateman, A. (2000) Domains in gene silencing and cell differentiation proteins: the novel PAZ domain and redefinition of the Piwi domain. *Trends Biochem. Sci.* 25, 481-482.
- Chaudhary, J. y Skinner, M.K. (2002) Identification of a novel gene product, Sertoli cell gene with a zinc finger domain, that is important for FSH activation of testicular Sertoli cells. *Endocrinology* 143, 426-435.
- Chendrimada, T.P., Gregory, R.I., Kumaraswamy, E., Norman, J., Cooch, N., Nishikura, K. y Shiekhattar, R. (2005) TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature* 436, 740-744.
- Cheng, G.H. y Skoultchi, A.I. (1989) Rapid induction of polyadenylated H1 histone mRNAs in mouse erythroleukemia cells is regulated by c-myc. *Mol. Cell Biol.* 9, 2332-2340.
- Cox, D.N., Chao, A., Baker, J., Chang, L., Qiao, D. y Lin, H. (1998) A novel class of evolutionarily conserved genes defined by piwi are essential for stem cell self-renewal. *Genes Dev.* 12, 3715-3727.
- Cronn, R.C. y Adams, K.L. (2003) RNA interference by production of Short hairpin dsRNA in ES cells, their differentiated derivatives, and in somatic cell lines. *Biotechniques* 34, 734-744.
- Davies, P.O. y Willison, K.R. (1993) Molecular mechanism of differentiation in mammalian spermatogenesis. *Semin. Dev. Biol.* 3, 179-188.

- de Franca, L.R., Ghosh, S., Ye, S.J. y Russell, L.D. (1993) Surface and surface-to-volume relationships of the Sertoli cell during the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. *Biol. Reprod.* 49, 1215-1228.
- Deng, W. y Lin, H. (2002) miwi, a murine homolog of piwi, encodes a cytoplasmic protein essential for spermatogenesis. *Dev. Cell* 2, 819-830.
- Denli, A.M., Tops, B.B., Plasterk, R.H., Ketting, R.F. y Hannon, G.J. (2004) Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature* 432, 231-235.
- Denolet, E., Gendt, K.D., Swinnen, J.V., Verrijdt, G., Deboel, L., Roskams, T. y Verhoeven, G. (2006) Transfection with steroid-responsive reporter constructs shows glucocorticoid rather than androgen responsiveness in cultured Sertoli cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 98, 164-173.
- Doi, N., Zenno, S., Ueda, R., Ohki-Hamazaki, H., Ui-Tei, K. y Saigo, K. (2003) Short-interfering-RNA-mediated gene silencing in mammalian cells requires Dicer and eIF2C translation initiation factors. *Curr. Biol.* 13, 41-46.
- Dougherty, W.G., Lindbo, J.A., Smith, H.A., Parks, T.D., Swaney, S. y Proebsting, W.M. (1994) RNA-mediated virus resistance in transgenic plants: exploitation of a cellular pathway possibly involved in RNA degradation. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 7, 544-552.
- Dykxhoorn, D.M. y Lieberman, J. (2005) The silent revolution: RNA interference as basic biology, research tool, and therapeutic. *Annu. Rev. Med.* 56, 401-423.
- Eddy, E.M. y O'Brien, D.A. (1998) Gene expression during mammalian meiosis. *Curr. Top. Dev. Biol.* 37, 141-200.
- Elbashir, S.M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K. y Tuschl, T. (2001) Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411, 494-498.
- Escalier, D. (2001) Impact of genetic engineering on the understanding of spermatogenesis. *Hum. Reprod. Update* 7, 191-210.
- Ewulonu, U.K. y Schimenti, J.C. (1997) Function of untranslated regions in the mouse spermatogenesis-specific gene *Tcp10* evaluated in transgenic mice. *DNA Cell Biol.* 16, 645-651.
- Eystathioy, T., Jakymiw, A., Chan, E.K., Seraphin, B., Cougot, N. y Fritzler, M.J. (2003) The GW182 protein colocalizes with mRNA degradation associated proteins hDcp1 and hLSm4 in cytoplasmic GW bodies. *RNA* 9, 1171-1173.
- Filippov, V., Solovyev, V., Filippova, M. y Gill, S.S. (2000) A novel type of RNase III family proteins in eukaryotes. *Gene* 245, 213-221.

- Filipowicz, W., Jasjiewicz, L., Kolb, F.A. y Pillai, R.S. (2005). Post-transcriptional gene silencing by siRNAs and miRNAs. *Current Opinion in Structural Biology*. 15, 331-341.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E. y Mello, C.C. (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806-811.
- Fortin, K.R., Nicholson, R.H. y Nicholson, A.W. (2002) Mouse ribonuclease III. cDNA structure, expression analysis, and chromosomal location. *BMC Genomics* 3, 26.
- Gil-Alberdi, L. (1989). Estructura y composición del complejo sinaptonémico. Tesis Doctoral, Universidad Autónoma de Madrid.
- Gonzalez, S., Klatt, P., Delgado, S., Conde, E., Lopez-Rios, F., Sanchez-Cespedes, M., Mendez, J., Antequera, F. y Serrano, M. (2006). Oncogenic activity of Cdc6 through repression of the INK4/ARF locus. *Nature*. 440, 702-706.
- Gregory, R.I., Yan, K.P., Amuthan, G., Chendrimada, T., Doratotaj, B., Cooch, N. y Shiekhattar, R. (2004) The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature* 432, 235-240.
- Guo, S. y Kemphues, K.J. (1995) par-1, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. *Cell* 81, 611-620.
- Haase, A.D., Jaskiewicz, L., Zhang, H., Laine, S., Sack, R., Gatignol, A. y Filipowicz, W. (2005) TRBP, a regulator of cellular PKR and HIV-1 virus expression, interacts with Dicer and functions in RNA silencing. *EMBO Rep.* 6, 961-967.
- Han, J., Lee, Y., Yeom, K.H., Kim, Y.K., Jin, H. y Kim, V.N. (2004) The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes Dev.* 18, 3016-3027.
- Harris, K.S., Zhang, Z., McManus, M.T., Harfe, B.D. y Sun, X. (2006) Dicer function is essential for lung epithelium morphogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 103, 2208-2213.
- Hasuwa, H., Kaseda, K., Einarsdottir, T. y Okabe, M. (2002) Small interfering RNA and gene silencing in transgenic mice and rats. *FEBS Lett.* 532, 227-230.
- He, L. y Hannon, G.J. (2004) MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat. Rev. Genet.* 5, 522-531.
- Hecht, N.B. (1998) Molecular mechanisms of male germ cell differentiation. *Bioessays* 20, 555-561.
- Heyting, C., Dietrich, A.J., Redeker, E.J. y Vink, A.C. (1985) Structure and composition of synaptonemal complexes, isolated from rat spermatocytes. *Eur. J. Cell Biol.* 36, 307-314.

- Hisano, M., Ohta, H., Nishimune, Y. y Nozaki, M. (2003) Methylation of CpG dinucleotides in the open reading frame of a testicular germ cell-specific intronless gene, *Tact1/Actl7b*, represses its expression in somatic cells. *Nucleic Acids Res.* 31, 4797-4804.
- Huang, Z., Tamura, M., Sakurai, T., Chuma, S., Saito, T. y Nakatsuji, N. (2000) In vivo transfection of testicular germ cells and transgenesis by using the mitochondrially localized jellyfish fluorescent protein gene. *FEBS Lett.* 487, 248-251.
- Hunter, T., Hunt, T., Jackson, R.J. y Robertson, H.D. (1975) The characteristics of inhibition of protein synthesis by double-stranded ribonucleic acid in reticulocyte lysates. *J. Biol. Chem.* 250, 409-417.
- Ikawa, M., Tergaonkar, V., Ogura, A., Ogonuki, N., Inoue, K. y Verma, I.M. (2002) Restoration of spermatogenesis by lentiviral gene transfer: offspring from infertile mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 99, 7524-7529.
- Ike, A., Ohta, H., Onishi, M., Iguchi, N., Nishimune, Y. y Nozaki, M. (2004) Transient expression analysis of the mouse ornithine decarboxylase antizyme haploid-specific promoter using in vivo electroporation. *FEBS Lett.* 559, 159-164.
- Jakymiw, A., Lian, S., Eystathioy, T., Li, S., Satoh, M., Hamel, J.C., Fritzler, M.J. y Chan, E.K. (2005) Disruption of GW bodies impairs mammalian RNA interference. *Nat. Cell Biol.* 7, 1267-1274.
- Kawasaki, H. y Taira, K. (2005) Transcriptional gene silencing by short interfering RNAs. *Curr. Opin. Mol. Ther.* 7, 125-131.
- Ketting, R.F., Fischer, S.E., Bernstein, E., Sijen, T., Hannon, G.J. y Plasterk, R.H. (2001) Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. *Genes Dev.* 15, 2654-2659.
- Khvorova, A., Reynolds, A. y Jayasena, S.D. (2003) Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell* 115, 209-216.
- Kierszenbaum, A.L. y Tres, L.L. (1975) Structural and transcriptional features of the mouse spermatid genome. *J. Cell Biol.* 65, 258-270.
- Kimmins, S., Kotaja, N., Davidson, I. y Sassone-Corsi, P. (2004) Testis-specific transcription mechanisms promoting male germ-cell differentiation. *Reproduction* 128, 5-12.
- Kleene, K.C., Distel, R.J. y Hecht, N.B. (1983) cDNA clones encoding cytoplasmic poly(A)⁺ RNAs which first appear at detectable levels in haploid phases of spermatogenesis in the mouse. *Dev. Biol.* 98, 455-464.
- Kleene, K.C., Mulligan, E., Steiger, D., Donohue, K. y Mastrangelo, M.A. (1998) The mouse gene encoding the testis-specific isoform of poly(A) binding protein Pabp2 is an expressed retroposon: intimations that gene expression in

- spermatogenic cells facilitates the creation of new genes. *J. Mol. Evol.* 47, 275-281.
- Kleene, K.C. (2001) A possible meiotic function of the peculiar patterns of gene expression in mammalian spermatogenic cells. *Mech. Dev.* 106, 3-23.
- Knott, J.G., Kurokawa, M., Fissore, R.A., Schultz, R.M. y Williams, C.J. (2005) Transgenic RNA interference reveals role for mouse sperm phospholipase Czeta in triggering Ca²⁺ oscillations during fertilization. *Biol. Reprod.* 72, 992-996.
- Kotaja, N., Bhattacharyya, S.N., Jaskiewicz, L., Kimmins, S., Parvinen, M., Filipowicz, W. y Sassone-Corsi, P. (2006) The chromatoid body of male germ cells: Similarity with processing bodies and presence of Dicer and microRNA pathway components. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 103, 2647-2652
- Kuramochi-Miyagawa, S., Kimura, T., Ijiri, T.W., Isobe, T., Asada, N., Fujita, Y., Ikawa, M., Iwai, N., Okabe, M., Deng, W., Lin, H., Matsuda, Y. y Nakano, T. (2004) Mili, a mammalian member of piwi family gene, is essential for spermatogenesis. *Development* 131, 839-849.
- Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Yalcin, A., Meyer, J., Lendeckel, W. y Tuschl, T. (2002) Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Curr. Biol.* 12, 735-739.
- Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Meyer, J., Borkhardt, A. y Tuschl, T. (2003) New microRNAs from mouse and human. *RNA* 9, 175-179.
- Lam, D.M., Furrer, R. y Bruce, W.R. (1970) The separation, physical characterization, and differentiation kinetics of spermatogonial cells of the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 65, 192-199.
- Landthaler, M., Yalcin, A y Tuschl, T. (2004) The human Digeroge syndrome critical region 8 and its *D. melanogaster* homolog are required for miRNA biogenesis. *Curr. Biol.* 14, 2162-2167.
- Lee, Y., Jeon, K., Lee, J.T., Kim, S. y Kim, V.N. (2002) MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *Embo J.* 21, 4663-4670.
- Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., Lee, J., Provost, P., Radmark, O., Kim, S. y Kim, V.N. (2003) The nuclear RNase III Droscha initiates microRNA processing. *Nature* 425, 415-419.
- Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K.H., Lee, S., Baek, S.H. y Kim, V.N. (2004a) MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *Embo J.* 23, 4051-4060.
- Lee, Y.S., Nakahara, K., Pham, J.W., Kim, K., He, Z., Sontheimer, E.J. y Carthew, R.W. (2004b) Distinct roles for *Drosophila* Dicer-1 and Dicer-2 in the siRNA/miRNA silencing pathways. *Cell* 117, 69-81.

- Leung, R.K. y Whittaker, P.A. (2005) RNA interference: from gene silencing to gene-specific therapeutics. *Pharmacol. Ther.* 107, 222-239.
- Leuschner, P.J., Ameres, S.L., Kueng, S. y Martinez, J. (2006) Cleavage of the siRNA passenger strand during RISC assembly in human cells. *EMBO Rep.* 7, 314-320.
- Lingel, A., Simon, B., Izaurralde, E. y Sattler, M. (2003) Structure and nucleic-acid binding of the *Drosophila* Argonaute 2 PAZ domain. *Nature* 426, 465-469.
- Lippman, Z. y Martienssen, R. (2004) The role of RNA interference in heterochromatic silencing. *Nature* 431, 364-370.
- Liu, J., Carmell, M.A., Rivas, F.V., Marsden, C.G., Thomson, J.M., Song, J.J., Hammond, S.M., Joshua-Tor, L. y Hannon, G.J. (2004) Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science* 305, 1437-1441.
- Liu, J., Rivas, F.V., Wohlschlegel, J., Yates, J.R., 3rd, Parker, R. y Hannon, G.J. (2005a) A role for the P-body component GW182 in microRNA function. *Nat. Cell Biol.* 7, 1161-1166.
- Liu, J., Valencia-Sanchez, M.A., Hannon, G.J. y Parker, R. (2005b) MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies. *Nat. Cell Biol.* 7, 719-723.
- Livak, K.J. y Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using Real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ method. *Methods.* 25, 402-408.
- Lu, J., Qian, J., Chen, F., Tang, X., Li, C. y Cardoso, W.V. (2005a) Differential expression of components of the microRNA machinery during mouse organogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 334, 319-323.
- Lu, P.Y., Xie, F. y Woodle, M.C. (2005b) In vivo application of RNA interference: from functional genomics to therapeutics. *Adv. Genet.* 54, 117-142.
- Lui, W.Y. y Lee, W.M. (2006) Regulation of junction dynamics in the testis- Transcriptional and post-translational regulations of cell junction proteins. *Mol. Cell Endocrinol.* 250, 25-35.
- Lund, E., Guttinger, S., Calado, A., Dahlberg, J.E. y Kutay, U. (2004) Nuclear export of microRNA precursors. *Science* 303, 95-98.
- Macleay, J.A., 2nd y Wilkinson, M.F. (2005) Gene regulation in spermatogenesis. *Curr. Top. Dev. Biol.* 71, 131-197.
- Maniataki, E. y Mourelatos, Z. (2005a) Human mitochondrial tRNAMet is exported to the cytoplasm and associates with the Argonaute 2 protein. *RNA* 11, 849-852.
- Maniataki, E. y Mourelatos, Z. (2005b) A human, ATP-independent, RISC assembly machine fueled by pre-miRNA. *Genes Dev.* 19, 2979-2990.

- Marh, J., Tres, L.L., Yamazaki, Y., Yanagimachi, R. y Kierszenbaum, A.L. (2003) Mouse round spermatids developed in vitro from preexisting spermatocytes can produce normal offspring by nuclear injection into in vivo-developed mature oocytes. *Biol. Reprod.* 69, 169-176.
- Martinez, J., Patkaniowska, A., Urlaub, H., Luhrmann, R. y Tuschl, T. (2002) Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi. *Cell* 110, 563-574.
- Matsuda, S., Ichigotani, Y., Okuda, T., Irimura, T., Nakatsugawa, S. y Hamaguchi, M. (2000) Molecular cloning and characterization of a novel human gene (HERNA) which encodes a putative RNA-helicase. *Biochim. Biophys. Acta* 1490, 163-169.
- Matsuda, T. y Cepko, C.L. (2004) Electroporation and RNA interference in the rodent retina in vivo and in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 101, 16-22.
- Matzke, M.A. y Birchler, J.A. (2005) RNAi-mediated pathways in the nucleus. *Nat. Rev. Genet.* 6, 24-35.
- Meister, G., Lythaler, M., Patkaniowska, A., Dorsett, Y., Teng, G. y Tuschl, T. (2004) Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. *Mol. Cell* 15, 185-197.
- Meister, G. y Tuschl, T. (2004) Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature* 431, 343-349.
- Miller, R.G. y Phillips, R.A. (1969) Separation of cells by velocity sedimentation. *J. Cell Physiol.* 73, 191-201.
- Morris, K.V. (2005) siRNA-mediated transcriptional gene silencing: the potential mechanism and a possible role in the histone code. *Cell Mol. Life Sci.* 62, 3057-3066.
- Mourelatos, Z., Dostie, J., Paushkin, S., Sharma, A., Charroux, B., Abel, L., Rappsilber, J., Mann, M. y Dreyfuss, G. (2002) miRNPs: a novel class of ribonucleoproteins containing numerous microRNAs. *Genes Dev.* 16, 720-728.
- Muramatsu, T., Shibata, O., Ryoki, S., Ohmori, Y. y Okumura, J. (1997) Foreign gene expression in the mouse testis by localized in vivo gene transfer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 233, 45-49.
- Napoli, C., Lemieux, C. y Jorgensen, R. (1990) Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *Plant Cell* 2, 279-289.
- Nicholson, R.H. y Nicholson, A.W. (2002) Molecular characterization of a mouse cDNA encoding Dicer, a ribonuclease III ortholog involved in RNA interference. *Mamm. Genome* 13, 67-73.

- Niwa, H., Yamamura, K. y Miyazaki, J. (1991) Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene* 108, 193-199.
- Ogawa, T., Arechaga, J.M., Avarbock, M.R. y Brinster, R.L. (1997) Transplantation of testis germinal cells into mouse seminiferous tubules. *Int. J. Dev. Biol.* 41, 111-122.
- Okabe, M., Ikawa, M., Kominami, K., Nakanishi, T. y Nishimune, Y. (1997) 'Green mice' as a source of ubiquitous green cells. *FEBS Lett.* 407, 313-319.
- Okada, K., Hirota, E., Mizutani, Y., Fujioka, T., Shuin, T., Miki, T., Nakamura, Y. y Katagiri, T. (2004) Oncogenic role of NALP7 in testicular seminomas. *Cancer Sci.* 95, 949-954.
- Okamura, K., Ishizuka, A., Siomi, H. y Siomi, M.C. (2004) Distinct roles for Argonaute proteins in small RNA-directed RNA cleavage pathways. *Genes Dev.* 18, 1655-1666.
- Parvinen, M. y Hecht, N.B. (1981) Identification of living spermatogenic cells of the mouse by transillumination-phase contrast microscopic technique for 'in situ' analyses of DNA polymerase activities. *Histochemistry* 71, 567-579.
- Pham, J.W., Pellino, J.L., Lee, Y.S., Carthew, R.W. y Sontheimer, E.J. (2004). A Dicer-2-dependent 80s complex cleaves targeted mRNAs during RNAi in *Drosophila*. *Cell* 117, 83-94.
- Pillai, R.S., Artus, C.G. y Filipowicz, W. (2004) Tethering of human Ago proteins to mRNA mimics the miRNA-mediated repression of protein synthesis. *RNA* 10, 1518-1525.
- Provost, P., Dishart, D., Doucet, J., Frendewey, D., Samuelsson, B. y Radmark, O. (2002) Ribonuclease activity and RNA binding of recombinant human Dicer. *Embo J.* 21, 5864-5874.
- Rand, T.A., Ginalski, K., Grishin, N.V. y Wang, X. (2004) Biochemical identification of Argonaute 2 as the sole protein required for RNA-induced silencing complex activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 101, 14385-14389.
- Rand, T.A., Petersen, S., Du, F. y Wang, X. (2005) Argonaute2 cleaves the anti-guide strand of siRNA during RISC activation. *Cell* 123, 621-629.
- Rao, M.K., Pham, J., Imam, J.S., MacLean, J.A., Murali, D., Furuta, Y., Sinha-Hikim, A.P. y Wilkinson, M.F. (2006) Tissue-specific RNAi reveals that WT1 expression in nurse cells controls germ cell survival and spermatogenesis. *Genes Dev.* 20, 147-152.
- Rassoulzadegan, M., Paquis-Flucklinger, V., Bertino, B., Sage, J., Jasin, M., Miyagawa, K., van Heyningen, V., Besmer, P. y Cuzin, F. (1993) Transmeiotic differentiation of male germ cells in culture. *Cell* 75, 997-1006.

- Rivas, F.V., Tolia, N.H., Song, J.J., Aragon, J.P., Liu, J., Hannon, G.J. y Joshua-Tor, L. (2005) Purified Argonaute2 and an siRNA form recombinant human RISC. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 12, 340-349.
- Russell, L.D., Gardner, R.J. y Weber, J.E. (1986) Reconstruction of a type-B configuration monkey Sertoli cell: size, shape, and configurational and specialized cell-to-cell relationships. *Am. J. Anat.* 175, 73-90.
- Russell, L.D. y Griswold, M.D. (1993). *The Sertoli cell*. Cache Rivers Press: Clearwater, F.L.
- Sago, N., Omi, K., Tamura, Y., Kunugi, H., Toyooka, T., Tokunaga, K. y Hohjoh, H. (2004) RNAi induction and activation in mammalian muscle cells where Dicer and eIF2C translation initiation factors are barely expressed. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 319, 50-57.
- Sasaki, T., Shiohama, A., Minoshima, S. y Shimizu, N. (2003) Identification of eight members of the Argonaute family in the human genome small star, filled. *Genomics* 82, 323-330.
- Sassone-Corsi, P. (2002) Unique chromatin remodeling and transcriptional regulation in spermatogenesis. *Science* 296, 2176-2178.
- Sassone-Corsi, P. (2005) Transcription factors governing male fertility. *Andrologia* 37, 228-229.
- Sato, M., Ishikawa, A. y Kimura, M. (2002) Direct injection of foreign DNA into mouse testis as a possible in vivo gene transfer system via epididymal spermatozoa. *Mol. Reprod. Dev.* 61, 49-56.
- Schmidt, E.E. (1996) Transcriptional promiscuity in testes. *Curr. Biol.* 6, 768-769.
- Schwarz, D.S., Hutvagner, G., Du, T., Xu, Z., Aronin, N. y Zamore, P.D. (2003) Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* 115, 199-208.
- Sen, G.L. y Blau, H.M. (2005) Argonaute 2/RISC resides in sites of mammalian mRNA decay known as cytoplasmic bodies. *Nat. Cell Biol.* 7, 633-636.
- Shoji, M., Chuma, S., Yoshida, K., Morita, T. y Nakatsuji, N. (2005) RNA interference during spermatogenesis in mice. *Dev. Biol.* 282, 524-534.
- Skinner, M.K. y Griswold, M.D. (2005). *Sertoli cell Biology*. Elsevier Academic Press, San Diego, California.
- Sneddon, S.F., Walther, N. y Saunders, P.T. (2005) Expression of androgen and estrogen receptors in Sertoli cells: studies using the mouse SK11 cell line. *Endocrinology* 146, 5304-5312.

- Song, J.J., Liu, J., Tolia, N.H., Schneiderman, J., Smith, S.K., Martienssen, R.A., Hannon, G.J. y Joshua-Tor, L. (2003b) The crystal structure of the Argonaute2 PAZ domain reveals an RNA binding motif in RNAi effector complexes. *Nat. Struct. Biol.* 10, 1026-1032.
- Song, J.J., Smith, S.K., Hannon, G.J. y Joshua-Tor, L. (2004) Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. *Science* 305, 1434-1437.
- Sontheimer, E.J. y Carthew, R.W. (2005). Silence from within: endogenous siRNA and miRNAs. *Cell.* 122, 9-12.
- Sprando, R.L. y Russell, L.D. (1987) Comparative study of cytoplasmic elimination in spermatids of selected mammalian species. *Am. J. Anat.* 178, 72-80.
- Staub, C. (2001) A century of research on mammalian male germ cell meiotic differentiation in vitro. *J. Androl.* 22, 911-926.
- Steger, K. (2001) Haploid spermatids exhibit translationally repressed mRNAs. *Anat. Embryol. (Berl)* 203, 323-334.
- Svoboda, P., Stein, P., Hayashi, H. y Schultz, R.M. (2000) Selective reduction of dormant maternal mRNAs in mouse oocytes by RNA interference. *Development* 127, 4147-4156.
- Svoboda, P., Stein, P. y Schultz, R.M. (2001) RNAi in mouse oocytes and preimplantation embryos: effectiveness of hairpin dsRNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 287, 1099-1104.
- Tahbaz, N., Kolb, F.A., Zhang, H., Jaronczyk, K., Filipowicz, W. y Hobman, T.C. (2004) Characterization of the interactions between mammalian PAZ PIWI domain proteins and Dicer. *EMBO Rep.* 5, 189-194.
- Teixeira, D., Sheth, U., Valencia-Sanchez, M.A., Brengues, M. y Parker, R. (2005) Processing bodies require RNA for assembly and contain nontranslating mRNAs. *RNA* 11, 371-382.
- Tomari, Y., Matranga, C., Haley, B., Martinez, N. y Zamore, P.D. (2004) A protein sensor for siRNA asymmetry. *Science* 306, 1377-1380.
- van der Krol, A.R., Mur, L.A., Beld, M., Mol, J.N. y Stuitje, A.R. (1990) Flavonoid genes in petunia: addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression. *Plant Cell* 2, 291-299.
- Ventela, S., Okabe, M., Tanaka, H., Nishimune, Y., Toppari, J. y Parvinen, M. (2000) Expression of green fluorescent protein under beta-actin promoter in living spermatogenic cells of the mouse: stage specific regulation by FSH. *Int. J. Androl.* 23, 236-242.
- Wagner, M y Perry, R.P. (1985) Characterization of the multigene family encoding the mouse S16 ribosomal protein: strategy for distinguishing an expressed gene from

- its processed pseudogene counterparts by an analysis of total genomic DNA. *Mol. Cell Biol.* 5, 3560-3576.
- Walker, W.H., Delfino, F.J. y Habener, J.F. (1999) RNA processing and the control of spermatogenesis. *Front. Horm. Res.* 25, 34-58.
- Wianny, F. y Zernicka-Goetz, M. (2000) Specific interference with gene function by double-stranded RNA in early mouse development. *Nat. Cell Biol.* 2, 70-75.
- Williams, B.R. (1999) PKR; a sentinel kinase for cellular stress. *Oncogene* 18, 6112-6120.
- Wu, H., Xu, H., Miraglia, L.J. y Crooke, S.T. (2000) Human RNase III is a 160-kDa protein involved in preribosomal RNA processing. *J. Biol. Chem.* 275, 36957-36965.
- Yamazaki, Y., Fujimoto, H., Yo, H., Ohyama, T., Hirota, Y. y Noce, T. (1998) In vivo gene transfer to mouse spermatogenic cells by deoxyribonucleic acid injection into seminiferous tubules and subsequent electroporation. *Biol. Reprod.* 59, 1439-1444.
- Yamazaki, Y., Yagi, T., Ozaki, T. y Imoto, K. (2000) In vivo gene transfer to mouse spermatogenic cells using green fluorescent protein as a marker. *J. Exp. Zool.* 286, 212-218.
- Yan, K.S., Yan, S., Farooq, A., Han, A., Zeng, L. y Zhou, M.M. (2003) Structure and conserved RNA binding of the PAZ domain. *Nature* 426, 468-474.
- Yang, S., Tutton, S., Pierce, E. y Yoon, K. (2001) Specific double-stranded RNA interference in undifferentiated mouse embryonic stem cells. *Mol. Cell Biol.* 21, 7807-7816.
- Yang, W. y Steitz, T.A. (1995) Recombining the structures of HIV integrase, RuvC and RNase H. *Structure* 3, 131-134.
- Yang, W.J., Yang, D.D., Na, S., Syusky, G.E., Zhang, Q. y Zhao, G. (2005) Dicer is required for embryonic angiogenesis during mouse development. *J. Biol. Chem.* 280, 9330-9335.
- Yi, R., Qin, Y., Macara, I.G. y Cullen, B.R. (2003) Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev.* 17, 3011-3016.
- Yomogida, K., Yagura, Y. y Nishimune, Y. (2002) Electroporated transgene-rescued spermatogenesis in infertile mutant mice with a sertoli cell defect. *Biol. Reprod.* 67, 712-717.
- Yu, Z., Raabe, T. y Hecht, N.B. (2005) MicroRNA Mirn122a reduces expression of the posttranscriptionally regulated germ cell transition protein 2 (Tnp2) messenger RNA (mRNA) by mRNA cleavage. *Biol. Reprod.* 73, 427-433.

- Zamore, P.D. y Haley, B. (2005) Ribo-gnome: the big world of small RNAs. *Science* 309, 1519-1524.
- Zamore, P.D., Tuschl, T., Sharp, P.A. y Bartel, D.P. (2000) RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* 101, 25-33.
- Zeng, J., Hassan, A.J. y Morales, C.R. (2004) Study of the mouse sortilin gene: Effects of its transient silencing by RNA interference in TM4 Sertoli cells. *Mol. Reprod. Dev.* 68, 469-475.
- Zhang, H., Kolb, F.A., Brondani, V., Billy, E. y Filipowicz, W. (2002) Human Dicer preferentially cleaves dsRNAs at their termini without a requirement for ATP. *Embo J.* 21, 5875-5885.
- Zhang, H., Kolb, F.A., Jaskiewicz, L., Westhof, E. y Filipowicz, W. (2004) Single processing center models for human Dicer and bacterial RNase III. *Cell.* 118, 57-168.

9 APÉNDICE

1	CTGTCTCTCC	CGACTGTGCC	TCTTGTGCC	GGAGCTTTCC	GAGGGCGTCC	GCTCCTCGCC	60
61	TCTGTGGTGG	CACCCTTCTC	TCGTGAAGCA	CTCCCCCAG	CTCCATGAAT	GGAAATCGGC	120
121	TCCGCAGGAC	CCATTGGGGC	CCAGCCCCTA	TTCATCGTGC	CCAGAAGACC	TGGGTACGGC	180
181	ACTATGGGCA	AACCCATTAA	ACTGTTGGCT	AACTGTTTTC	AAGTTGAAAT	CCCAAAGATT	240
241	GATGTCTACC	TCTATGAAGT	TGACATCAAA	CCAGACAAGT	GTCCTCGAAG	AGTGAACAGA	300
301	GAAGTAGTTG	ATTCAAAGGT	TCAGCATTTT	AAAGTGACTA	TATTTGGAGA	CCGTAGACCA	360
361	GTTTATGATG	GAAAAAGAAG	CCTTTATACA	GCCAATCCAC	TTCCCTGTGGC	AACCACTGGG	420
421	GTAGATTTAG	ATGTTACATT	ACCTGGGGAA	GGTGGAAAAG	ATCGACCTTT	CAAGGTGTCA	480
481	GTCAAATTTG	TGTCTCGAGT	CAGCTGGCAC	CTACTACATG	AAGCACTGGC	TGGAGGGACT	540
541	TTGCCTGAGC	CACTGGAATT	AGACAAGCCT	GTCAGACTA	ACCCCGTCCA	TGCCGTTGAC	600
601	GTGGTGCTCC	GACATCTGCC	CTCTATGAAA	TATACGCCCT	TGGGGCGTTC	CTTTTTCTCA	660
661	GCTCCAGAAG	GATATGACCA	CCCTCTGGGA	GGGGGCAGGG	AAGTATGGTT	TGGATTCCAT	720
721	CAGTCTGTTT	GGCCTGCCAT	GTGGAAAATG	ATGCTAAAATA	TTGATGTTTC	TGCCACTGCC	780
781	TTTTACAAAG	CACAACCTGT	AATTCAGTTC	ATGTGTGAAG	TTCTTGACAT	TCACAACATT	840
841	GATGAACAAC	CCAGACCCCT	GACTGATTCT	CATCGGGTAA	AATTCACTAA	GGAGATAAAA	900
901	GGTCTGAAAG	TTGAAGTGAC	TCATTGTGGA	ACAATGAGAC	GGAAATACCG	TGTTTGTAAT	960
961	GTAACGAGAA	GGCCTGCCAG	CCACCAAACC	TTTCCTTTAC	AGCTAGAAAA	TGGCCAAACT	1020
1021	GTGGAGAGGA	CTGTGGCTCA	GTATTTTCAGA	GAAAAGTACA	CGCTGCAGCT	GAAGTACCCA	1080
1081	CACCTTCCCT	GCCTGCAAGT	GGGGCAGGAG	CAGAAGCATA	CATACCTGCC	ACTAGAAGTC	1140
1			GGAG	CAGAAGCATA	CATACCTGCC	ACTAGAAGTC	34
1141	TGTAATATTG	TGGCTGGGCA	AAGGTGTATC	AAGAACTAA	CGGACAATCA	GACTTCTACA	1200
35	TGTAATATTG	TGGCTGGGCA	AAGGTGTATC	AAGAACTAA	CGGACAATCA	GACTTCTACA	94
1201	ATGATAAAGG	CAACAGCAAG	ATCTGCACCA	GATAGACAAG	AGGAAATTAG	CAGATTGGTA	1260
95	ATGATAAAGG	CAACAGCAAG	ATCTGCACCA	GATAGACAAG	AGGAAATTAG	CAGATTGGTA	154
1261	AGAAGTGCAA	ATTATGAAAC	AGATCCATTT	GTTTCAGGAGT	TTCAGCTTAA	AGTGCGGGAT	1320
					?		
155	AGAAGTGCAA	ATTATGAAAC	AGATCCATTT	GTTTCAGGAGT	TTCAGTTTAA	AGTGCGGGAT	214
1321	GAAATGGCCC	ATGTGACAGG	ACGTGTACTT	CCAGCACCTA	TGCTCCAGTA	CGGAGGACGG	1380
215	GAAATGGCCC	ATGTGACAGG	ACGTGTACTT	CCAGCACCTA	TGCTCCAGTA	CGGAGGACGG	274
1381	AACCGGACAG	TAGCCACACC	CAGCCACGGA	GTATGGGACA	TGCGAGGAAA	ACAGTTCCAC	1440
275	AACCGGACAG	TAGCCACACC	CAGCCACGGA	GTATGGGACA	TGCGAGGAAA	ACAGTTCCAC	334
1441	ACAGGAGTCG	AAATCAAAAT	GTGGGCTATT	GCTTGCTTTG	CCACACAGAG	GCAGTGCAGA	1500
335	ACAGGAGTCG	AAATCAAAAT	GTGGGCTATT	GCTTGCTTTG	CCACACAGAG	GCAGTGCAGA	394
1501	GAAGAAATAC	TAAAAGGTTT	CACAGACCAG	CTTCGGAAGA	TTTCCAAGGA	TGCAGGGATG	1560
395	GAAGAAATAC	TAAAAGGTTT	CACAGACCAG	CTTCGGAAGA	TTTCCAAGGA	TGCAGGGATG	454
1561	CCCATCCAGG	GTCAGCCATG	CTTCTGCAAA	TACGCACAGG	GGGCAGACAG	CGTGGAGCCC	1620
455	CCCATCCAGG	GTCAGCCATG	CTTCTGCAAA	TACGCACAGG	GGGCAGACAG	CGTGGAGCCC	514
1621	ATGTTCCGGC	ATCTCAAGAA	CACCTACTCA	GGACTGCAGC	TCATTATCGT	CATCCTGCCC	1680
515	ATGTTCCGGC	ATCTCAAGAA	CACCTACTCA	GGACTGCAGC	TCATTATCGT	CATCCTGCCC	574

1681	GGGAAGACAC	CAGTGTATGC	GGAAGTGAAA	CGTGTGGGAG	ATACACTTTT	GGGTATGGCC	1740
575	GGGAAGACAC	CAGTGTATGC	GGAAGTGAAA	CGTGTGGGAG	ATACACTTTT	GGGTATGGCC	634
1741	ACACAGTGTG	TACAAGTCAA	GAATGTAATA	AAAACATCTC	CTCAAACCTCT	TTCAAACCTTG	1800
635	ACACAGTGTG	TACAAGTCAA	GAATGTAATA	AAAACATCTC	CTCAAACCTCT	TTCAAACCTTG	694
1801	TGCCTAAAGA	TCAATGTTAA	ACTTGGAGGA	ATCAATAATA	TTCTTGTACC	TCATCAAAGA	1860
695	TGCCTAAAGA	TCAATGTTAA	ACTTGGAGGA	ATCAATAATA	TTCTTGTACC	TCATCAAAG_	753
1861	CCTTCTGTGT	TCCAGCAACC	AGTGATCTTC	CTGGGCGCAG	ATGTCACACA	CCGCCTGCT	1920
754	_____	_____CAACC	AGTGATCTTC	CTGGGCGCAG	ATGTCACACA	CCGCCTGCT	798
1921	GGTGACGGAA	AAAAGCCCTC	CATTGCTGCT	GTTGTAGGTA	GTATGGATGC	CCATCCAAGC	1980
799	GGTGACGGAA	AAAAGCCCTC	CATTGCTGCT	GTTGTAGGTA	GTATGGATGC	CCATCCAAGC	858
1981	AGATACTGTG	CCACAGTAAG	AGTTCAGAGA	CCCCGACAGG	AAATCATCCA	GGACTTGGCC	2040
859	AGATACTGTG	CCACAGTAAG	AGTTCAGAGA	CCCCGACAGG	AAATCATCCA	GGACTTGGCC	918
2041	TCCATGGTCC	GGGAACTGCT	CATCCAATTT	TATAAATCAA	CCCGATTCAA	ACCTACTCGT	2100
919	TCCATGGTCC	GGGAACTGCT	CATCCAATTT	TATAAATCAA	CCCGATTCAA	ACCTACTCGT	978
2101	ATAATCTTCT	ATCGGGATGG	TGTTTCAGAA	GGACAGTTCA	GACAGGTATT	ATATTATGAG	2160
979	ATAATCTTCT	ATCGGGATGG	TGTTTCAGAA	GGACAGTTCA	GACAGGTATT	ATATTATGAG	1038
2161	CTACTGGCAA	TTCGAGAAGC	CTGTATCAGT	TTGGAAAAAG	ACTATCAACC	TGGAATAACC	2220
1039	CTACTGGCAA	TTCGAGAAGC	CTGTATCAGT	TTGGAAAAAG	ACTATCAACC	TGGAATAACC	1098
2221	TACATTGTTG	TTCAGAAGAG	ACATCATAACG	CGGTTGTTCT	GTGCTGATAG	GACAGAAAGG	2280
1099	TACATTGTTG	TTCAGAAGAG	ACATCATAACG	CGGTTGTTCT	GTGCTGATAG	GACAGAAAGG	1158
2281	GTTGGAAGAA	GCGGCAACAT	CCCAGCTGGA	ACCACGGTGG	ATACCGACAT	TACTCACCCA	2340
1159	GTTGG						1163
2341	TATGAATTCG	ACTTTTATCT	CTGTAGCCAT	GCTGGAATAC	AGGGTACCAG	CCGTCCTTCA	2400
2401	CACTATCATG	TTTTATGGGA	TGACAACTTC	TTTACTGCAG	ATGAACTTCA	GCTGCTCACT	2460
2461	TACCAGCTCT	GTCACACTTA	CGTACGCTGT	ACAAGATCTG	TTTCTATCCC	TGCACCAGCA	2520
2521	TATTACGCTC	ACCTGGTGGC	ATTCAGAGCC	AGATATCATC	TTGTGGACAA	GGAACATGAC	2580
2581	AGTGCTGAAG	GAAGCCATGT	TTCAGGACAG	AGCAATGGGC	GAGATCCACA	AGCTCTTGCC	2640
2641	AAGGCTGTAC	AGATTCACCA	AGATACCTTA	CGCACAATGT	ACTTCGCTTA	ACAAGTCCAA	2700
2701	GTTTATTCTC	CGTGACAAAG	AGATGAAAAG	TGAATCAACA	TACAATGTAT	GTTTCCAATG	2760
2761	GAGTCAATTT	GCTGGGGAGG					2780

Apéndice 1: Comparación de la secuencia del cDNA ENSMUST00000030655 (arriba) con la secuencia de cDNA amplificada por RT-PCR a partir de RNA total de testículo adulto (abajo). El símbolo “?” indica la pérdida de complementariedad debida a la presencia de un polimorfismo.

1	MEIGSAGPIG	AQPLFIVPRR	PGYGTMGKPI	KLLANCFQVE	IPKIDVYLYE	VDIKPDKCPR	60
1	MEIGSAGPIG	AQPLFIVPRR	PGYGTMGKPI	KLLANCFQVE	IPKIDVYLYE	VDIKPDKCPR	60
61	RVNREVVDISK	VQHFVKVTFG	DRRPVYDGKR	SLYTANPLPV	ATTGVLDLDT	LPGEGGKDRP	120
61	RVNREVVDISK	VQHFVKVTFG	DRRPVYDGKR	SLYTANPLPV	ATTGVLDLDT	LPGEGGKDRP	120
121	FKVSVKRVSR	VSWHLLHEAL	AGGTLPEPLE	LDKPVSTNPV	HAVDVVLRHL	PSMKYTPVGR	180
121	FKVSVKRVSR	VSWHLLHEAL	AGGTLPEPLE	LDKPVSTNPV	HAVDVVLRHL	PSMKYTPVGR	180
181	SFFSAPEGYD	HPLGGGREVW	FGFHQSVRPA	MWKMLNIDV	SATAFYKAQP	VIQFMCEVLD	240
181	SFFSAPEGYD	HPLGGGREVW	FGFHQSVRPA	MWKMLNIDV	SATAFYKAQP	VIQFMCEVLD	240
241	IHNIDEQPRP	LTDSHRVKFT	KEIKGLKVEV	THCGTMRRKY	RVCNVTRRPA	SHQTFPLQLE	300
241	IHNIDEQPRP	LTDSHRVKFT	KEIKGLKVEV	THCGTMRRKY	RVCNVTRRPA	SHQTFPLQLE	300
301	NGQTVERTVA	OYFREKYTLQ	LKYPHLPCLQ	VGQEQKHTYL	PLEVCNIVAG	QRCIKKLTND	360
301	NGQTVERTVA	OYFREKYTLQ	LKYPHLPCLQ	VGQEQKHTYL	PLEVCNIVAG	QRCIKKLTND	360
361	QTSTMIKATA	RSAPDRQEEI	SRLVRSANYE	TDPFVQEFQL	KVRDEMAHVT	GRVLPAPMLQ	420
361	QTSTMIKATA	RSAPDRQEEI	SRLVRSANYE	TDPFVQEFQL	KVRDEMAHVT	GRVLPAPMLQ	420
421	YGGNRRTVAT	PSHGVWDMRG	KQFHTGVEIK	MWAIACFATQ	RQCREEILKG	FTDQLRKISK	480
421	YGGNRRTVAT	PSHGVWDMRG	KQFHTGVEIK	MWAIACFATQ	RQCREEILKG	FTDQLRKISK	480
481	DAGMPIQGQP	CFCKYAQGAD	SVEPMFRHLK	NTYSGLQLII	VILPGKTPVY	AEVKRVGDTL	540
481	DAGMPIQGQP	CFCKYAQGAD	SVEPMFRHLK	NTYSGLQLII	VILPGKTPVY	AEVKRVGDTL	540
541	LGMATQCVQV	KNVIKTSPQT	LSNLCLKINV	KLGGINNILV	PHOSNQ		
541	LGMATQCVQV	KNVIKTSPQT	LSNLCLKINV	KLGGINNILV	PHQRPSVFQQ	PVIFLGADVT	600
601	HPPAGDGKKP	SIAAVVGSMD	SIAAVVGSMD	AHPSRYCATV	RVQRPRQEI	QDLASMVREL	660
661	LIQFYKSTRF	KPTRIIFYRD	GVSEGFQROV	LYYELLAIRE	ACISLEKDYQ	PGITYIVVQK	720
721	RHHTRLFCAD	RTERVGRSGN	IPAGTTVDTD	ITHPYEFDFY	LCSHAGIQGT	SRPSHYHVLW	780
781	PDNFFTADL	QLLTYQLCHT	YVRCRVSISI	PAPAYYHLV	AFRARYHLVD	KEHDSAEGSH	840
841	VSGQSNRDP	QALAKAVQIH	QDTLRTMYFA				860

Apéndice 2: Comparación de la secuencia de la proteína AGO3 (abajo), producida a partir del transcrito ENSMUST00000030655, con la proteína deducida a partir de la secuencia teórica del nuevo transcrito Tr-Ago3 (arriba). Dominio PAZ (verde), dominio PIWI (azul) y caja PIWI (rosa). Se muestran, en amarillo, residuos altamente conservados que forman parte del centro catalítico.